

Лекция 3

Культивирование клеток

Культивирование клеток растений

В основе метода культивирования клеток и тканей растений лежит уникальное свойство растительной клетки – **тотипотентность** – это способность клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма.

Культуры клеток и тканей растений выращивают на искусственной питательной среде в асептических условиях.

Принципы культивирования растительных клеток.

1) **Создание асептических условий** - стерилизация помещения (ламинар-бокса), посуды, инструментов, питательных сред, самих растений (диацид, перекись водорода, сулема).

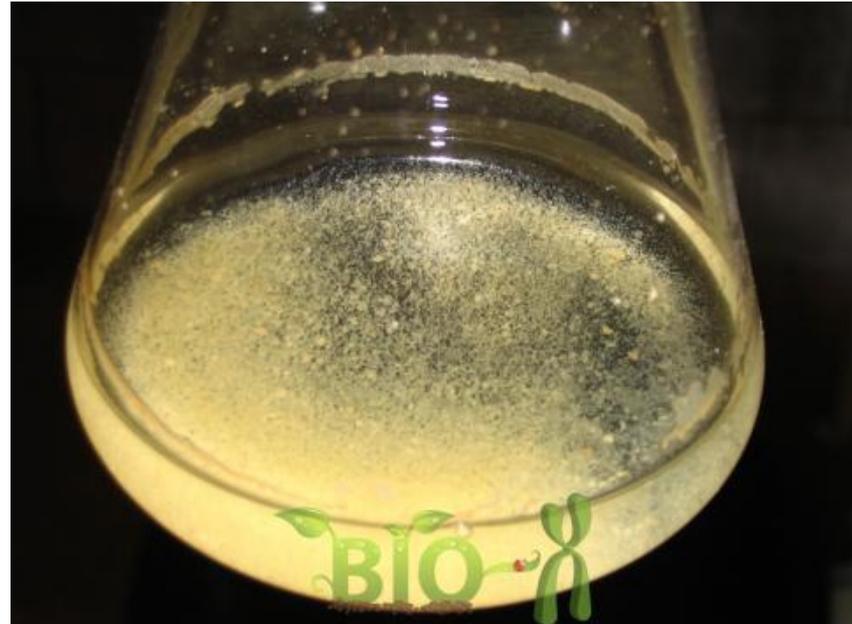
2) **Питательные среды** имеют сложный состав: **углеводы** (глюкоза или сахароза), т.к. некоторые ткани не содержат хлорофилла; **макро- и микроэлементы; фитогормоны** (ауксины, цитокинины).

3) **Условия культивирования:** освещенность, температура (26° С), аэрация, влажность.

Культуры клеток высших растений



Каллусная
(поверхностное
культивирование)



Суспензионная
(глубинное
культивирование)

Каллус – неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток.

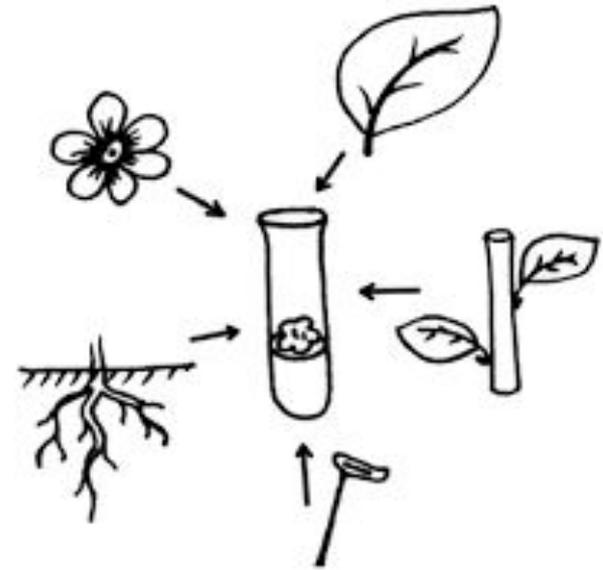
У растений в природе каллус возникает в **местах поранения** и функционирует непродолжительное время, способствует заживлению ран, накоплению питательных веществ для регенерации



Каллус может образовываться на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*.

Эксплант – фрагмент растительной ткани, культивируемый на питательной среде самостоятельно или с целью получения **каллуса**.

Каллусную культуру можно получить из разных частей растения: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей и др. Выбирают молодые, здоровые ткани растений.



Каллусная ткань образуется при культивировании клеток растений на поверхности агаризованной среды.

В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают плотные или рыхлые. В длительной культуре каллусные ткани теряют пигментацию и становятся рыхлыми. Цвет массы может быть белым, желтоватым, зеленым, красным.



Культуру каллусных тканей можно выращивать поверхностным способом:

1) на полужидкой агаризованной среде (концентрация агар-агара 0,6-1%);

2) на мостиках из фильтровальной бумаги или пенополиуретана, погруженных в жидкую питательную среду.

Кусочек каллусной ткани через определенное время культивирования нужно переносить на свежую питательную среду. При многократном переносе каллусные клетки приобретают автономность по отношению к гормонам, утрачивают или значительно снижают способность к регенерации целого растения.

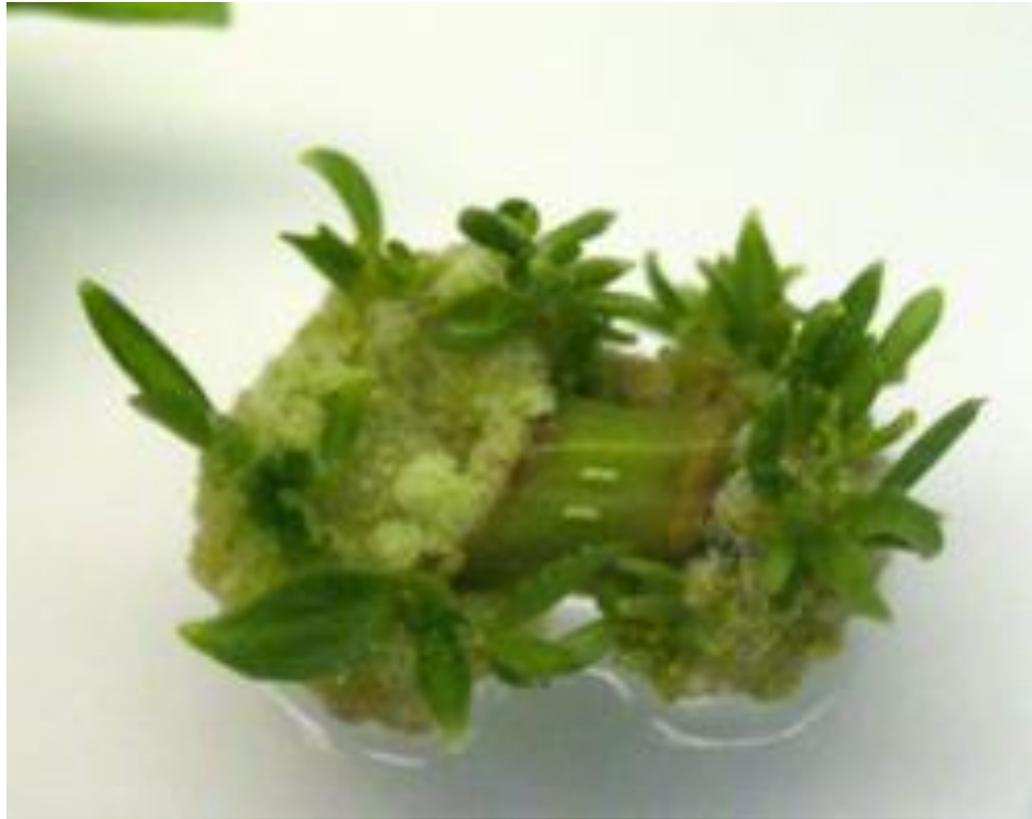
Образование и рост каллусной ткани контролируются фитогормонами:

