

Основы биотехнологии

42. Биотехнология: сырьевая база
и способы получения целевых
продуктов. Успехи и перспективы
современной биотехнологии.

- **Биотехнология** - дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом генной инженерии.

- **Биотехнологические объекты находятся на разных ступенях организации:**

- а) субклеточные структуры (вирусы, плазмиды, ДНК митохондрий и хлоропластов, ядерная ДНК);
- б) бактерии и цианобактерии;
- в) грибы;
- г) водоросли;
- д) простейшие;
- е) культуры клеток растений и животных;
- ж) растения.

- **Первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является:**
 - 1) получение чистых культур микроорганизмов,
 - 2) клеток или тканей (растений или животных).
- Многие дальнейшие этапы работы с биотехнологическими объектами проводятся с использованием методов, применяемых в микробиологических производствах.

- **Преимущества использования микроорганизмов:**
- 1) обладают огромным генетическим разнообразием, позволяющим им осуществлять:
 - а) практически неограниченную биосинтетическую деятельность;
 - б) разложение (деградацию) большого количества природных и неприродных соединений.
- 2) отличаются быстрым ростом, скорость которого намного превышает скорость роста высших организмов (растений и животных). Это позволяет за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств требуемого продукта в строго контролируемых условиях.

- **Промышленные микроорганизмы** – созданы для использования в промышленном производстве.
- **Модельные микроорганизмы** служат модельными объектами при изучении фундаментальных жизненных процессов. К их числу относятся кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*).
- **Базовые микроорганизмы - GRAS-микроорганизмы** (generally recognized as safe) - обычно считаются безопасными. Они хорошо изучены, непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики.
- При разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы.
- 1) Бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*.
- 2) грибы *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др.

- **Отбор микроорганизмов для использования в микробиологическом производстве:**
- 1) Отбор проб из естественных мест обитания предполагаемого продуцента.
- 2) Выбор нужного вида из имеющихся **коллекций микроорганизмов.**

- **Критерии при выборе биотехнологического объекта:**

- 1) Способен синтезировать целевой продукт.
- 2) Имеет высокую скорость роста;
- 3) Растет на доступных и недорогих питательных субстратах;
- 4) Устойчивость к заражению посторонней микрофлорой.
- 5) Непатогенный и не токсигенный для человека и животных, безопасный для окружающей среды.

- **Селекция штаммов-продуцентов :**
- Основное преимущество микроорганизмов как объекта селекции продуцентов – более простая, по сравнению с эукариотами, организация генетического аппарата.
- **1) Получение мутантов** и отбор лучших вариантов. Этот метод очень трудоемкий, занимает длительное время. Однако его использование приводит к значительному увеличению уровня продукции метаболита.
- С помощью ступенчатого отбора штаммов продуцентов пенициллина уровень активности штамма был увеличен от 100 ед/мл до 40 000 ед/мл.
- **2) Генетическое конструирование** штаммов.

- **Селекция штаммов-продуцентов** – направленный отбор мутантов с заданными признаками.



Рис. Схема селекции микроорганизмов

- **Субстраты для культивирования биообъектов.**
- Компонентный состав сред определяется питательными потребностями продуцента.
- Наиболее важным критерием, определяющим выбор сырья для биотехнологических процессов, являются:
 - 1) стоимость,
 - 2) наличие в достаточных количествах,
 - 3) химический состав.

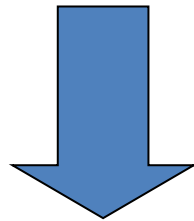
Подбор питательных сред для выращивания микроорганизмов

Чтобы микроорганизмы могли расти и размножаться, они должны получать из окружающей среды все вещества, которые необходимы им для синтеза структурных компонентов клетки и для получения энергии.

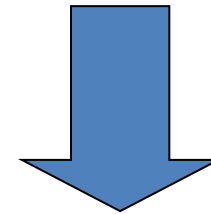
- **Макроэлементы**, требуемые для роста микроорганизмов: **C, O, H, N, S, P, K, Mg, Ca** и **Fe**.
- **C, O, H, N, S, P** являются компонентами основных органических соединений клетки: белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот.
- **Микроэлементы** требуются микроорганизмам в малых (микрограммовых) количествах: **Mn, Na, Mo, Zn, Cu, Co** и другие элементы.
- Микроэлементы часто являются кофакторами ферментов, участвуют в катализе ферментативных реакций и поддержании структуры белков.

Углеродное питание.

- В зависимости от источника углерода, который микроорганизмы используют для конструктивного метаболизма, их делят на две группы: **автотрофы** и **гетеротрофы**.



АВТОТРОФЫ
(способны
синтезировать
органические вещества
из неорганических)



ГЕТЕРОТРОФЫ
(не способны
синтезировать
органическое вещество,
а питаются готовым)

- **Азотное питание.**
- Азот входит в состав компонентов микробной клетки – **белков и нуклеиновых кислот.**
- Подавляющее большинство микроорганизмов усваивают азот в форме **нитратов, солей аммония.**
- Многие микроорганизмы используют в качестве источников азота **органические соединения** - аминокислоты, пептиды или белки, а также некоторые другие азотсодержащие вещества.
- Некоторые прокариоты способны использовать **молекулярный азот** атмосферы.

- Источником **фосфора** являются соли фосфорной кислоты.
- Их вносят в составе естественных субстратов.
- Фосфор входит в состав **АТФ, АДФ, АМФ**, обеспечивая энергетический и конструктивный обмен.

- Состав питательной среды для каждого продуцента устанавливают экспериментально, путем изучения физиологии микроорганизмов.
- Питательные вещества попадают в клетку в виде **водных растворов**. Биодоступность веществ определяется их растворимостью в воде.

- **Прототрофные** микроорганизмы способны синтезировать все необходимые для них соединения и не нуждаются в факторах роста.
- Микроорганизмы, не способные самостоятельно синтезировать отдельные органические вещества - факторы роста (аминокислоты, азотистые основания, витамины), называются **ауксотрофными**.
- Примером природных ауксотрофных микроорганизмов являются **молочнокислые бактерии**.

- Микроорганизмы культивируют на разнообразных питательных средах.
- **Требования к питательной среде:**
- 1) Должна содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме;
- 2) иметь оптимальную влажность, чтобы вещества в ее составе находились в растворенном состоянии;
- 3) характеризоваться определенной вязкостью, кислотностью, быть сбалансированной по содержанию отдельных химических элементов, по возможности прозрачной;
- 4) быть стерильной.

- **По составу** питательные среды разделяют на **натуральные, синтетические и полусинтетические**
- **К натуральным** относятся такие среды сложного и неопределенного состава, как молоко, растительные соки, куриные эмбрионы, отвары или экстракты из природных субстратов (мяса, частей растений, почвы, навоза), пивное сусло и др.
- **Синтетическими** называют среды, состав которых точно известен - их готовят из химически чистых реактивов с использованием дистиллированной воды.
- **Полусинтетические** питательные среды содержат как отдельные химические вещества (углеводы, минеральные соли), так и субстраты неопределенного состава – дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, пивное сусло, экстракты растений и др.

- В настоящее время наиболее широко используемыми и коммерчески выгодными субстратами для культивирования микроорганизмов являются **крахмал** (преимущественно кукурузный), **меласса** и сырой **сахар**, **мука** зерновых культур (кукуруза, рис и пшеница).
- Парафины нефти, природный газ или нефтяной газ.
- Отходы гидролиза древесины.
- Отходы перерабатывающей промышленности **молочная сыворотка, послеспиртовая барда.**
- Спирты **метанол** и **этанол.**
- Растительная биомасса (содержит целлюлозу) требует предварительной обработки, её первоначально гидролизуют до более простых соединений.
- Отходы животноводства используют для получения биогаза.

- По консистенции среды бывают **жидкими** и **плотными** (твердыми).
- Для приготовления плотных сред к жидким питательным растворам добавляют вещества, которые придают им желеобразную консистенцию.
- Для получения плотных сред часто используют **агар** – это полисахарид сложного состава, получаемый из морских водорослей
- Агар добавляют к питательным растворам в концентрации 15-20 г/л.

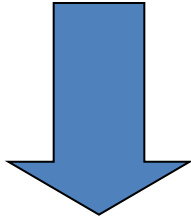
- Микроорганизмы можно выращивать **на поверхности** твердых или жидких питательных сред без перемешивания - такой способ называется методом **поверхностного культивирования**.
- Если микроорганизм выращивают в толще твердого субстрата, такой метод культивирования называется **твердофазным**.

- Твердофазное культивирование мицелия гриба вешенки на зерне и на субстратных блоках
-



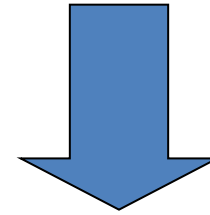
- При глубинном культивировании микроорганизмы выращивают на жидких питательных средах при перемешивании, как правило в колбах на **качалке** (шейкере) .
- При промышленном культивировании микроорганизмов в больших масштабах, т.е. в биотехнологических процессах, микроорганизмы, как правило, выращивают в специальных аппаратах – **ферментерах** на жидких питательных средах в условиях аэрации (т.е. снабжения кислородом) и перемешивания при помощи специальных мешалок.

По способу дыхания микроорганизмы подразделяют на две группы



Аэробные

(в процессе дыхания используют кислород для окисления органических вещества)



Анаэробные

(разлагают органические вещества без участия кислорода)

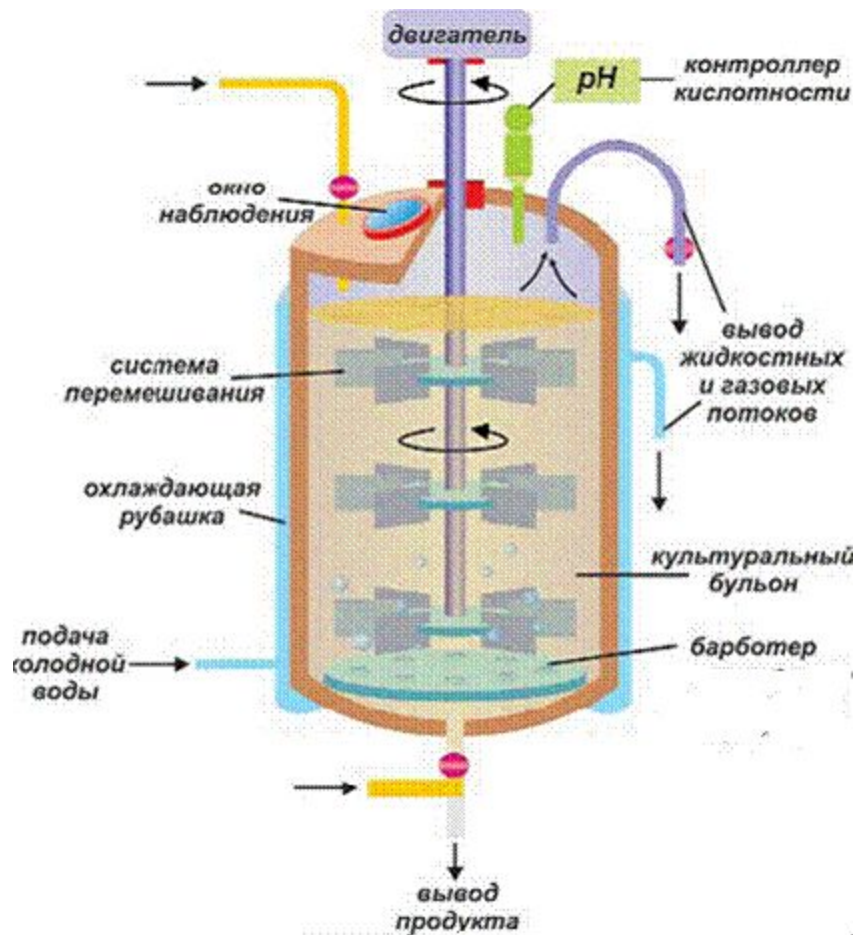
При культивировании микроорганизмов на стерильных питательных средах, нужно поддерживать оптимальные или благоприятные для них условия - температуру и рН среды.

- Для обеспечения необходимых условий протекания биотехнологических процессов используются ферментеры или биореакторы.
- Биореакторы варьируют от простых сосудов до сложных систем с различным уровнем компьютерного оснащения.



Биореактор должен обладать следующими системами:

- 1) перемешивания питательной среды;
- 2) аэрации среды, обеспечивающая доступ кислорода к клеткам;
- 3) теплообмена;
- 4) пеногашения;
- 5) стерилизации сред, аппаратуры и воздуха;
- 6) контроля и регулировки процесса.