1) **ауксины** вызывают дедифференцировку клеток, подготавливают их к делению;

2) **цитокинины** вызывают интенсивное деление клеток, в результате которого образуется каллус.

- В культуре каллусной ткани можно **индуцировать морфогенез** (т.е. образование корней, стебля, листьев и т. д.). Для этого можно использовать различные факторы: изменение соотношения фитогормонов, света, температуры, состава питательной среды.
- При изменении соотношения между ауксинами и цитокининами возникают различные типы морфогенеза.

- В 1955 г. Скуг и Миллер предложили гипотезу **гормональной регуляции (правило Скуга – Миллера)**:
 - если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется **каллус**;
 - если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются **корни**;
 - если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются **почки, побеги**.
-
- $C_a \geq C_c$ – каллус
 - $C_a \gg C_c$ – корни
 - $C_a \ll C_c$ – почки, побеги



Каллусообразование и начало регенерации из стеблевых сегментов **тополя** *Populus ssp.* в культуре *in vitro*

<http://www.biengi.ac.ru/transrast.htm>

- **Суспензионные культуры** получают из рыхлой каллусной ткани, которая легко распадается на небольшие клеточные агрегаты и отдельные клетки.
- Её помещают **в жидкую питательную среду** того же состава, что и для каллуса, и выращивают в колбах на качалке (100-120 оборотов в минуту).
- Состояние клеточных суспензий характеризуется либо плотностью клеточной популяции или по сырой (сухой) биомассе.
- За 14-16 дней плотность популяции клеток может быть повышена в 100 раз.
- Клетки растений можно культивировать в различного типа **биореакторах**.

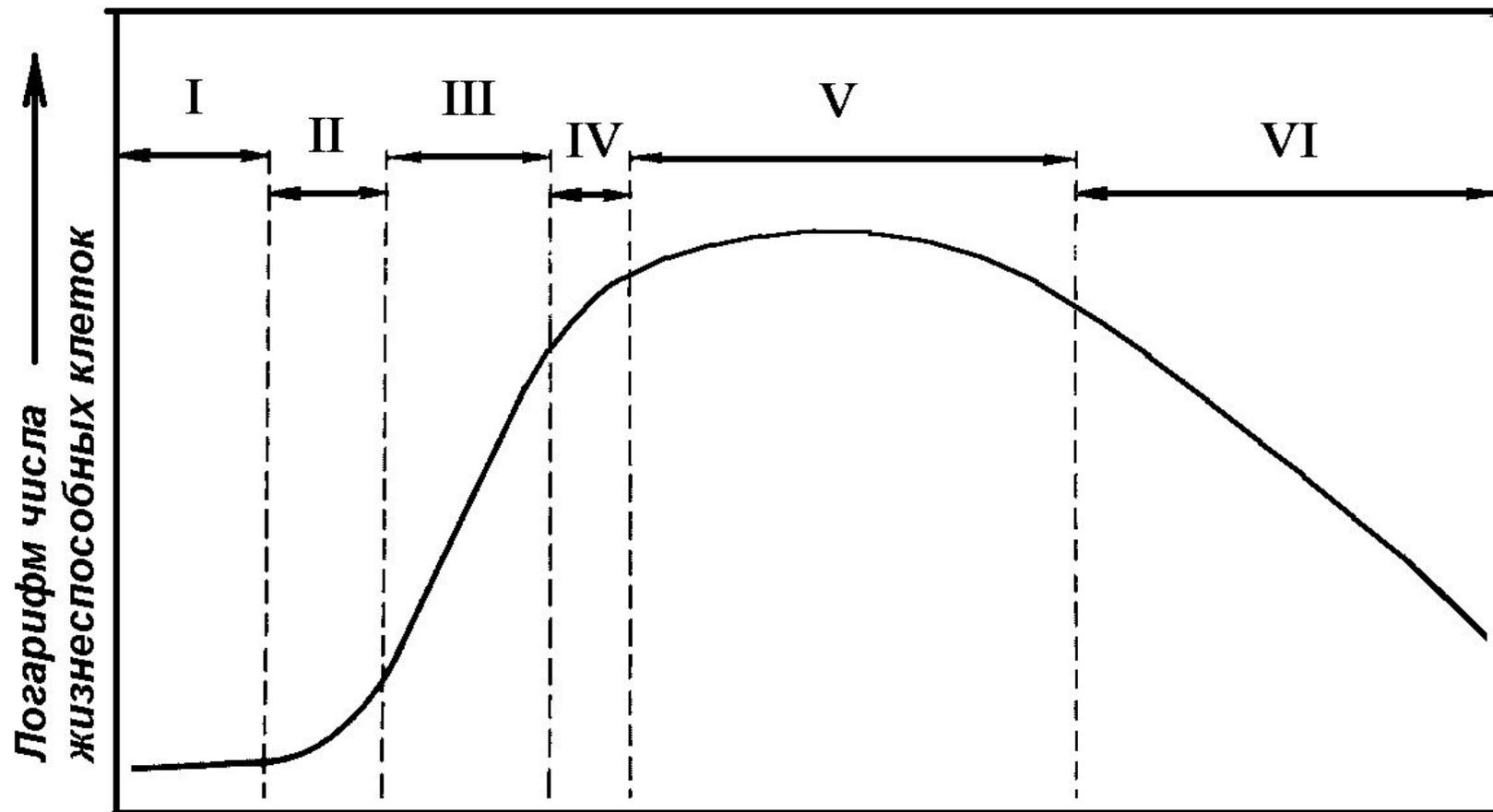


Рис. Фазы кривой роста популяции растительных клеток:

I – лаг-фаза, II – экспоненциальная фаза,

III – фаза линейного роста, IV – фаза замедленного роста, V – стационарная фаза, VI – фаза отмирания

Сложность культивирования изолированных клеток:

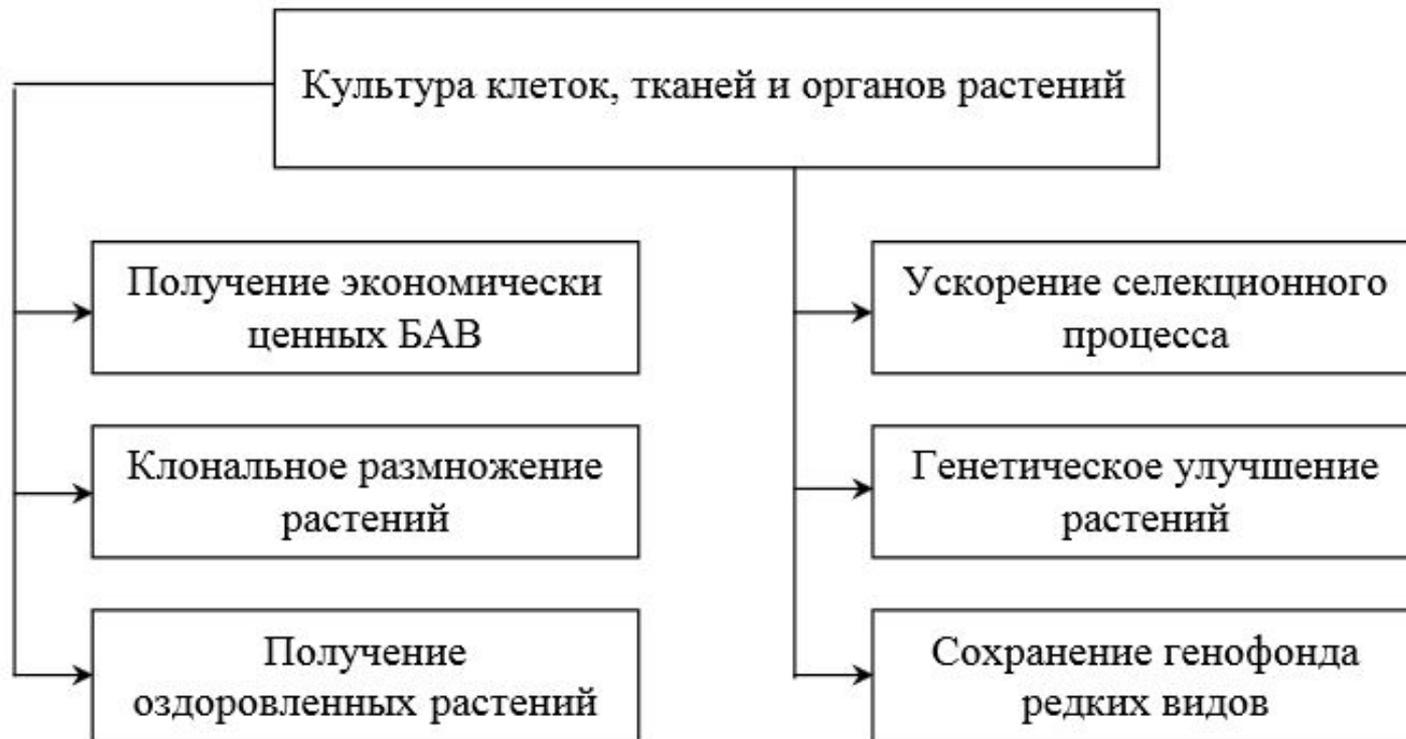
- 1) медленный рост (время удвоения - 1-3 суток),
- 2) чувствительность к механическому повреждению.

Для улучшения роста растительных клеток подбираются:

- 1) оптимальное соотношение компонентов среды, гормонов.
- 2) условия культивирования, аэрация.
- 3) используется двухэтапное культивирование на различных средах: для роста биомассы и для накопления целевого продукта.

Клетки растений *in vitro* используются:

- 1) для изучения физиолого-биохимических процессов (цитодифференцировка, морфогенез, обмен веществ, действие факторов среды) и генетики растений.
- 2) в биотехнологии.



Использование растительных клеток

1) **Получение биологически активных веществ** для медицины, парфюмерии, и других отраслей промышленности (алкалоиды, стероиды, гликозиды, терпеноиды, эфирные масла, полисахариды и др.).

В результате клеточной селекции и подбора условий культивирования продуктивность культивируемых клеток может быть значительно выше, чем у целых растений.

Культивируемые клетки используют как **мультиферментные системы для биотрансформации** - превращения веществ - предшественников в более дорогие конечные продукты.

2) Использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала (клональное микроразмножение растений).

Метод позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Получают посадочный материал хозяйственно ценных оздоровленных сортов картофеля, винограда, овощных, плодовых, декоративных растений и лесных пород.

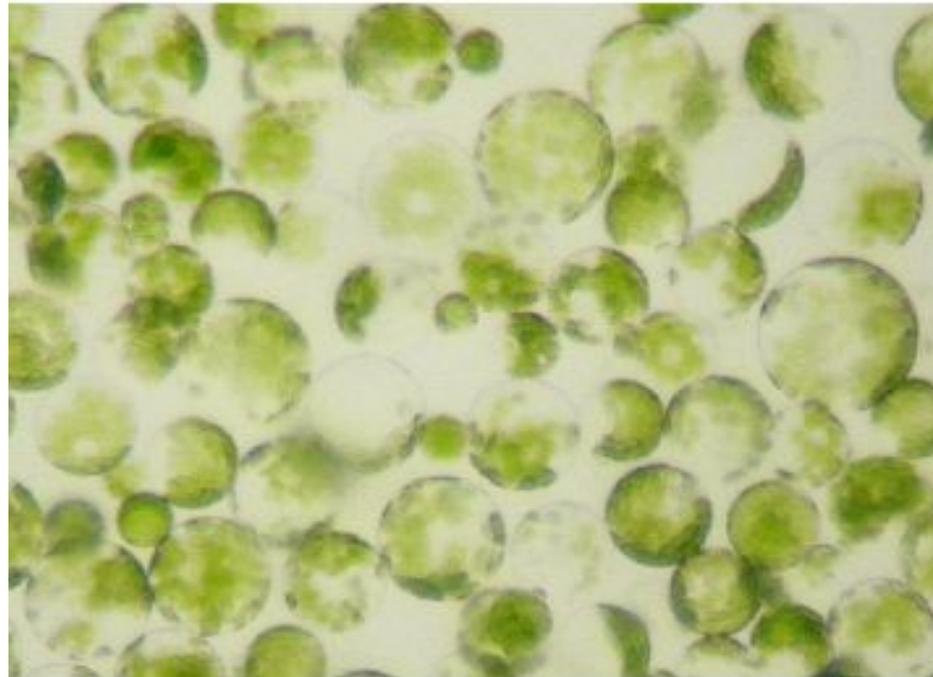
3) Использование изолированных клеток и тканей в **селекции растений** дает возможности для ускорения селекционного процесса, а также для получения новых форм растений.

4) **Криосохранение культивируемых клеток.**

Длительное хранение клеток растений при температуре жидкого азота (-196°C) проводят в целях создания банка генов редких и исчезающих видов, ценных селекционных объектов и продуцентов биологически активных веществ.

Протопласты растительных клеток, их получение, методы регенерации и культивирования.

Протопласт (от греч. Protos - первый и platos - вылепленный, образованный) - клетка, лишенная целлюлозной оболочки, окруженная цитоплазматической мембраной, способная осуществлять активный метаболизм.



Основные этапы при получении протопластов:

- 1) удаление эпидермиса в стерильных условиях;**
- 2) измельчение ткани;**
- 3) помещение её в мацерирующий раствор, содержащий сахара, минеральные соли, ферменты;**
- 4) отделение образовавшихся протопластов путем фильтрования, центрифугирования и др.;**
- 5) промывание протопластов.**

Для выделения протопластов существуют 2 метода.

1) Механическое удаление клеточной стенки в среде, содержащий осмотический стабилизатор.

2) Ферментативное удаление клеточной стенки.

Среда при выделении протопластов должна содержать компоненты:

1) осмотический стабилизатор (сахар или солевой раствор в концентрации 0,3 – 0,7 М);

2) солевую основу;

3) ферментные препараты (целлюлазы, пектиназы, гемицеллюлазы), в зависимости от строения клеточной стенки растений.

- На **культивирование протопластов** влияют следующие **условия**: значение рН (кислое), температура, освещенность, плотность посева протопластов.
- При оптимальных условиях выделения и культивирования, первое деление и регенерация клеточной стенки наблюдается через 3-4 суток.
- Затем образуются многоклеточные агрегаты, развивающиеся в **каллус**.
- Можно **регенерировать целые растения**.

- **В природе существует два способа размножения растений:** половой (семенной) и вегетативный.
- **К недостаткам семенного размножения** относятся генетическая неоднородность семенного материала и длительность ювенильного периода (до перехода к размножению).
- **При вегетативном размножении** генотип материнского растения сохраняется, сокращается длительность ювенильного периода. Большинство видов плохо размножается вегетативным способом, к ним относятся многие древесные породы.

- **На основе метода слияния протопластов разработан метод соматической гибридизации растений.**
- Изолированные протопласты, выделенные из родительских растений, могут сливаться с образованием гибридных клеток, из которых можно регенерировать гибридное растение.
- Протопласты получают из соматических клеток растений. Слияние протопластов способствует объединению не только ядерных, но и цитоплазматических генов родительских клеток.
- **Соматический гибрид** - продукт слияния и цитоплазмы, и ядер обоих протопластов.
- **Цибрид (цитоплазматический гибрид)** – содержит цитоплазму обоих родителей, а ядро одного из них.

Стимулировать **слияние протопластов** можно с помощью:

- 1) **полиэтиленгликоля** (снижение поверхностных зарядов, отнятие воды, разрыв мембран);
- 2) под воздействием **электрического поля** (образование пор в мембранах под действием тока).

Образующиеся гибридные структуры сохраняют способность к восстановлению клеточной стенки, в результате появляются гибридные клетки.

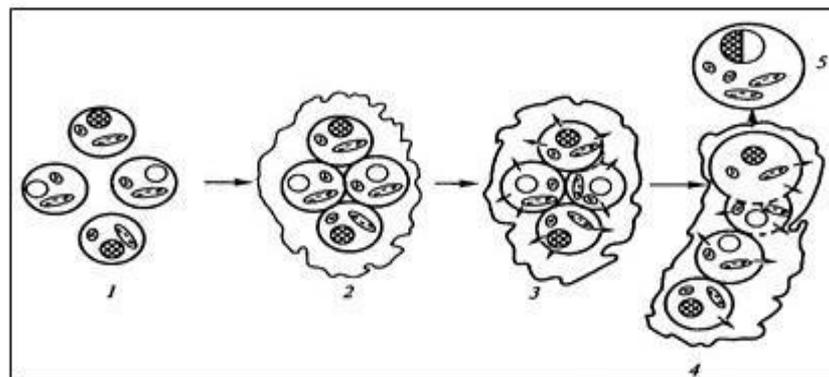


Рис. 4.1. Слияние протопластов под действием полиэтиленгликоля
 1 – изолированные протопласты; 2 - слияние протопластов в результате дегидратации; 3 - образование пор в мембране протопласта; 4 – перетекание через поры внутриклеточного материала; 5 – гибридный протопласт

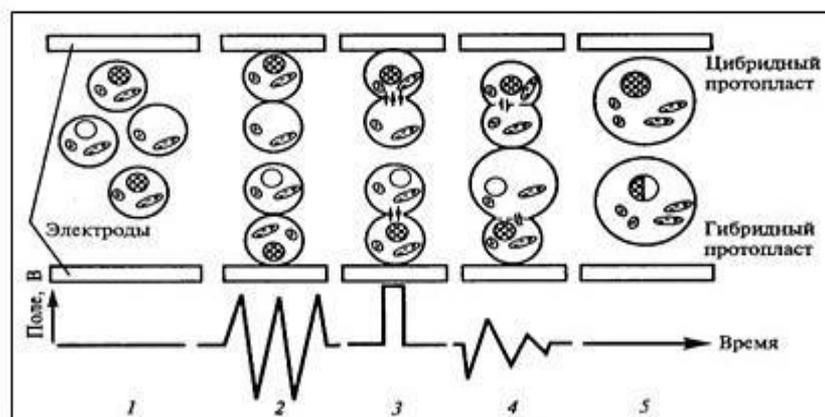


Рис. 4.2. Слияние протопластов под действием электрического тока
 1 – изолированные протопласты; 2 – слияние протопластов полярными поверхностями; 3 - образование пор в мембранах под воздействием сильного импульса постоянного тока; 4 – смешивание цитоплазмы; 5 – образование гибридных протопластов

- **Метод слияния протопластов** используют для **селекции промышленно важных продуцентов**.
- Возможно **получение межвидовых и межродовых гибридов**, скрещивание филогенетически отдаленных форм.
- Известны стерильные межвидовые гибриды картофеля и томатов (поматы), табака и картофеля, табака и беладонны, образующие нормальные стебли и корни.
- Удаётся получать растения, гетерозиготные по внеядерным генам; гибриды, в которых от одного родителя получено ядро, а от другого – цитоплазма.