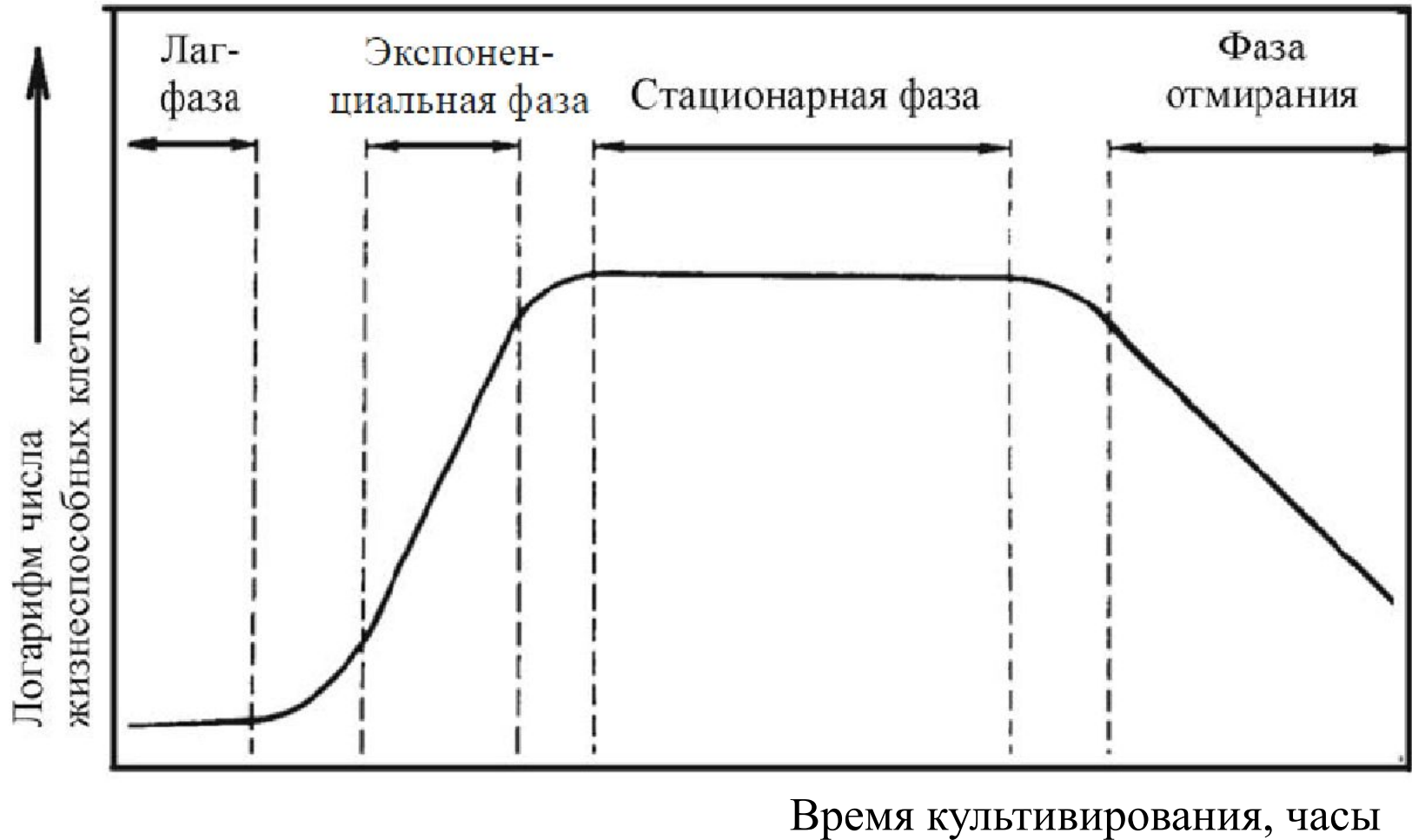


Устройство ферментера

<http://studopedia.org/14-79286.html>

- **Процессы культивирования микроорганизмов:**
- 1) по состоянию питательной среды или по основной фазе (поверхностные и глубинные);
- 2) по наличию или отсутствию перемешивания (динамические или статические);
- 3) по содержанию кислорода (на аэробные или анаэробные);
- 4) по способу действия (закрытые (чаще периодические) и открытые (чаще непрерывные));
- 5) по количеству ферментеров (одно-, дву- и многостадийные);
- 6) по способу управления (хеостатные, турбидостатные, оксистатные, рН-статные и другие);
- 7) по степени защищенности от посторонней микрофлоры;
- 8) по числу видов микроорганизмов.

Фазы роста бактериальной культуры

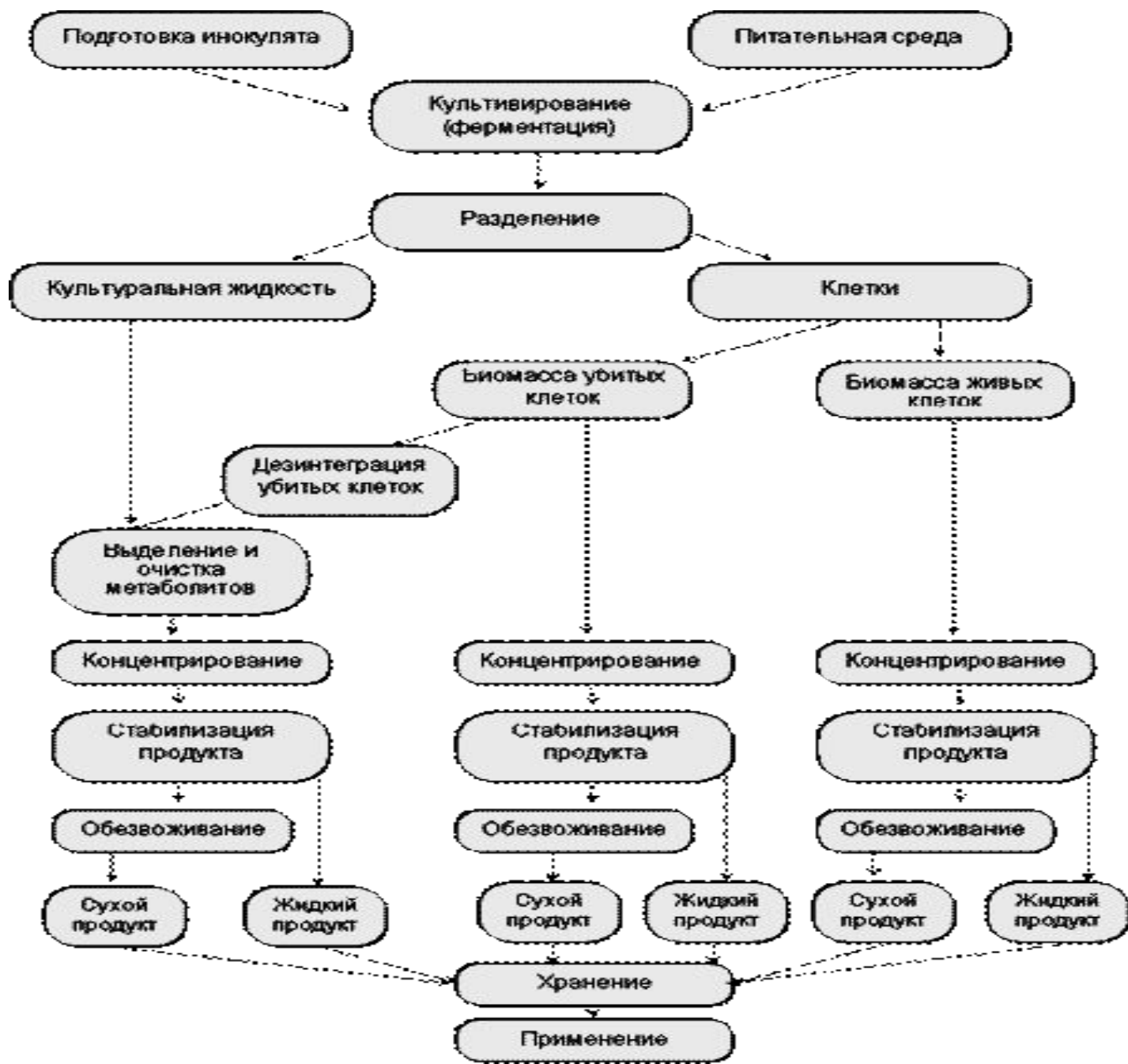


Биотехнологическое использование микроорганизмов

условно можно разбить на несколько **основных групп**:

- 1) получение живой или инактивированной **микробной биомассы** (производство пекарских, винных, кормовых дрожжей; вакцин, белково-витаминных концентратов, средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, микробных удобрений и т.д.);
- 2) получение **продуктов метаболизма** микроорганизмов (антибиотики, гормоны, аминокислоты, витамины, органические кислоты и т.д.);
- 3) получение **ферментов** микробного происхождения;
- 4) биотрансформация веществ (например, стероидов);
- 5) утилизация неприродных соединений.

- **5 стадий биотехнологического производства.**
- 1) Подготовка сырья.
- 2) Подготовка посевного материала.
- 3) Стадия ферментации, на которой происходит образование целевого продукта.
- 4) Выделение и очистка целевых продуктов.
- 5) Приготовление товарных форм продуктов.



- **Получение товарных форм биопрепаратов.**

1. Представляют собой жизнеспособные микроорганизмы (средства защиты растений, бактериальные удобрения, закваски для силосования кормов, и др.).

2. Представляют собой инактивированную биомассу клеток и продукты ее переработки (кормовые дрожжи).

3. Очищенные продукты метаболизма микроорганизмов (витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики, липиды, полисахариды и др.).

- **Преимущества** производства органических продуктов биотехнологическими способами перед химическими:
- 1. Химическими способами не могут быть синтезированы многие сложные органические молекулы (белки, антибиотики);
- 2. Более высокий выход целевого продукта;
- 3. Биологические системы работают при более низких температурах, близких к нейтральному значениям pH и т. д.;
- 4. Каталитические биологические реакции намного специфичнее, чем реакции химического катализа;
- 5. При биологических процессах образуются изомеры одного типа, а не их смесей, как это часто бывает в реакциях химического синтеза.

- Биологические способы в сравнении с химическими методами обладают рядом **недостатков**:
- 1. Возможно загрязнение посторонней микробиотой.
- 2. Необходимо выделять целевой продукт из смеси веществ.
- 3. Биотехнологические производства требуют больших количеств воды для приготовления питательной среды, которую в итоге необходимо удалять, сбрасывая в окружающую среду.
- 4. Биопроцессы обычно идут медленнее в сравнении со стандартными химическими процессами.

43. Генная инженерия. Методы клонирования генов. Векторные системы, используемые при клонировании генов.

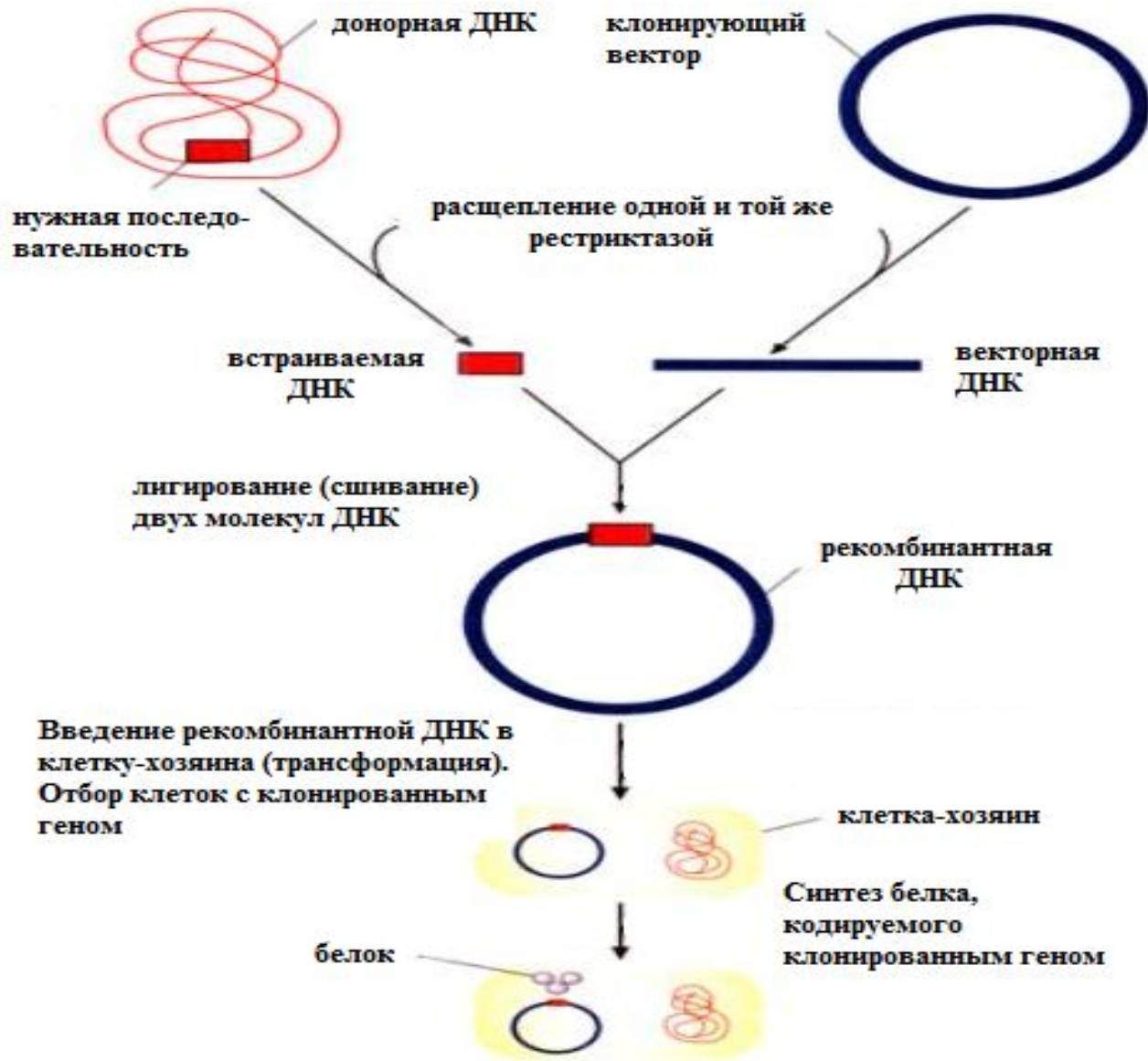
- **Генетическая инженерия** – технология получения новых комбинаций генетического материала путем проводимых *in vitro* манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций *генов* в реципиентный организм.
- В результате получают искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных или гибридных молекул ДНК.
- Генетическая инженерия является инструментом биотехнологии.

- **Первая рекомбинантная ДНК** получена в 1972 г. (П. Бергом с сотр.) и была составлена из фрагмента ДНК обезьяньего вируса ОВ40 и бактериофага λ dvgal с галактозным опероном *E. coli*.
- **Применение методов генетической инженерии:**
 - Фундаментальные исследования (структуры генов и геномов, механизмов их функционирования и регуляции).
 - Прикладные задачи (создание промышленных штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных, лекарственных препаратов и вакцин, генотерапия, эффективные диагностические методы).

- Технология рекомбинантных ДНК использует следующие **методы**:
- 1) **специфическое расщепление ДНК ферментами** - рестрицирующими нуклеазами, для выделения и манипуляции с отдельными генами;
- 2) **секвенирование (определение последовательности)** всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность;
- 3) **конструирование** рекомбинантной ДНК;
- 4) **гибридизация нуклеиновых кислот**, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основана на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- 5) **клонирование ДНК** - совокупность методов, использующихся для получения многочисленных копий гена/генов;
- 6) **введение рекомбинантной ДНК** в клетки или организмы.

- **Основные этапы решения генноинженерной задачи** следующие:
 - 1. Получение изолированного гена.
 - 2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
 - 3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
 - 4. Преобразование клеток организма.
 - 5. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

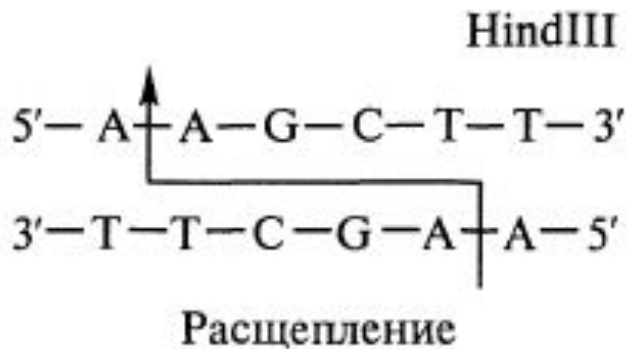
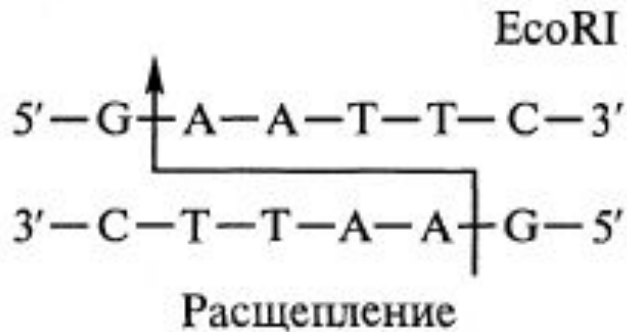
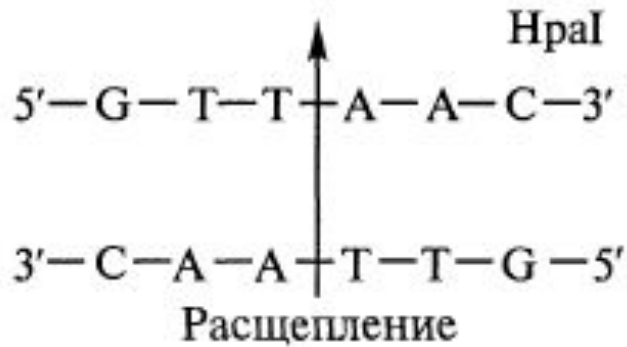
- **Схема молекулярного клонирования.**



- **Методы выделения генов.**
-
- Получение нужной последовательности – ДНК для клонирования возможно:
- 1) путем непосредственного расщепления геномной ДНК нужной **рестрикционной эндонуклеазой**,
- 2) химико-ферментативным синтезом,
- 3) обратной транскрипцией мРНК,
- 4) синтез ДНК методом ПЦР.

- **Ферменты генетической инженерии, используемые для манипуляций с фрагментами ДНК.**
- **Все ферменты нуклеинового обмена условно можно разделить на следующие группы:**
 - используемые для получения фрагментов ДНК (рестриктазы);
 - синтезирующие фрагменты ДНК на матрице РНК (ДНК-полимеразы, обратные транскриптазы (ревертазы), фосфатазы, полинуклеотидкиназы);
 - соединяющие фрагменты ДНК (ДНК-лигазы);
 - позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

- В генетической инженерии применяют **эндонуклеазы рестрикции** (рестриктазы) **II** типа.
- Они узнают определенные последовательности оснований в двухцепочечной молекуле ДНК и расщепляют обе цепи в определенном месте.
- Эндонуклеазы различных видов бактерий разрезают молекулы ДНК в разных участках, поэтому можно последовательно воздействовать на одни и те же молекулы, получая с каждым этапом все более мелкие фрагменты.



- Участки распознавания, образуемые рестриктазами: *Haemophilus parainfluenzae* (HpaI), *Escherichia coli* (EcoRI) и *Haemophilus influenzae* (HindIII).

- **Электрофорез ДНК** используют для первоначального разделения полученных в результате действия рестриктаз фрагментов ДНК.



<http://foxford.ru/wiki/biologiya/metody-molekulyarnoy-biologii-i-molekulyarnaya-biotehnologiya>

- Если нуклеотидная последовательность для конкретного гена уже известна, существует возможность обнаружить ее в разделенных электрофорезом фрагментах, используя **метод гибридизации ДНК**.
- **Гибридизация ДНК** - соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу.
- Одноцепочечная ДНК, используемая в качестве индикатора, называется ДНК-зонд. Она может содержать от 15 до 1000 нуклеотидов.
- При полной комплементарности объединение происходит легко и быстро, а при частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности.

- **Сшивание фрагментов ДНК**, содержащих нужные гены осуществляют двумя основными методами:
- а) по «липким» концам ферментом **ДНК-лигазой**, который формирует **фосфодиэфирную связь** между соседними нуклеотидами через 5'-фосфатную и 3'-гидроксильную группы.
- б) с помощью искусственно достроенных «липких» концов.
- Если у сшиваемого фрагмента **отсутствуют липкие концы**, их искусственно синтезируют ферментативным путем. Для этой цели применяют **линкеры** – короткие участки ДНК, имеющие липкие концы.

- **Клонирование ДНК** означает создание большого числа копий определенного ее фрагмента.
- За счет амплификации мы возможно получить фрагмент ДНК в достаточном для изучения количестве.
- Существует два **основных метода**:
- 1) использование быстро делящихся организмов (обычно бактерий *Escherichia coli* или дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*)
- 2) *in vitro* с помощью *полимеразной цепной реакции*. В отличие от репликации ДНК в клетках живых организмов, с помощью ПЦР амплифицируют сравнительно короткие участки ДНК (обычно, не более 3000 пар нуклеотидов).

- **Введение генов в состав векторов, создание гибридных ДНК.**
- Полученный тем или иным способом ген может обусловить синтез соответствующего продукта только в клетке, при условии, что он будет экспрессироваться (транскрипция, трансляция).
- Ген должен иметь возможность реплицироваться для того, чтобы все клетки в популяции имели его в своем составе и образовывали необходимое количество продукта.
- **Векторами** называют небольшие автономно реплицирующиеся молекулы ДНК, обеспечивающие проникновение в клетку и стабильное наследование чужеродной ДНК (генов).

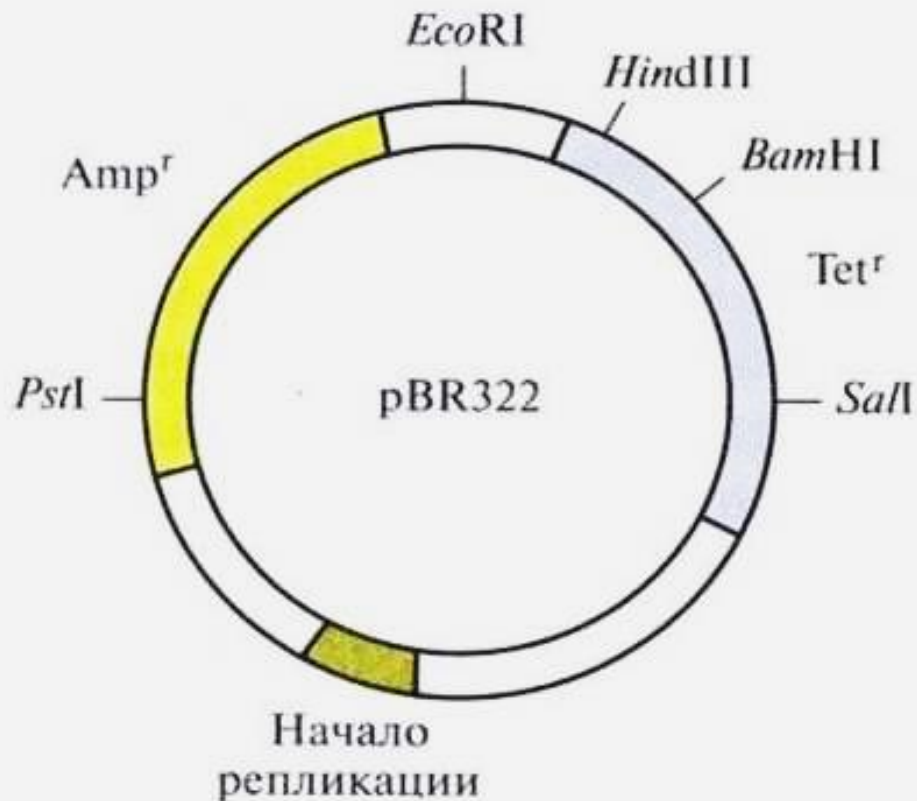
- Из большого количества систем вектор—хозяин, разработанных к настоящему времени, наибольшее распространение имеют те из них, где в роли хозяина выступают бактерии *E.coli*, а в роли вектора — плазмиды или фаги кишечной палочки.
- Обеспокоенность ученых в отношении непредсказуемых результатов клонирования эукариотических генов стимулировала поиск и создание ослабленных штаммов бактерий-хозяев.
- В частности, были получены «безопасные» штаммы *E.coli* К 12, отличающиеся рядом особенностей, исключающих «утечку» из лаборатории: потребность в особых факторах роста, отсутствующих в природных экологических нишах, хрупкая клеточная стенка, чувствительная к слабогипотоническим средам и др.

- **Классификация векторных молекул.**
- **Векторами для клонирования являются:**
- ***Плазмиды*** — кольцевые двухцепочечные экстрахромосомные самореплицирующиеся молекулы ДНК бактерий. В плаزمидах клонируют фрагменты ДНК до **10 т.п.н.**
- ***Фаги***. Первыми были разработаны векторы на основе фага λ *E. coli*. ДНК фага λ составляет примерно 50 т.п.н. Значительная часть (20т.п.н.) несущественна для размножения фага и может быть заменена на чужеродную ДНК. В фаге можно клонировать фрагмент ДНК до **20т.п.н.**

- ***Космиды*** – векторы, объединяющие в себе свойства плазмиды и фага. Созданы искусственно. Могут амплифицироваться в бактерии как плазмиды и упаковываться в фаговые головки. Могут включать вставку чужеродной ДНК до **40 т.п.н.**
- ***Фазмиды*** - гибридные векторы, способные развиваться и как фаг, и как плазида, поскольку содержат в составе все гены, необходимые для литического цикла, а также гены, нужные для репликации плазмиды. Емкость фазмид меньше, чем космид, и сопоставима с таковой для фаговых векторов.
- ***Искусственная дрожжевая хромосома*** (yeast artificial chromosome – YAC). Вектор разработан на основе ДНК дрожжей. Применяются для клонирования больших фрагментов ДНК (от 100 до 1000 т.п.н.) эукариот.