Клональное микроразмножение растений - размножение растений *in vitro* неполовым путем с помощью **метода культуры тканей**. Позволяет получать растения генетически идентичные исходному.

Клон (от греч. *klon* – отпрыск, ветвь) – растение, полученное путем бесполого, вегетативного размножения.

Клоны идентичны материнскому растению и между собой.

В основе лежит способность соматической растительной клетки полностью реализовать потенциал своего развития (**тотипотентность**), способность к регенерации.



Клональное микроразмножение растений имеет преимущества:

- 1) Высокий коэффициент размножения.
 10^5 - 10^6 – для травянистых, цветочных растений; 10^4 - 10^5 – для кустарниковых, древесных, 10^4 – для хвойных.
- 2) Получение генетически однородного материала.
- 3) Возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов, грибов, бактерий благодаря клонированию меристематических тканей.
- 4) Воспроизведение посадочного материала круглый год.
- 5) Экономия площадей для выращивания посадочного материала.
- 6) Возможность размножения растений, которые в естественных условиях трудно размножаются.
- 7) Сокращение продолжительности селекционного периода.

При клональном используется **меристематические ткани**.

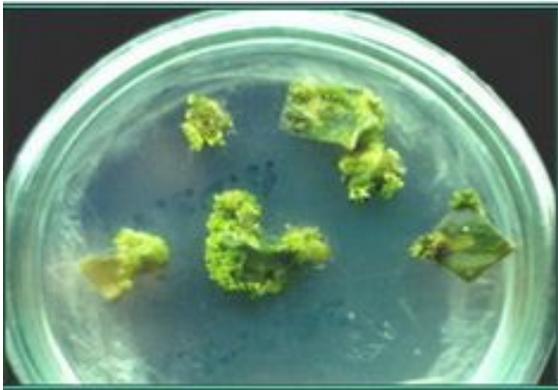
Меристемы - образовательные ткани растений, состоят из клеток, которые длительное время сохраняют способность к делению. За счет деления этих клеток происходит рост растений в течение всей их жизни.

Меристемы дают начало специализированным клеткам, образующим постоянные ткани (покровные, основные, проводящие, механические). Апоикальные меристемы обеспечивают рост побегов и корней в длину.

Стадии процесса клонального микроразмножения:

1. **Изолирование эксплантов растения** – донора, получение хорошо растущей стерильной культуры.

В качестве **экспланта** используют молодые, слабо дифференцированные ткани: **кончики стеблей, пазушные почки, зародыши, молодые листья, черенки, соцветия, чешую луковиц.**



Эксплант в стадии формирования почек



Почки, прорастающие на питательной среде

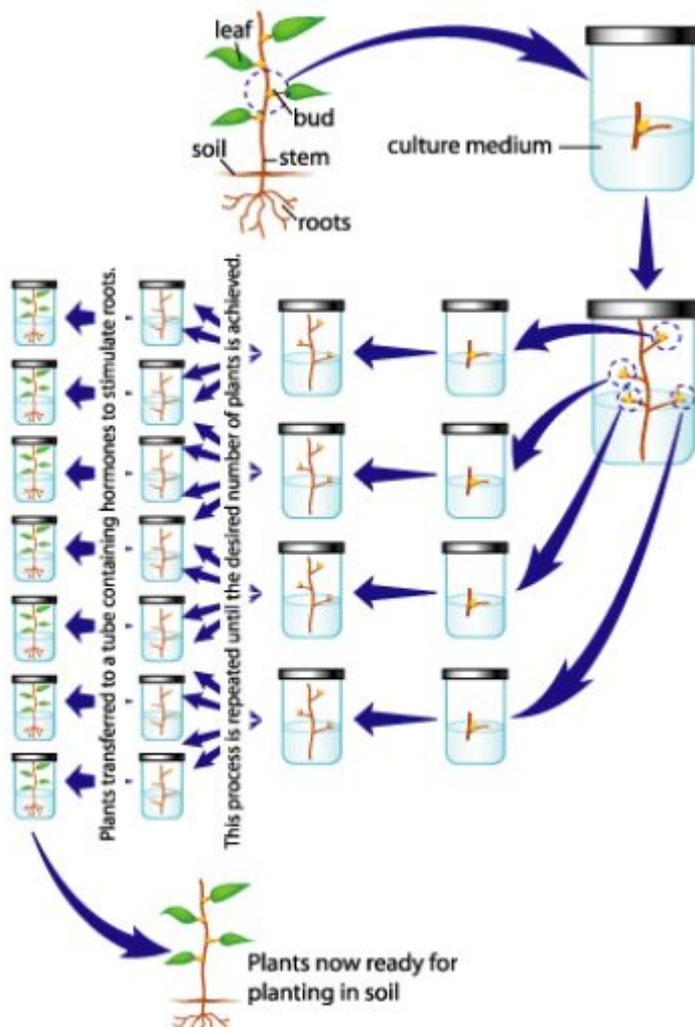
2. Микроразмножение путем микрочеренкования. Основано на снятии апикального доминирования (удаление верхушечной меристемы, добавление цитокининов).

Полученные побеги отделяют от первичного экспланта и самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков. Образующиеся пучки побегов делят, переносят на свежую питательную среду.

3. Укоренение размноженных побегов (добавляют в питательную среду ауксины, затем переносят в почву).

4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

- От одной стерильной почки можно в год получить несколько тысяч растений.



При культивировании меристемы малины *in vitro* можно в год получить до 50000 растений, а при черенковании – 50.

- **Области применения**

- 1) Размножение уникальных генотипов растений, включая продукты генной инженерии.
- 2) Быстрое размножение новых и существующих сортов.
- 3) Размножение *in vitro* лучших экземпляров взрослых древесных растений.
- 4) Сохранение редких и исчезающих видов.

- Пионером клонального микроразмножения считают французского ученого Ж. Мореля, получившего в 1950-х г. первые растения в пробирках — регенеранты орхидей.
- К началу 1980-х клональное микроразмножение стало направлением промышленного производства растений. Лидеры в этой области — Нидерланды, США, Индия, Израиль, Италия, Польша.
- В Италии в год выращивают более миллиона подвоев персиковых деревьев.
- Многие породы хвойных деревьев (ель, сосна, лиственница, секвойя).