- **Характерные свойства векторов молекулярного клонирования**
- 1) вектор должен реплицироваться в клетке-хозяине;
- 2) вектор должен иметь один или несколько селективных маркеров (генов), позволяющих легко отличить клетки, несущие вектор, от нетрансформированных клеток;
- 3) вектор должен содержать максимальное число уникальных сайтов рестрикции, в которые может быть осуществлена вставка гетерологичной ДНК;
- 4) идеальный вектор должен дополнительно содержать маркер, который может быть активирован или инактивирован путем встраивания фрагментов гетерологичной ДНК;
- 5) вектор должен быть небольшим, так как эффективность трансформации клеток-хозяев снижается по мере увеличения размера плазмиды до 15 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) и выше;
- 6) вектор должен быть хорошо охарактеризован относительно числа генов и их расположения, а также сайтов рестрикции и нуклеотидной последовательности.

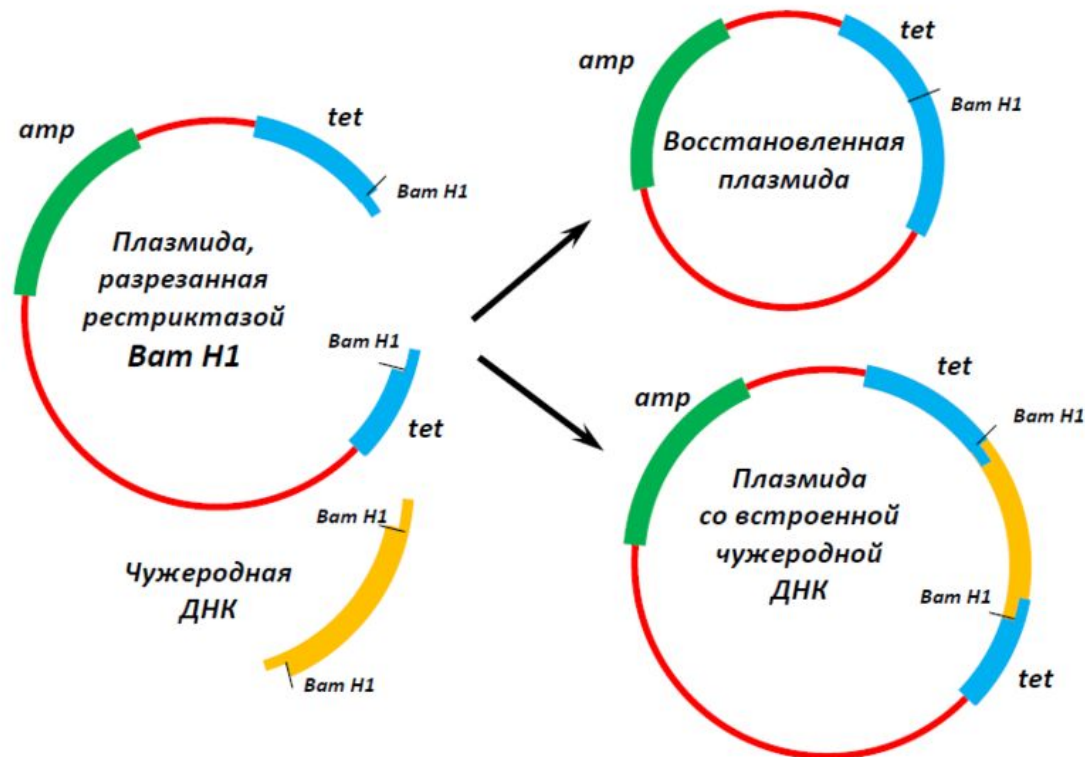
- **Плазмида pBR 322**
- Одна их наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования **pBR 322** создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*.
- Эта плазмида содержит **гены устойчивости** к двум антибиотикам: **ампициллину и тетрациклину**, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются **сайты рестрикции**.
- Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости к антибиотикам, то последний инактивируется.
- Успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов можно определить по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. Но при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику.
- Таким образом вектор дает возможность выявлять только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.



Генетическая карта плазмидного вектора pBR322. Гены устойчивости к тетрациклину (Tet^r) и ампициллину (Amp^r) содержат уникальные сайты узнавания для *HindIII*, *SalI*, *BamHI* и *PstI*. *EcoRI*-сайт расположен вне этих генов. Длина вектора – 4361 п. н.

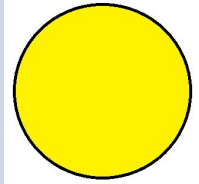
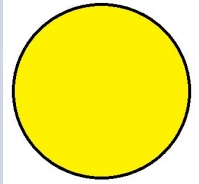
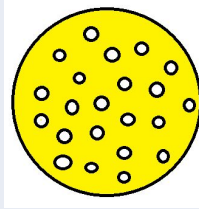
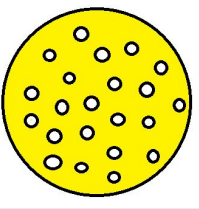
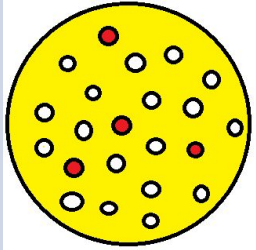
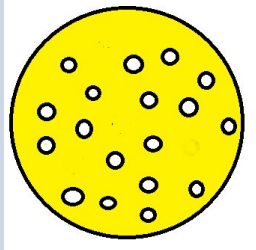
- В пределах последовательности определяющего устойчивость бактерий к тетрациклину гена имеются места узнавания для нескольких рестриктаз - HindIII, Bam HI и Sall.
- При обработке любой из этих рестриктаз ДНК плазмиды-вектора в пределах гена *tet* появятся «липкие концы», по которым и может произойти встраивание клонируемого фрагмента.
- Если встраивание действительно осуществляется, ген тетрациклиноустойчивости, оказывается «разорван» встроившимся фрагментом ДНК.
- Поэтому содержащие такую плазмиду бактерии уже не могут образовывать кодируемый геном Tet белок и размножаться на среде с тетрациклином.

- Два варианта взаимодействия плазмиды, разрезанной рестриктазой, с фрагментом чужеродной ДНК:
- 1) Плазмида восстанавливается в исходном виде, обеспечивая бактерии устойчивость к тетрациклину и ампициллину;
- 2) Чужеродная ДНК встраивается в плазмиду, блокируя тем самым ген устойчивости к тетрациклину.



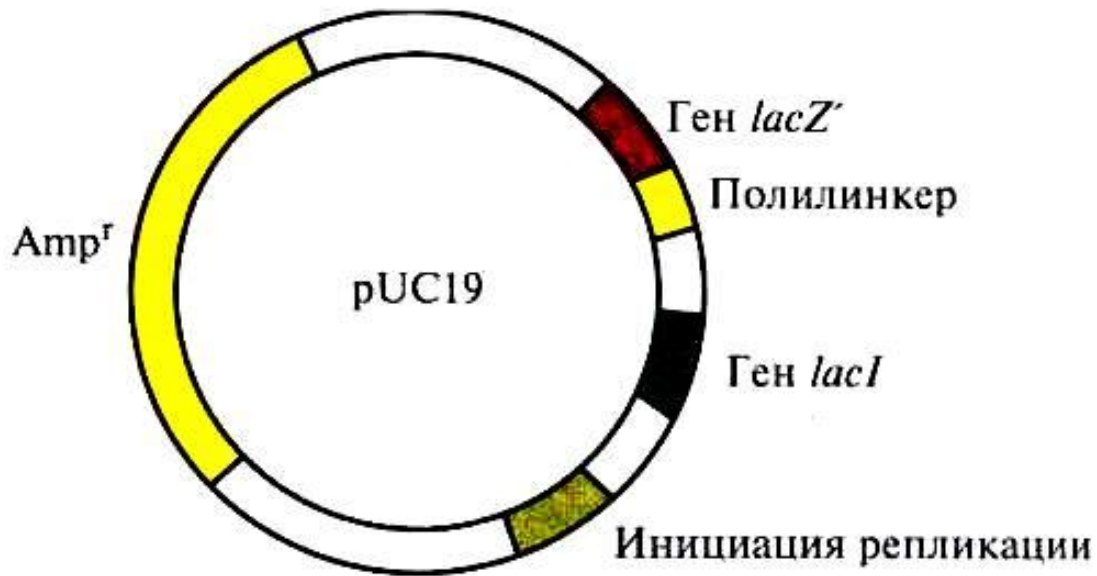
- **Введение рекомбинантной ДНК в клетку бактерии**
- 1) Плазмиды вводят в клетки *E. coli* путем трансформации. Для этого клетки обрабатываются ионами Ca^{2+} , что делает их мембраны проницаемыми для ДНК.
- 2) Полученные бактерии высевают на среду, содержащую ампициллин. В этой среде нормально **растут колонии бактерий, содержащие плазмиды**, остальные колонии угнетаются. По этому признаку можно отличить бактерии, содержащие плазмиды.
- 3) Колонии, содержащие плазмиды, перепечатываются на среду, содержащую тетрациклин. Поскольку чужеродная ДНК вклинивается внутрь гена *tet*, дезактивируя его, **колонии бактерий с модифицированными плазмидами угнетаются тетрациклином**.
- 4) В результате этих действий выделяются колонии *E. coli*, в плазмиды которых встроен участок чужеродной ДНК. Они высеваются в обычную среду для дальнейшего клонирования.

- Рост бактерий *E. coli* на питательных средах с добавлением антибиотиков Am или Tc.

Вариант	Среда с Am	Среда с Tc
Без плазмиды		
Колонии бактерий с плазмидой pBR 322 без вставки гена.		
Колонии бактерий с плазмидой, где чужеродная ДНК вставлена в ген устойчивости к тетрациклину, выросли только на среде с ампицилином. Выделены красным цветом.		

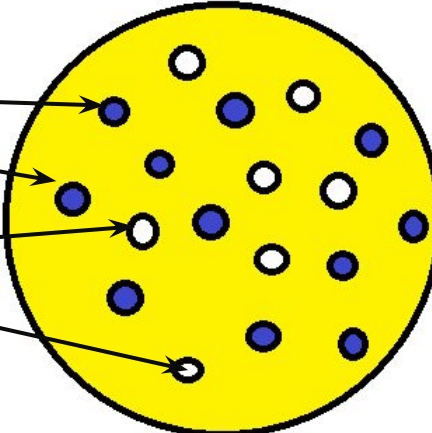
- **Плазмида pUC19**
- Плазмида **pUC19** является мультикопийной, стабильно наследуется, и способна к репликации в широком круге грамотрицательных бактерий.
Плазмида **pUC19** состоит из 2686 пар нуклеотидов и содержит:
 - 1) уникальные **сайты** узнавания для **рестриктаз** EcoR1, Sac1, Kpn1, Xma1, Sma1, BamH1, Xba1, Sal1, HincII, Acc1, Pst1, BspM1, Sph1 и HindIII, локализованные в полилинкере;
 - 2) ген устойчивости к **ампицилину**;
 - 3) сайт **инициации репликации**, функционирующий в *E.coli*;
 - 4) Часть генов **lac-оперона *E.coli*** .

- Генетическая карта плазмидного вектора **pUC19**.

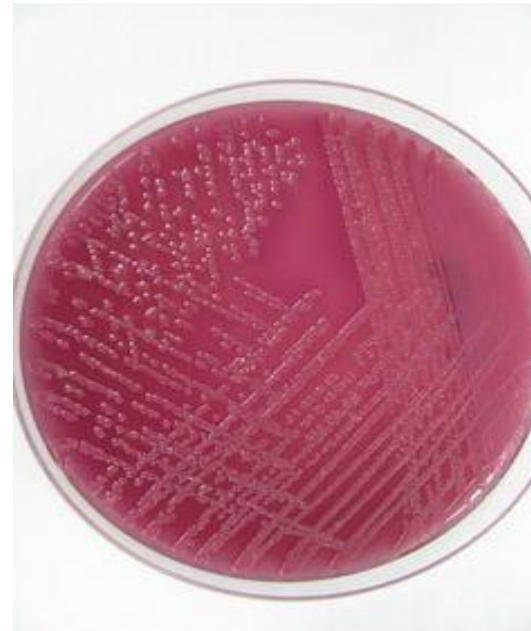
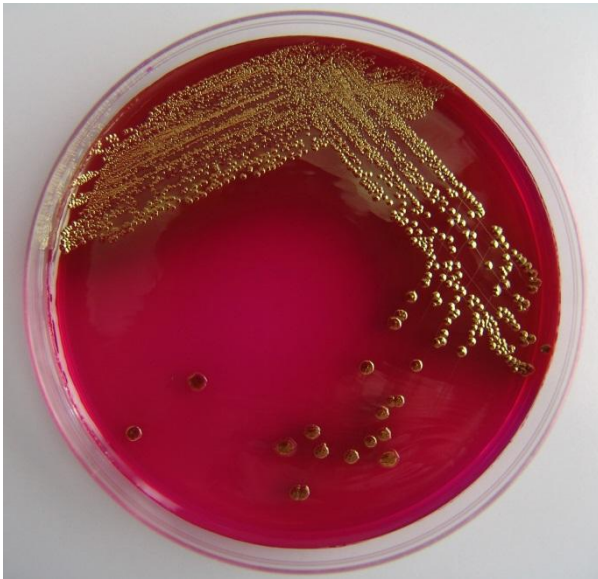


- В вектор вводят **часть lac-оперона *E.coli***, включающую:
- 1) **промотор**,
- 2) **оператор**,
- 3) **5'-кодирующую область гена lac Z** (кодирует N-концевую часть β -галактозидазы).
- 4) ген **LacI** контролирует синтез репрессора, который блокирует транскрипцию гена LacZ в отсутствии индуктора.
- В эту область встраивают **полилинкер**, содержащий несколько **сайтов рестрикции** для разных нуклеаз.
- Этот **вектор** переносят в **мутантный штамм *E.coli***, в хромосоме которого есть только гены **C-концевой части лактозного оперона**.
- Если в **полилинкере отсутствует вставка**, такой векторный генетический элемент детерминирует синтез **N-концевой части**, которая вместе с **C-концевой частью гена** бактерии образует **активную β -галактозидазу**.

- Продукт гена **lacZ** - **β -галактозидаза**. Катализирует **расщепление лактозы** на глюкозу и галактозу. Определяется по специфической ферментативной активности.
- В агаризованную питательную среду, на которой выращивают *E.coli*, добавляют 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид (обозначают **X-Gal**). Данное соединение бесцветно.
- При его гидролизе β -галактозидазой образуется ярко-синий 5-бром-4-хлориндиго.
- **Колонии *E. coli* в присутствии X-Gal окрашиваются:**

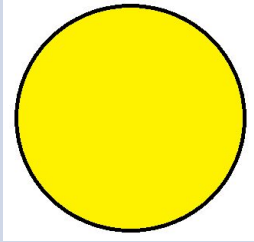
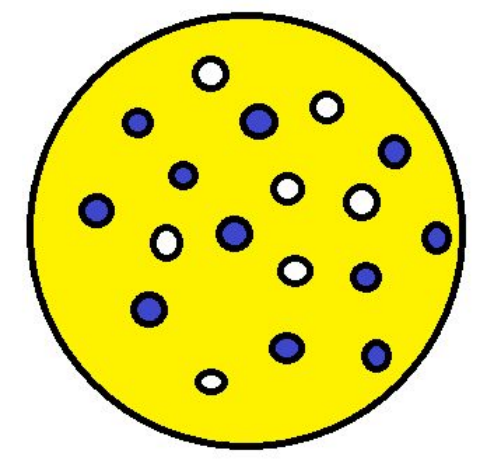
- **lacZ⁺ - в синий цвет,**
 - **мутантные lacZ⁻ - белые.**
- 
- The diagram shows a circular yellow agar plate with numerous bacterial colonies. The colonies are represented by small circles, some of which are blue and some are white. Arrows from the text point to these colonies: two arrows point to blue colonies, and three arrows point to white colonies.

- Отбирать колонии бактерий, способные утилизировать лактозу, можно на питательной среде Эндо.
- Колонии *E. coli* в присутствии окрашиваются:
- **lacZ⁺** - фиолетовые с металлическим блеском,
- мутантные **lacZ⁻** - розовые.



- Если в клетки бактерий попала **плазмида без вставки**, то:
 - 1) клетки имеют **ген устойчивости к ампициллину (Amp)**;
 - 2) синтезируется активный фермент **β -галактозидаза**, колонии на среде с хромогенным субстратом **X-Gal** окрашены в **синий цвет**.
 - 3) на среде **EMB** с лактозой колонии будут иметь **фиолетовую окраску с металлическим блеском**.
- **Клетки бактерий, несущие рекомбинантные плазмиды**, в которых в состав полилинкера встроена чужеродная ДНК:
 - 1) клетки имеют **ген устойчивости к ампициллину (Amp)**;
 - 2) не синтезируется фермент **β -галактозидаза**, колонии на среде с хромогенным субстратом **X-Gal** не окрашены.
 - 3) на среде **EMB** с лактозой колонии будут иметь **розовую окраску**.

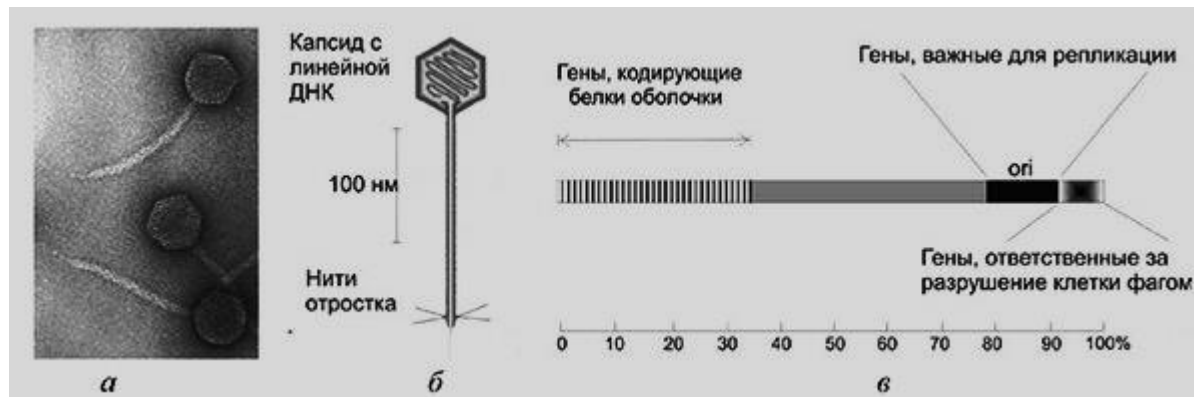
- Рост бактерий *E. coli* на питательных средах с добавлением антибиотика Am и субстрата X-Gal.

Вариант	Вид колоний
<p>Без плазмиды на среде с Am нет роста</p>	
<p>Колонии бактерий с плазмидой pUC19 без вставки гена – голубые (lacZ⁺), а где чужеродная ДНК вставлена в 5'-кодирующую область гена lac Z, имеют белый цвет (lacZ⁻).</p>	

- **Недостаток плазмидных векторов** - в снижении числа копий на клетку при увеличении размера гибридной плазмиды.
- В результате клонирование фрагментов ДНК, превышающих 10 т. п. н., становится малоэффективным.
- Для клонирования крупных фрагментов ДНК используют фаговые векторы, космиды и фазмиды.

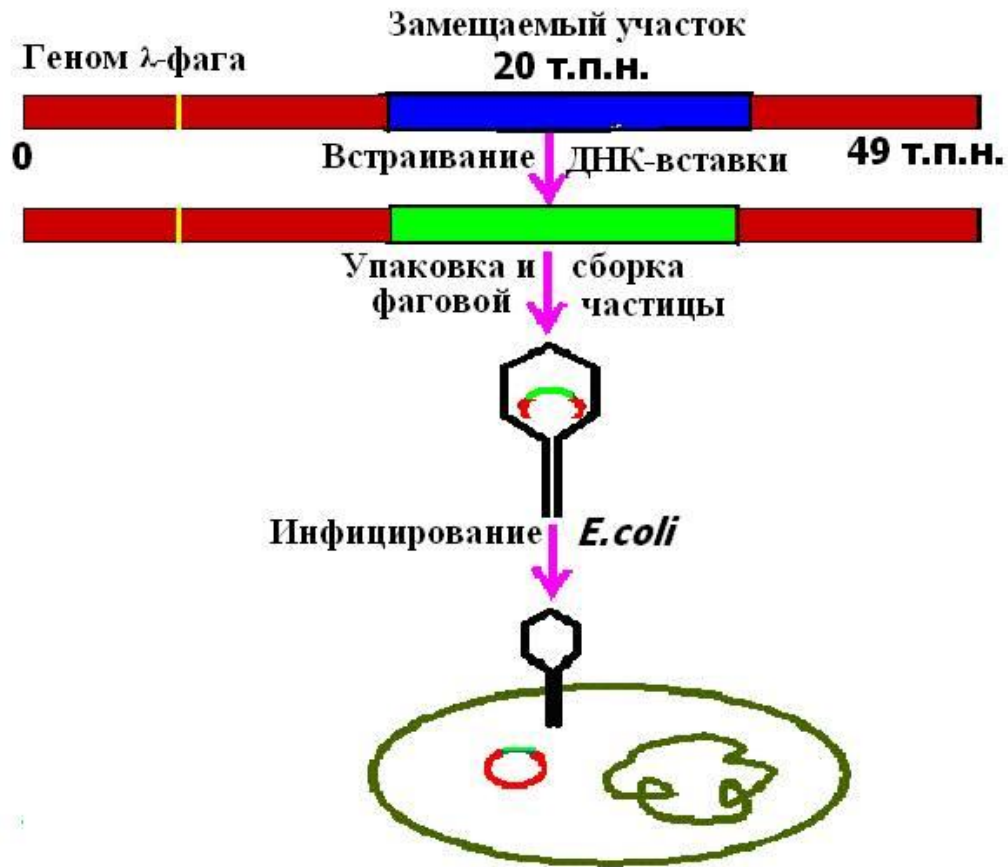
- **Фаговые векторы.**
- При использовании фаговых векторов жизнеспособным продуктом, содержащим рекомбинантную ДНК, является не популяция клеток, как в случае с плазмидными векторами, а **популяция фаговых частиц.**
- Фаговые векторы более эффективны, чем плазмидные, при клонировании крупных вставок.
- Самыми распространенными для кишечной палочки являются векторы, сконструированные на основе **фагов λ и M13.**

- Важными для **конструирования векторов на основе фага λ** являются:
- 1) вся центральная часть (более 1/3 генома) не существенна для литического цикла, а нужна только для установления лизогенного состояния. Ее можно заместить на чужеродную ДНК, и при этом фаг сохранит способность лизировать клетки.
- 2) для успешной упаковки ДНК в головки фага требуется, чтобы ее длина была **более 38 т. п. н., но менее 52 т. п. н.**



- **Вектора на основе фага λ содержат сайты рестрикции для Eco RI, ограничивающие участок генома, не нужный для литического цикла.**
- **При воздействии рестриктазой Eco RI на ДНК такого вектора образуется 3 фрагмента:**
- **L-фрагмент (левое плечо) содержит информацию о головке и отростке фага;**
- **R-фрагмент (правое плечо) – о репликации ДНК и лизисе;**
- **I/E-фрагмент (средний фрагмент) – о процессах интеграции и исключения (этот фрагмент замещают вставкой).**
- **Концевые фрагменты L и R (содержат гены, необходимые для литического цикла) смешивают с чужеродной ДНК, обработанной Eco RI, и получают гибридные молекулы, у которых центральная часть представлена вставочным фрагментом.**

- Введение ДНК в вектор на основе фага λ .