- В Беларуси существует около 30 лабораторий.
- Первой культурой, для которой было разработано и применено клонирование *in vitro* для массового получения посадочного материала, стал картофель.
- Налаживается масштабное производство оздоровленного посадочного материала земляники, голубики высокорослой, брусники обыкновенной, декоративных растений (рододендроны, сирень, розы) и др. культур.

- <http://www.blueberry.by/laboratory/>.



- <http://www.blueberry.by/laboratory/>.



- <http://www.blueberry.by/laboratory/>.



Культивирование клеток и тканей животных.

В зависимости от поставленных перед исследователем целей и задач, используется два направления в культивировании животных клеток:

- 1) культура клеток,**
- 2) культура органов и тканей.**

Культуры тканей могут подразделяться

- 1) по виду животного, от которого они происходят;**
- 2) по типу ткани-источника;**
- 3) по состоянию ткани на момент извлечения**
(взрослые, эмбриональные, нормальные, опухолевые);
- 4) по способу выращивания** (монослойные, суспензионные, на микроносителях и т. п.).

- В настоящее время могут культивироваться практически любые клетки человека и животных.
- **Наиболее часто культивируются следующие клетки:**
- 1) соединительной ткани – фибробласты;
- 2) скелетной – кость и хрящи;
- 3) мышечной – скелетные, сердечные и гладкие мышцы;
- 4) эпителиальной – печень, легкие, кожа, мочевого пузыря, почки, молочная железа;
- 5) нервной – глиальные клетки и нейроны (хотя они лишены способности к пролиферации);
- 6) эндокринной системы – гипофиз, надпочечники, клетки островков Лангерганса;
- 7) различные типы опухолевых клеток.

- **Нормальные и опухолевые ткани.**
- Культуры, полученные из **нормальных тканей**, имеют ограниченное время жизни. Дифференцировка нормальных клеток в культуре сопровождается обычно полным прекращением их пролиферации.
- Культуры, полученные из **опухолей**, способны пролиферировать неограниченно долгое время.
- В культурах опухолевых клеток возможна **частичная дифференцировка** при сохранении способности к пролиферации.

- В 1961 г. **Хейфлик** и **Мурхед** выделили линию диплоидных клеток человека (**HDC**) **WI-38**, показали, что период ее существования в культуре ограничивается приблизительно 50 генерациями, затем клетки старели и отмирали. Эти клетки оставались диплоидными и не имели признаков злокачественных изменений.
- **Предел, или лимит, Хейфлика** – граница количества делений соматических клеток. Установлена в культурах всех полностью дифференцированных клеток человека и других животных. Максимальное число делений различно в зависимости от типа клеток и от организма. Для большинства человеческих клеток **предел Хейфлика** составляет **52 деления**.

Основные типы культур животных клеток по характеру и длительности существования:

1) Первичные культуры (от животного).

Их можно получить практически из любого органа, но они существуют до первого пересева.

2) Перевиваемые культуры.

а) **диплоидные культуры**, чаще получаемые из эмбриональных тканей и сохраняющие до 50 пересевов диплоидный набор хромосом;

б) **трансформированные постоянные гетероплоидные культуры**, способные к существованию вне организма неограниченно долгое время.

1) **Первичная клеточная культура** (непосредственно от животного) имеет ограниченный срок существования. Через определенное время (20-30 суток) в клетках возникают **явления неспецифической дегенерации**: грануляция и вакуолизация цитоплазмы, ошаривание клеток, утрата связи между ними и твердым субстратом, на котором они выращивались. Гибель первичной клеточной культуры связана с естественным снижением метаболической активности клеток, выведенных из-под контроля нейрогуморальных факторов, действующих в целостном организме.

Увеличить сроки жизни первичной клеточной культуры могут периодическая смена среды, изменение ее состава.

Отдельные клетки первичной культуры могут сохранить способность к росту и размножению. Они дают начало **перевиваемым** культурам клеток.

2) Перевиваемые культуры клеток.

А) полуперевиваемые клетки с диплоидным набором хромосом и ограниченной продолжительностью жизни, сочетают черты первичных и перевиваемых клеток.

Б) перевиваемые клетки, характеризуются потенциальным бессмертием и гетероплоидным кариотипом (клеточные линии).

Культуры перевиваемых клеток, способные к автономному существованию и бесконечно долгому размножению, называются **трансформированными.**

Злокачественные новообразования являются источником постоянных клеточных линий. Их клетки трансформированы *in vivo* при развитии патологического процесса.

Получение клеточных линий на основе клеток первичных и диплоидных культур

Первичные культуры клеток получают путем стерильного удаления фрагмента ткани и его **механической** или ферментативной дезагрегации.

Схема выделения первичной культуры клеток из плаценты человека.



- При образовании **постоянной клеточной культуры** изменяются морфофизиологические особенности клеток: уменьшается размер, происходит округление. Снижается скорость роста клеток, зависимость от субстрата (сыворотки), адгезивность. Такие клетки возможно поддерживать на более простых средах.
- Нормальные клетки, спонтанно трансформируясь в постоянную линию, не становятся злокачественными (несмотря на некоторые черты сходства).
- К настоящему времени существует около **500 постоянных клеточных линий**, полученных от более чем **40 видов животных**.

Питательные среды и условия культивирования.

Культуральная среда должна обеспечивать клетки питательными и гормональными факторами.

Основу питательных сред составляют **солевые растворы**. Они обеспечивают поддержание постоянного кислотно-щелочного баланса среды.

Компоненты биологического происхождения (плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты и т.д.).

Ростовые факторы.

Гормоны. Часто применяются **инсулин**, **глюкокортикоиды** (гидрокортизон, дексаметазон), **стероиды** (эстрадиол, тестостерон, прогестерон) и **гормоны щитовидной железы** (трийодтиронин).

Системы культивирования клеток

1. Непроточные культуры - клетки растут в определенном объеме среды.

По мере роста клеток используются питательные вещества, накапливаются метаболиты. Это со временем приводит к прекращению их деления. Увеличить продолжительность жизни клеток можно периодическим добавлением свежей среды и удалением части клеток.

2. Проточные культуры. Постоянно подается питательная среда и одновременно удаляется равный объем среды с клетками. Обеспечивается постоянная концентрация питательных веществ и метаболитов, количество клеток.

Существует **2 основных способа культивирования** ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК:

1) *монослойные культуры* (клетки прикреплены к субстрату);

2) *суспензионные культуры* (клетки растут в жидкой среде).