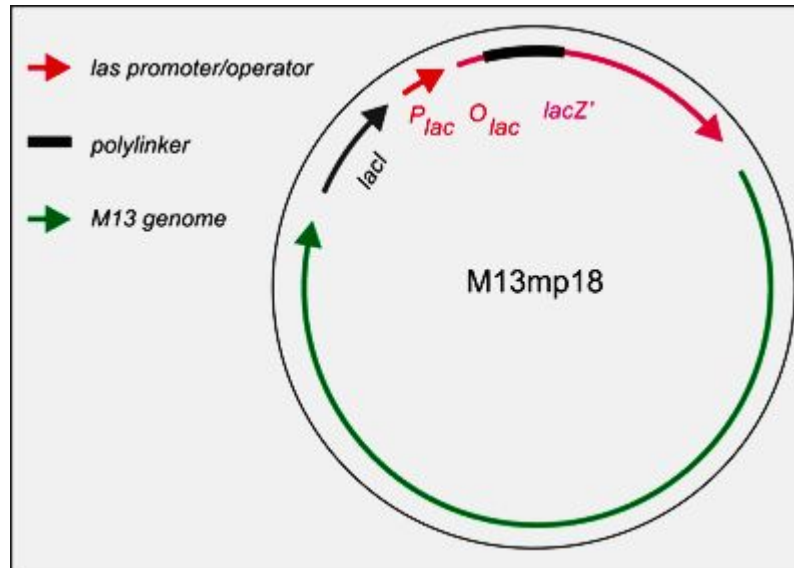
- **Полученные гибридные молекулы упаковывают в головки фага λ in vitro** в смеси бесклеточных экстрактов двух штаммов *E. coli*, лизогенных по мутантным бактериофагам λ с разными дефектами.
- 1) один из которых имеет повреждение в гене, ответственном за процесс упаковки ДНК в головку,
- 2) второй — за синтез отдельных белков головки.
- Объединение бесклеточных лизатов обоих штаммов *E. coli* приводит к комплементации недостающих функций с помощью соответствующих белков дикого типа.
- Такие фаги не способны вызвать литический цикл, но **обеспечивают накопление в клетках большого количества промежуточных продуктов, необходимых для сборки фаговых частиц: пустых головок, хвостовых отростков, ферментов, необходимых для сборки.**

- Если экстракты таких клеток смешать с векторной ДНК, содержащей вставки определенной величины, произойдет их упаковка в головки фага и сформируются зрелые фаговые частицы.
- На следующем этапе этими частицами инфицируют чувствительные клетки и получают потомство фагов с клонированными ДНК.
- В составе векторов на основе фага λ можно клонировать фрагменты длиной до **15 т. п. н.**
- Для поиска рекомбинантов используют ДНК-зонды или иммунологические методы.
- Векторы на основе бактериофага λ удобны для создания клонотек, но на таких векторах сложно проводить тонкие манипуляции с клонированными генами.

- **Нитевидные фаги M13, fd, f1** содержат молекулу кольцевой одноцепочечной ДНК. Когда они адсорбируются на половых ворсинках *E. coli*, одноцепочечная фаговая ДНК проникает в цитоплазму клетки, где достраивается вторая цепь.
- ДНК фага реплицируется, достигая 200-300 копий на клетку. Двухцепочечная репликативная форма фага похожа на плазмиду.
- Скорость роста зараженных фагом клеток *E. coli* снижается. Образующиеся при инфекции фаговые частицы постоянно секретируются из клеток бактерий без их разрушения.

- У фага M13 есть межгенная область размером 500 п.н., которую можно изменить без нарушения жизнеспособности фага.
- Конструирование векторных нитевидных фагов включает введение в геном:
 - 1) селективных маркеров - N-концевую часть гена β -галактозидазы E. coli;
 - 2) полилинкера с участками расщепления определенными рестриктазами.
- При использовании таких векторов частицы зрелого фага в составе вектора содержат **клонированный фрагмент ДНК в одноцепочечной форме**, который может быть использован для секвенирования последовательности ДНК.

- **Вектор на основе фага М13** включает:
- 1) полилинкер с сайтами для рестриктаз.
- 2) N-концевую часть гена β -галактозидазы *E. coli*.



Отбор рекомбинантных фагов ведут на средах с X-Gal. При инфекции клеток интактным вектором образуются колонии синего цвета, а рекомбинанты будут бесцветные.

- ***Космиды.***
- *Космиды* – плазмидные вектора, в которые встроен **cos-участок (липкие концы) генома фага λ** , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу.
- После проникновения фаговых частиц в клетку, происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.
- Благодаря cos-сайтам эти векторы могут быть **введены в клетку** не с помощью трансформации, а путем **инфекции**, в результате возрастает эффективность получения рекомбинантных клеток в 100 и более раз.
- В космидных векторах можно клонировать крупные фрагменты ДНК размером **33—49 т. п. н.** Их можно использовать для создания **клонотек эукариотических геномов.**

- *Фазмиды.*
- Это тоже гибридные векторы, **способные развиваться и как фаг, и как плаزمид**, поскольку содержат в составе все гены, необходимые для литического цикла, а также гены, нужные для репликации плазмиды.
- Емкость фазмид меньше, чем космид, и сопоставима с таковой для фаговых векторов.
- **Преимуществом фазмид** является то, что **размер их ДНК слишком мал**, чтобы мономер мог упаковаться в капсид фага λ , в то же время слишком велик, чтобы произошла упаковка димера вектора. Поэтому **негативные колонии способны формировать только рекомбинантные фазмиды**, поскольку их размеры соответствуют емкости головки фага λ .
- .

- Вставка в фазмиду чужеродного фрагмента ДНК осуществляется по сайтам рестрикции. После этого гибридные фазмиды упаковывают в капсиды *in vitro*.
- При инфицировании чувствительных клеток фазмиды обуславливают литический цикл и формируют **бляшки на газоне тест-культуры**.
- Часто в составе фазмид используют мутантные гены, определяющие структуру **температурочувствительного белка-репрессора**, который инактивируется при повышенной температуре.
- В этом случае фазмида ведет себя как плазида при низкой температуре, а при повышении температуры на несколько градусов индуцируется к литическому циклу.

- **Челночные векторы** способны к репликации в разных клетках-хозяевах, что обеспечивается введением в вектор **дополнительных областей начала репликации (ori)**, а также генов, требуемых для репликации и не поставляемых хозяйскими клетками.
- Одни из челночных векторов способны поддерживаться в клетках разных прокариот, другие — в клетках некоторых прокариот и эукариот (дрожжей, растений, животных).

- **Основой векторов для клонирования генов животных чаще всего является геном вируса обезьян SV40.**
- **Для растительных клеток, которые не содержат собственных плазмид, основой векторов часто служат геномы вирусов растений, а также бактериальная плаزمиды рТi, которая опосредует перенос сегментов плазмидной ДНК в геномы различных двудольных растений и индуцирует образование опухолей (корончатых галлов). Семейство плазмид рТi выявлено в грамотрицательных бактериях *Agrobacterium tumefaciens***

- **Способы прямого введения генов в клетку**
- Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:
- *Трансфекция*
- *Микроинъекция*
- *Электропорация*
- *Метод «мини-клеток»*
- *Упаковка в липосомы*
- *Электронная пушка*

- **Методы выявления клонов с рекомбинантными ДНК.**
- Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличить трансформированные клетки:
- 1. *Селективные гены*, отвечающие за устойчивость к антибиотикам (ампицилину, тетрациклину, канамицину, неомицину и др.). Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и т.д. Основным принцип работы такого маркера – **способность трансформированных клеток расти на селективной питательной среде, с добавкой определенных веществ, ингибирующих рост и деление нетрансформированных, нормальных клеток.**

- 2. *Репортерные гены*, кодирующие нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано.
- Чаще всего в качестве **репортерных** используются гены **β -глюкуронидазы (GUS)**, **зеленого флюоресцентного белка (GFP)**, **люциферазы (LUC)**, **хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (CAT)**.

- **Геномные библиотеки** представляют собой собрание генов и последовательностей ДНК какого-то организма. Их получают обычно с помощью векторов, сконструированных на основе бактериофага λ или космид. Эти векторы характеризуются большой емкостью, что позволяет уменьшить число клонов в клонотеке.
- **Библиотека кДНК** представлена набором клонов, содержащих двухнитевые ДНК-копии всех мРНК клетки. Для создания этих клонотек чаще используют плазмидные или фаговые (на основе фага λ) векторы.

- **Достижения и перспективы современной биотехнологии.**

- **Основными направлениями (задачами) биотехнологии являются:**
- 1. производство биологически-активных веществ и лекарственных препаратов для **медицины** (антибиотиков, гормонов, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител);
- 2. получение кормовых добавок и биологически-активных веществ для повышения продуктивности **животноводства** (кормового белка, аминокислот, витаминов, ветеринарных препаратов), средств профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных;
- 3. получение хозяйственно-ценных продуктов для использования в **пищевой, химической, микробиологической** и других отраслях промышленности;

- 4. разработка технологий **борьбы с загрязнениями окружающей среды** (очистка сточных вод и загрязненных почв), технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов;
- 5. разработка микробиологических **средств защиты растений** от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений;
- 6. создание новых полезных **штаммов микроорганизмов, сортов растений и пород животных.**

Сегменты мировой биотехнологической индустрии



Тенденции развития биотехнологии за рубежом

Годовой оборот мировой биоиндустрии составляет в настоящее время более 160 млрд. долл. США.

Крупнейшие биотехнологические рынки в мире:

- 1 место - США - (половина мирового объема биотехнологической продукции)
- 2 место - Азиатско-Тихоокеанский регион (наиболее динамично развивают биотехнологии Австралия, Китай, Индия и Япония)
- 3 место – Европа.

- Основные продукты, которые получают при помощи биотехнологии.

Медицина	Ветеринария и сельское хозяйство	Пищевая промышленность	Химическая промышленность и энергетика
Антибиотики	Кормовой белок	Аминокислоты	Ацетон
Витамины	Кормовые антибиотики	Пищевой белок	Бутанол
Аминокислоты	Витамины	Ферменты	Этилен
Гормоны	Гормоны	Этанол	Биогаз
Компоненты крови	Инсектициды		Спирты
Диагностические препараты	Биологические средства защиты растений		
Нуклеиновые кислоты			
Противоопухолевые препараты			

- **Пищевая промышленность.**

- 1) Использование микроорганизмов в качестве источника белка и витаминов при производстве пищевых продуктов.
- *Производство микробного белка* в настоящее время используется для получения кормов для сельскохозяйственных животных. Микроорганизмы можно выращивать на различных питательных средах: на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, вино-водочной, деревообрабатывающей промышленности.

- **Промышленное культивирование съедобных грибов.**



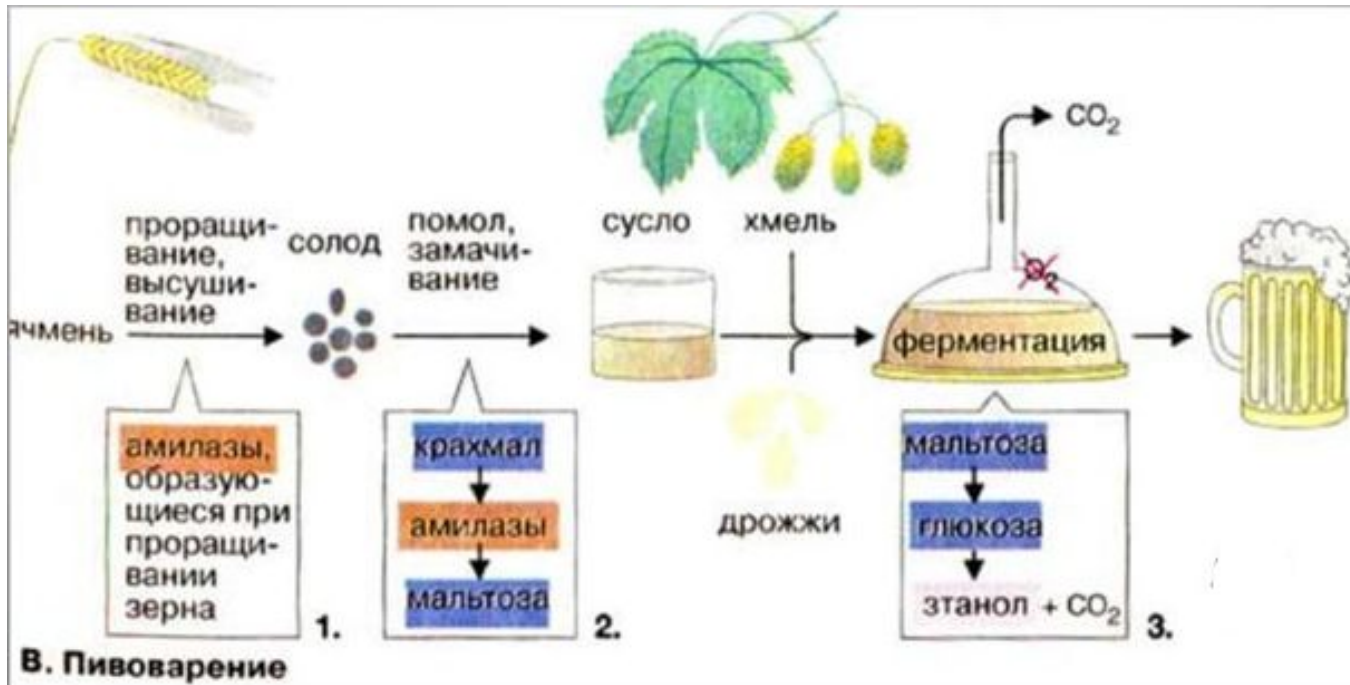
- 2) Получение кисломолочных продуктов.

Продукт	Молочнокислые бактерии
Сметана, простокваша	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Leuconostoc lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Кефир	<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Йогурт	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Сыр швейцарский	<i>Lactobacillus helveticus</i>



- **Получение алкогольных напитков.**
- Получение напитков путем спиртового брожения — одно из древнейших бродильных производств. Первыми из таких напитков были, видимо, вино и пиво.
- Алкогольные напитки получают путем сбраживания сахар-содержащего сырья, в результате которого образуются спирт и углекислый газ.
- Сбраживание осуществляется дрожжами рода *Saccharomyces*.
- В одних случаях используется природный сахар (например, содержащийся в винограде, из которого делают вино), в других сахара получают из крахмала (например, при переработке зерновых культур в пивоварении). При этом зерно осаживают ферментами.

- Основным сырьем для пивоваренного производства служат ячмень, хмель, вода, дрожжи.



- В пищевой промышленности также применяются такие продукты биотехнологии, как:
- Ферменты (амилазы, протеазы).
- Витамины.
- Аминокислоты.
- Органические кислоты (уксусная, лимонная).
- Полисахариды (загустители).

• **Биотехнология и медицина.**

- **Антибиотики** — самый большой класс фармацевтических соединений, синтез которых осуществляется микробными клетками.
- В штаммах дикого типа количество антибиотика составляло нескольких миллиграммов на литр.
- В результате последовательных циклов мутагенеза и селекции получены штаммы-продуценты, в которых выход антибиотика - до 20 г/л.
- В 1980 г. мировое производство антибиотиков составляло примерно 25000 т, из них 17000 т — пенициллины, 5000 т — тетрациклины, 1200 т — цефалоспорины и 800 т — эритромицины.
- В связи с распространением у большого числа патогенных бактерий устойчивости к наиболее широко применяемым антибиотикам исследователи стали получать химически модифицированные антибиотики.

- Получение **биологически активных веществ**:
- 1) витаминов.
- 2) аминокислот.
- 3) алколоидов.
- **Ферменты для медицины**:
- сахаролитические ферменты: **α -амилаза** (входит в состав лечебного препарата «Фестал»), **β -галактозидаза** (используется при лактазной недостаточности).
- **Террилитин** (протеолитический фермент), рекомендуется при лечении гнойных ран, ожогов, трофических язв. **Стрептокиназа** (фибринолитический фермент), **урокиназа** (протеолитический фермент) - используются при тромбозах.
- **Трипсин, химотрипсин** (протеолитические ферменты) используются для рассасывания рубцов и спаек.
- **Пепсин** (протеолитический фермент), используется при расстройствах пищеварения.

- **Получение генноинженерных препаратов.**
- **Биотехнология рекомбинантных белков** охватывает производство:
- **гормонов (инсулина, соматотропина),**
- **интерферонов** (неспецифическая защита клетки от вирусов и злокачественных образований),
- **вакцин,**
- **пептидных факторов роста тканей,**
- На первом месте среди них по значению стоит рекомбинантный инсулин, составляющий около 30% от всего рынка рекомбинантной продукции.

- **Получение рекомбинантных гормонов.**
- Ранее **инсулин** получали из клеток поджелудочной железы животных, поэтому стоимость его была очень высока и он был недоступен большому количеству диабетиков. Применение инсулина животных у людей давало побочные эффекты.
- В 1978 году исследователи из компании «Genentec» впервые получили рекомбинантный инсулин в специально сконструированном штамме кишечной палочки (*Escherichia coli*).
- Из 1000 литров культуральной жидкости можно получать до 200 г гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы.

- **Соматотропин** - гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости.
- Ранее соматотропин получали из трупного материала, доступные количества гормона были ограничены.
- Гормон, получаемый этим способом, был неоднороден и мог содержать медленно развивающиеся вирусы.
- Компания «Genentec» в 1980 году разработала технологию производства соматотропина с помощью бактерий, который был лишен перечисленных недостатков.

- В последнее время, с развитием технологий рекомбинантных ДНК, появилась возможность создать новое поколение **вакцин**.
- 1) Из патогенного микроорганизма искусственно убирают гены, ответственные за вирулентность. Способность вызывать иммунный ответ при этом сохраняется. Такой микроорганизм можно использовать в качестве живой вакцины.
- 2) Из патогенного организма выделяют гены, кодирующие белки, которые вызывают иммунный ответ. Эти гены вводят в клетки непатогенного организма (например, кишечной палочки). Такие бактерии вызывают иммунный ответ в организме человека или животного, но не вызывают заболевания.
- В настоящее время созданы генно-инженерные вакцины против ряда вирусных и бактериальных заболеваний.

- Для восстановления нормальной микробиоты назначаются препараты **пробиотики** (эубиотики), полученные из лиофильно высушенных живых бактерий, представителей нормальной микробиоты кишечника – бифидобактерий, кишечной палочки, лактобактерий и других
- Сегодня наиболее широко известны следующие продукты пробиотиков:
 - - колибактерин
 - - бифидумбактерин
 - - лактобактерин
 - - бификол (смесь коли и бифидумбактерина)
 - - ацилакт
- **Применение пробиотиков** при острых кишечных инфекциях, длительных кишечных дисфункциях.

- **Диагностика заболеваний**
- Различают два основных метода молекулярной диагностики:
- 1) **иммунодиагностика**, основанная на сродстве антитела к антигену,
- 2) **ДНК-диагностика**, основанная на гибридизации нуклеиновых кислот (спаривании комплементарных фрагментов ДНК) и ПЦР.

- **Создание гибридом** – клеток, способных производить высокоспецифичные антитела.
- Гибридомы получают путем слияния клетки В-лимфоцита и опухолевой клетки. В результате гибридомы сочетают в себе свойство лимфоцита производить определенные антитела и свойство опухолевой клетки активно делиться.
- Такие клетки можно поддерживать длительное время в культуре и получать моноклональные антитела к одному антигену.
- Высокая специфичность антител в отношении антигена позволяет их использовать для идентификации различных веществ.
- Наиболее широко используются в медицинской диагностике.

Изучение генома человека имеет огромное значение в области биомедицинских исследований и клинической медицины. Каждое заболевание имеет генетический компонент.

Проект геном человека (1990-2003) выполнялся с целью определения последовательности нуклеотидов, которые составляют ДНК, чтобы идентифицировать 20-25 тыс. генов в человеческом геноме.

Основной объём секвенирования был выполнен в университетах и исследовательских центрах США, Канады и Великобритании.

В 2003 г. был опубликован окончательный вариант полной последовательности генома человека. До сих пор некоторые элементы генома не поддаются секвенированию современными технологиями.

С результатами секвенирования генома человека связаны надежды на возможность диагностики и лечения генетических заболеваний.

Генной терапией называется генетическая инженерия соматических клеток человека, направленная на исправление генетического дефекта, вызывающего заболевание.

Коррекция специфического заболевания осуществляется путем введения в дефектные соматические клетки нормальных экспрессирующихся генов.

В 1990 г. в США предпринята первая попытка генотерапии для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИД) у трехлетней девочки Ашанти де Силва.

Это заболевание вызывается мутацией в гене, кодирующем аденозанаденилазу (АДА). Дефицит этого фермента способствует накоплению в крови аденозина и дезоксиаденозина, токсическое действие которых приводит к гибели В- и Т-лимфоцитов периферической крови и иммунодефициту.

Через 4 года после начала лечения у ребенка наблюдалась экспрессия нормально функционирующей АДА и облегчение симптомов ТКИД, что позволило ей покинуть стерильную камеру и жить нормальной жизнью.

• **Сельское хозяйство**

- В настоящее время в некоторых странах налажено производство **белка одноклеточных организмов**.
- Для этого используют многие одноклеточные организмы – бактерии, дрожжи, грибы, водоросли.
- Биомасса таких микроорганизмов может содержать биологически активные соединения: витамины группы В, β-каротин.

- **Производство белка одноклеточных организмов**
- *БВК* – микробиологический белок для кормления животных. В странах СНГ производили свыше 1 млн. т/год, т.е. 60% продукции, выпускалось на основе парафинов нефти, а 40% - на основе гидролизатов древесины.
- Некоторые отходы пищевого или сельскохозяйственного производства (например, сыворотка, целлюлозные отходы) могут служить субстратом при культивировании микроорганизмов.
- На отходе производства спирта - зерновой послеспиртовой барде выращивают дрожжи родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*.
- В результате получается биомасса дрожжей, содержащая 45-55% протеина в готовом продукте.

- Такие технологические процессы экономически выгодны при отсутствии соевого белка для кормления животных. По содержанию незаменимых аминокислот и витаминов дрожжевая масса не уступает, а иногда превосходит соевые белки. Добавка БВК в корма экономит фуражное зерно и увеличивает привесы животных.
- К сожалению, вследствие относительной дороговизны получаемых продуктов производство БОО оказалось экономически нецелесообразным.
- Технологичность этого процесса может быть оптимизирована путем введения генетически модифицированных микроорганизмов применительно к виду перерабатываемых отходов.

- **Технология кормового препарата витамина В₁₂**
- **Витамин В₁₂** (цианокобаламин) кобальтсодержащее биологически активное вещество. Имеет самую сложную по сравнению с другими витаминами химическую структуру, основой которой является корриновое кольцо.
- Организм животных (и человека) не способен к самостоятельному синтезу витамина В₁₂.
- Его продуцируют микроорганизмы, прежде всего бактерии, в том числе микробиота кишечника.
- Дефицит витамина В₁₂ является причиной некоторых видов анемий.

- **Экологическое растениеводство**

БИОпрепараты

```
graph TD; A[БИОпрепараты] --> B[препараты для защиты растений от болезней, вредителей и сорняков (биофунгициды, биоинсектициды, биогербициды)]; A --> C[бактериальные удобрения, на основе азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов];
```

препараты для защиты растений от болезней, вредителей и сорняков (биофунгициды, биоинсектициды, биогербициды)

бактериальные удобрения, на основе азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов

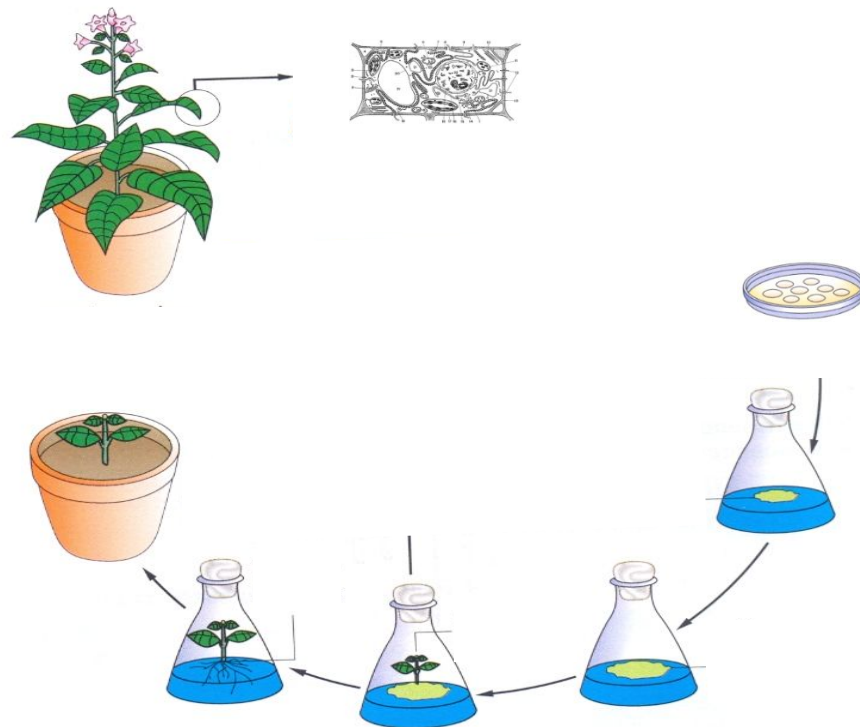
- **Биоудобрения.**
- Микроорганизмы, используемые для производства бактериальных удобрений, способствуют снабжению растений не только элементами минерального питания, но и физиологически активными веществами (фитогормонами, витаминами и др.).
- Биоудобрения создаются:
 - 1) На основе азотфиксирующих микроорганизмов (*Azotobacter*, *Rhizobium*).
 - 2) На основе фосфатмобилизующих микроорганизмов (*Bacillus megaterium*).

- **Биопестициды.**
- **Микробные пестициды** в качестве активного ингредиента содержат микроорганизмы – бактерии, вирусы, грибы.
- Наибольшее распространение получили биоинсектициды на основе бактерий *Bacillus thuringiensis (Bt)*, различные штаммы которых способны контролировать насекомых-вредителей посевов капусты, картофеля и других культур.
- **Грибные препараты** содержат в качестве активного начала споры (конидии) грибов и вызывают болезни и гибель насекомых.
- **Биофунгициды** повышают устойчивость растений против заболеваний, вызываемых грибами.