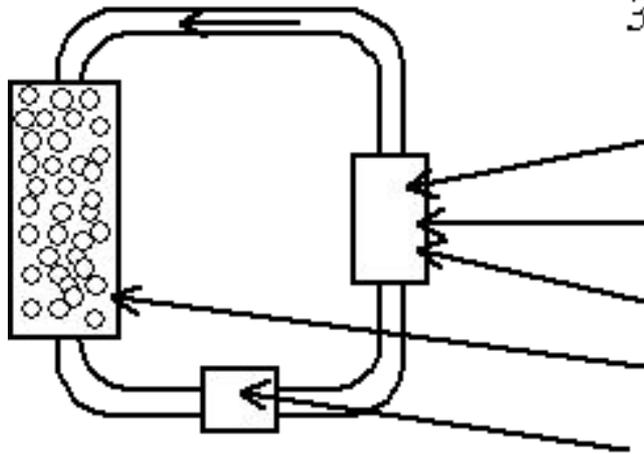
Виды монослойного культивирования:



1. Чашка Колле, плоский флакон с клетками на дне



2. Вращающаяся бутель (круглый сосуд) с клетками на дне и стенках



3. Колонка с клетками на микроносителях

рН, давление, CO_2 , температура

система контроля и регенерации среды

компоненты питательной среды

стеклянные бусы

перистальтический насос

Преимущества монослойных культур:

1. Можно выращивать любые типы клеток. Многие типы клеток в прикрепленном состоянии лучше образуют целевой продукт.
2. Обеспечивается высокая плотность клеток. Для пассирования вирусов, требуются тесные межклеточные контакты.
3. Можно провести замену среды, если рост клеток идет в одних условиях, а наработка продукта в других.

Недостатки монослойных культур:

1. Посуда с клетками занимает большое пространство.
2. Недостаточно эффективный контроль (рН, концентрации кислорода), трудности отбора пробы. В основном проводится визуальный анализ.

Суспензионное культивирование

Первыми суспензионными культурами клеток животных были клетки злокачественных тканей.

Перевиваемая линия карциномы шейки матки (HeLa) выделена еще в 1952 году Джемом с сотрудниками. Эта линия клеток HeLa (Генриетта Лакс, умерла в 1951 г.) – первые человеческие клетки, выращенные в лаборатории, которые были бессмертными.



Клетки HeLa используются в настоящее время во многих лабораториях мира для исследования рака, СПИДа, воздействия радиации и токсичных веществ, картирования генов и др.

Суспензионные культуры животных клеток удобнее использовать для наращивания клеточной массы.

Некоторые клетки (трансформированные клетки, кроветворные клетки и асцитные опухоли) способны расти как на субстрате, так и в суспензии в зависимости от солевого состава среды культивирования.

Культуры **лимфоцитов** не прикрепляются к поверхности субстрата и выживают на дне культивационного сосуда под тонким слоем среды.

- **Суспензионное культивирование** по сравнению с стационарным культивированием:
 - 1) дает большее количество клеток;
 - 2) экономия питательных сред, буферных растворов.
- Суспензионные культуры широко используется в вирусологических исследованиях и для накопления больших количеств вирусосодержащего материала, при изготовлении вакцин и диагностических препаратов.

Основные направления использования клеточной культуры

1) **Генетика** – клонирование, хранение и слияние клеток. Получение и работа с мутантными клетками.

2) **Биотехнология.** Культуры клеток используются как источник различных секретируемых веществ: гормонов, интерферона и т. д.

3) **Вирусология.** В клеточной культуре проводится выращивание вирусов, наблюдение за поражёнными клетками, исследование явления клеточной трансформации.

4) **Эмбриология.** Использование клеточной культуры позволяет изучать дифференцировку клеток *in vitro*.

5) **Биохимия и патобиохимия** - исследование биохимических превращений и патологических путей.

- **6) Токсикология и фармакология.** Тестирование на клеточной культуре механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов.
- Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя экстраполировать на целый организм. Если вещество оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому животному. Использование культуры клеток избавляет от страданий большое количество животных.
- **7) Иммунология.** Получение гибридом и моноклональных антител.

Гибридомы. Моноклональные антитела.

Антитела - белки сыворотки крови, которые синтезируются в организме как проявление защитной реакции при попадании в него чужеродного вещества (антигена).

Иммунная система вырабатывает специфические антитела на огромное множество антигенов. В основе такой способности лежит наличие большого многообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела с узкой специфичностью.

В совокупности называемые иммуноглобулинами (Ig), антитела составляют один из главных белковых компонентов крови - по весу около 20% суммарного белка плазмы.

- В 1975 году английскими учеными Г. Кёлером и Ц. Мильштейном разработана методика получения 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 В-лимфоциты, продуцирующие антитела.
- В-лимфоциты могут жить только в организме хозяина, при переводе на искусственную питательную среду они гибнут.

- **Гибридные клетки**, полученные в результате слияния В-лимфоцитов с опухолевыми клетками, способны неограниченно долго жить в искусственных средах и синтезировать антитела.
- **Гибридомы**, синтезирующие определенные виды антител, отбирают на селективных ростовых средах.
- Затем их помещают в питательную среду, в которой они размножаются и образуют много родственных клеток (клон). Такие **клоны** могут синтезировать **моноклональные антитела**.
- **Моноклональные антитела** - антитела, однородные по структуре и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах.

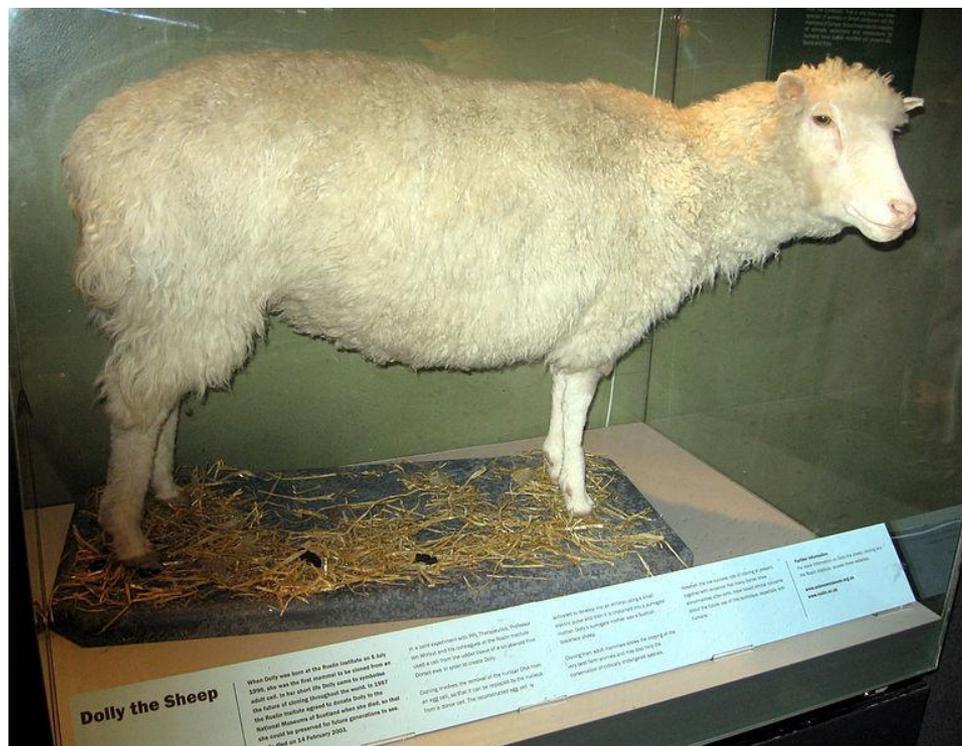
- **Другой метод получения антител** основан на инъекции полученной гибридомы в брюшную полость мыши.
- Там гибридома вызывает образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую высокую концентрацию антител.
- Массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей. Получаемый материал требует доочистки. Это дорого и трудоемко, поэтому в настоящее время предпочтение отдается способу с использованием культуры клеток.