- **Силосование кормов.**
- Для хранения растительных кормов в течение многих месяцев используют молочнокислые бактерии (растительный материал служит субстратом при синтезе молочной и уксусной кислот).
- Эти кислоты подавляют рост других микроорганизмов, способствуя сохранению кормовой растительной массы (силоса). Если молочнокислые бактерии присутствуют на свежем растительном материале в небольшом количестве, нужно добавить бактериальный посевной материал (обычно *Lactobacillus plantarum*). Оптимально растительное сырье, содержащее достаточное количество водорастворимых углеводов.

- **Клеточная инженерия растений.**
- Выращивание биомассы клеток растений уже используется в промышленных масштабах для получения биологически-активных соединений.
- Например, **производство биомассы женьшеня, родиолы розовой** для нужд парфюмерной и медицинской промышленности.

- Важное направление клеточной инженерии – **клональное размножение растений (клонирование растений)**. Метод основан на свойстве растений: из отдельной клетки или кусочка ткани в определённых условиях может вырасти целое растение, способное к нормальному росту и размножению.



- Методом **клонального размножения растений** из небольшой части растения можно получить до 1 миллиона растений в год.
- Получают **здоровые, свободные от вирусов растения** картофеля, винограда, сахарной свёклы, садовой земляники, малины и многих других культур.
- Методы **клеточной инженерии** позволят значительно **ускорить** селекционный процесс при **выведении новых сортов** важных сельскохозяйственных культур: срок их получения сокращается до 3-4 лет (вместо 10-12 лет, необходимых при использовании обычных методов селекции).

- **Метод соматической гибридизации (метод слияния клеток)** позволяет получать гибриды, которые не могут быть созданы обычным путём скрещивания.
- Методом слияния клеток получены, например, гибриды различных видов картофеля, томатов, табака; табака и картофеля, рапса и турнепса, табака и белладонны.
- На основе гибрида культурного и дикого картофеля, который устойчив к вирусам и другим заболеваниям, создаются новые сорта.

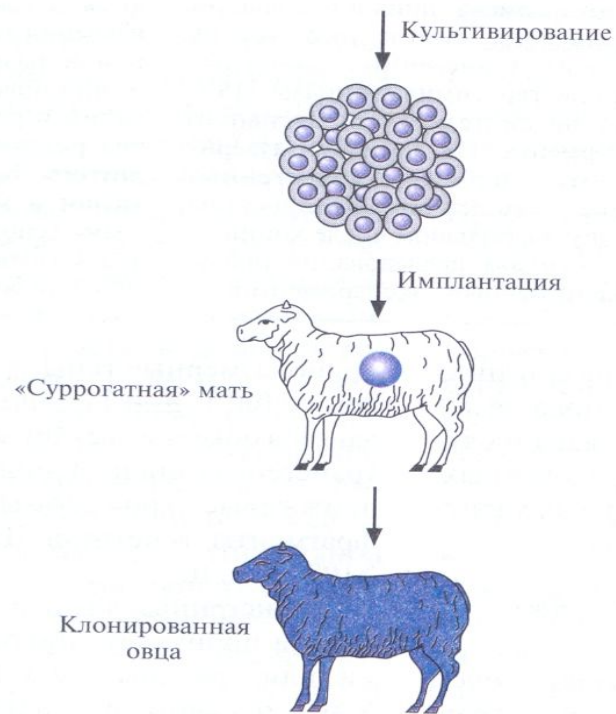
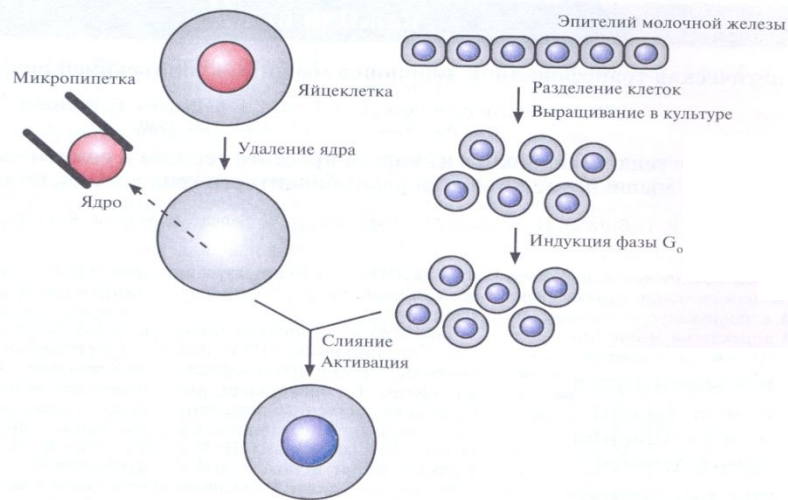
- **Генетическая инженерия растений.**
- В настоящее время искусственно созданы **трансгенные растения, устойчивые к насекомым-вредителям, болезням и гербицидам.**
- Получены растения томатов и дынь с замедленным созреванием плодов, что важно при их длительной транспортировке.
- Получены растения сои с повышенным содержанием аминокислоты лизин в семенах.

- Технологии получения **трансгенных животных**.
- Для этого нужный ген вводят в ядро оплодотворенной яйцеклетки, которую имплантируют (внедряют) в женскую особь (суррогатную мать) и добиваются успешного развития эмбриона.
- Трансгенные животные используются как для решения большого числа теоретических задач, так и в практических целях для медицины и сельского хозяйства. Существует множество трансгенных животных, моделирующих различные заболевания человека (рак, атеросклероз, ожирение). На этих моделях ученые успешно изучают эти заболевания и отработывают способы лечения.

- Перенос новых генов позволяет получать трансгенных животных, отличающихся **повышенными продуктивными свойствами** (например, усиление роста шерсти у овец, понижение содержания жировой ткани у свиней, изменение свойств молока).
- Получены животные с высокой устойчивостью к различным заболеваниям, вызываемым вирусами.
- Получены также некоторые трансгенные рыбы. Например, в яйцеклетки лосося был введен ген, отвечающий за синтез гормона роста. Полученный таким образом годовалый трансгенный лосось весил в 11 раз больше, чем нетрансгенный.

- Разработаны способы **клонирования животных** — создания генетически идентичных животных.
- Для этого из яйцеклетки одного животного удаляют ядро и заменяют его на ядро, полученное из соматической клетки другого животного.
- Такую 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.



Овца по имени Долли была клонирована с помощью переноса ядра клетки молочной железы в яйцеклетку.



• **Основные направления экологической биотехнологии:**

- 1) биологическая очистка сточных вод;
- 2) обработка твердых отходов (утилизация ила сточных вод, ТБО);
- 3) биологическая очистка воздуха от плохо пахнущих веществ;
- 4) биодegradация ксенобиотиков в окружающей среде; биоремедиация почв, загрязненных нефтью;
- 5) обеспечение возобновляемыми источниками энергии на основе органических отходов и биомассы (получение биогаза и других видов вторичного топлива);
- 6) биовыщелачивание металлов;
- 7) создание средств биологической борьбы с болезнями и вредителями сельскохозяйственных культур, альтернативных химическим пестицидам.

- **Биологическая очистка сточных вод.**
- Применяют метод аэробной биологической очистки сточных вод с помощью активного ила. Входящие в состав ила микроорганизмы используют загрязнения, содержащиеся в сточных водах, в качестве питательных веществ. При этом требуется перемешивать жидкость и непрерывно аэрировать её воздухом. Этот способ позволяет перерабатывать большие объемы стоков с самыми разнообразными загрязнениями — от хозяйственно-бытовых до промышленных.





- http://img-news.vl.ru/i/news/add_files//big914101_23.JPG

Микробиота активного ила представляет собой сложное сообщество микроорганизмов различных групп: бактерий, грибов, простейших, водорослей.

Бактерии - принимают участие в деградации органических компонентов стоков, формируют стабильные флокулы, осаждающиеся в отстойнике с образованием плотного ила.

Простейшие потребляют бактерии и снижают мутность стоков, наибольшее значение среди них имеют инфузории (*Vorticella*, *Opercularia*).



- <http://ofort-aqua.com/tech/2.jpg>

- **Метановое сбраживание твердых отходов.**
- В 1776 г. Вольта обнаружил, что в болотном газе содержится **метан**. Позже была определена роль микроорганизмов в этом процессе.
- С 1901 г. применяют **анаэробное сбраживание осадка** избыточного активного **ила**, образовавшегося при работе установок биологической очистки сточных вод.
- Метановое брожение применяют также для переработки **концентрированных жидких отходов**.

- **Биометаногенез** – сложный микробиологический процесс, в котором органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в анаэробных условиях.
- Микробиологическому анаэробному разложению поддаются практически все соединения природного происхождения.
-
- В результате сбраживания получают газ, содержащий 65% метана и 30% диоксида углерода, который может быть использован для отопления.
- Процесс происходит в специальных аппаратах – метантенках.

ТЕХНОЛОГИЯ МЕТАНОВОГО СБРАЖИВАНИЯ



<http://mastrekon.ru/metantenki/>

- **Биокомпостирование твердых отходов.**
- С целью переработки твердых отходов (ТБО, отходы сельского хозяйства) к предварительно измельченным и увлажненным отходам добавляются препараты микроорганизмов.
- При этом за счет ферментативной активности микроорганизмов происходит разложение органических отходов, что позволяет превратить их в удобрение, использовать их для подсыпки дорог, в строительстве и др. случаях.

- **Биологическая очистка газовых выбросов.**
- Многие выбросы в атмосферу содержат вредные или дурно пахнущие примеси. Для их очистки применяют биофильтры, заполненные насадкой, на которой закреплены микроорганизмы. При прохождении через насадку воздуха, содержащегося вредные примеси, они потребляются и обезвреживаются микроорганизмами.

- **Деградация ксенобиотиков с помощью микроорганизмов.**
- На протяжении 20 века нарастало загрязнение окружающей среды ксенобиотиками (неприродные, синтетические химические вещества; от греч. Xenos, чужой) – гербицидами, пестицидами, хладоагентами, растворителями и т.д.
- Традиционные методы разрушения, сжигания или химической модификации ксенобиотиков приводили к дальнейшему загрязнению окружающей среды.
- В середине 60-х годов прошлого века были обнаружены почвенные микроорганизмы, способные к деградации ксенобиотиков.

- Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*, разные штаммы которых способны расщеплять более 100 органических соединений. Нередко один штамм использует в качестве источника углерода несколько родственных соединений.
- В биодegradации сложной органической молекулы обычно участвуют несколько ферментов. Кодирующие их гены входят в состав крупных (50-2000 т.п.н.) плазмид, а иногда обнаруживаются как в хромосомной, так и в плазмидной ДНК.

- **Биодеградация химических пестицидов и инсектицидов.**
- Для борьбы с сорняками и вредителями растений используют химические пестициды и инсектициды. Пестициды создают опасность, сохраняясь на растениях или попадая в поверхностные воды.
- В процессе биодеградации органических соединений при помощи микроорганизмов может происходить их разложение и детоксикация.
- Для деградации пестицидов используют препараты на основе ассоциации нескольких микроорганизмов.

- **Биодеградация нефтяных загрязнений в почве и воде.**
- При аварийных разливах нефти используют биотехнологические способы восстановления загрязненных территорий.
- Места разливов обрабатывают препаратами нефтеокисляющих микроорганизмов, внося различные добавки для их азотного и фосфорного питания.
- Это позволяет разложить углеводороды нефти до CO_2 или трансформировать их в безопасные соединения.

- **Биосорбция тяжелых металлов стоков.**
- Обычная очистка стоков удаляет из них в основном органические загрязнения. Если в стоках содержатся тяжелые металлы (медь, никель, хром, свинец, и др.), то требуются дополнительные методы очистки. Некоторые микроорганизмы способны осаждают на себе (сорбировать) металлы, растворенные в жидкости. Концентрация металлов при этом возрастает настолько, что после обработки биосорбент можно рассматривать как сырье для получения цветных металлов.

- **Моторное топливо.**
- Альтернативой жидким углеводородам для получения моторного топлива для автомобилей и других двигателей может стать этанол. В Бразилии для производства спирта используют сахарный тростник, в США – крахмалсодержащие продукты (кукурузу, маниок), в России – древесину.
- В настоящее время углеводородное моторное топливо (из нефти) получается дешевле.

- **Биогеотехнология выщелачивания металлов** — использование окисляющих серу и серосодержащие соединения бактерий для извлечения металлов из руд, рудных концентратов и горных пород.
- Основу этого процесса составляет окисление содержащихся в рудах сульфидных минералов **тионовыми бактериями**.
- Окисляются сульфиды меди, железа, цинка, олова, кадмия и т. д. При этом металлы из нерастворимой сульфидной формы переходят в сульфаты, хорошо растворимые в воде.
- Из сульфатных растворов металлы извлекаются путем осаждения, экстракции, сорбции.