Разработка методики получения моноклональных антител на основе гибридомной технологии принесла учёным в 1984 году Нобелевскую премию.

Моноклональные антитела используются для решения многих актуальных задач биологии и медицины:

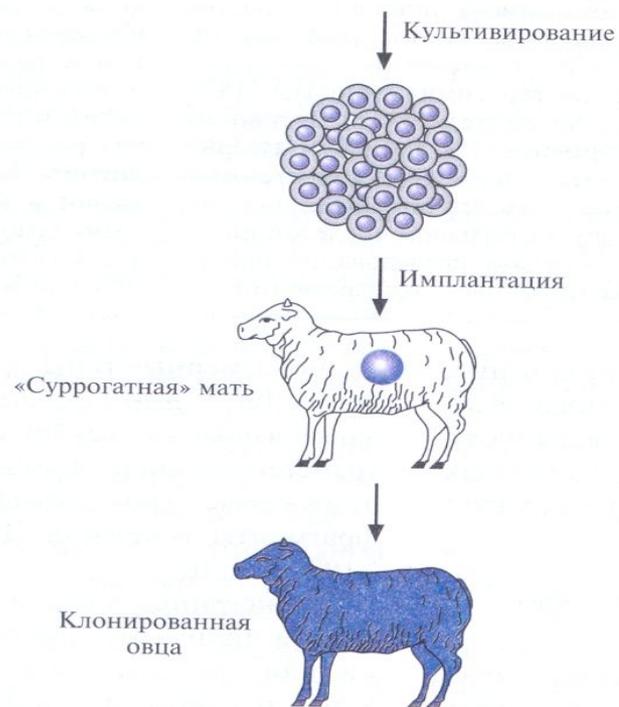
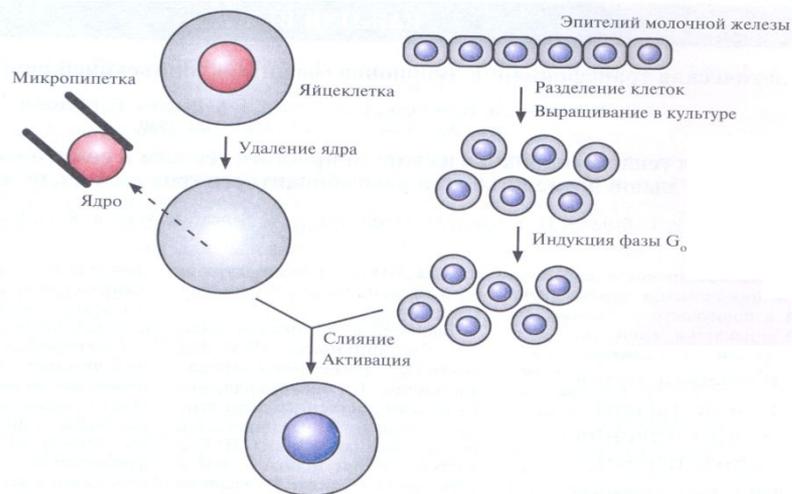
- 1) создание на их основе диагностических средств,
- 2) разработка препаратов для лечения злокачественных новообразований, вирусных и аутоиммунных заболеваний.
- 3) Моноклональные антитела применяются в качестве чувствительных реагентов на различные органические вещества.

- Разработаны способы клонирования животных — создания генетически идентичных животных.
- Овца по имени Долли была клонирована с помощью переноса ядра клетки молочной железы в яйцеклетку.



- Для этого из яйцеклетки одного животного удаляют ядро и заменяют его на ядро, полученное из соматической клетки другого животного.
- Таковую яйцеклетку внедряют в суррогатную мать и добиваются успешного развития эмбриона. Поскольку генетическая информация содержится в ядре, вырастающее животное генетически идентично животному, из клеток которого получено ядро.

Клонирование овцы методом переноса ядра.



- С тех пор с использованием этой технологии ученые клонировали тысячи особей крупного рогатого скота, мышей и других животных.
- Использование технологии переноса ядер соматических клеток имеет несколько ограничений. Животные, полученные методом клонирования, имеют высокий процент выкидышей на поздних сроках беременности и рождения детёнышей с врожденными дефектами, свидетельствующее о том, что клеточная трансформация не лишена недостатков.

- **Культивирование клеток и тканей беспозвоночных.**
- Клеточные культуры беспозвоночных получают:
- 1) Для изучения их роста и метаморфоза, основных процессов клеточной дифференцировки, регуляции активности генов.
- 2) Для изучения действия энтомопатогенных препаратов.
- 3) Линии клеток морских беспозвоночных используются для получения биологически-активных веществ.

- **Для получения культуры клеток и тканей беспозвоночных** используют эмбрионы, личинки, куколки и органы насекомых.
- **Методика получения первичных культур клеток насекомых** включает следующие этапы:
 - 1) стерилизация поверхности насекомых и подлежащих культивированию тканей;
 - 2) диссоциация клеток;
 - 3) пересадка их на питательную среду.

- В настоящее время получены стабильные (перевиваемые) клеточные линии важных вредителей сельского и лесного хозяйства: непарный шелкопряд, капустная металловидка, хлопковая и табачная совка и др.
- Среды для культивирования клеток и тканей насекомых отличаются от сред для клеток и тканей млекопитающих наличием органических кислот, повышенным содержанием аминокислот и более высоким осмотическим давлением.
- При составлении сред используются данные по составу гемолимфы.

Клеточные культуры насекомых легче выращивать по сравнению с клетками млекопитающих:

- 1) растут при комнатной температуре,
- 2) дешевле культуральные среды,
- 3) нет необходимости в CO_2 инкубаторах,
- 4) высокая плотность в культуре и др.