

Клеточная инженерия

Понятие культуры изолированных клеток и тканей

Использование культуры изолированных клеток и тканей

Условия культивирования изолированных тканей и клеток

Питательные среды

Дедифференцировка – основа процесса образования каллуса

Типы клеточных культур

Общая характеристика каллусных клеток

Изолированные протопласты

Получение и культивирование изолированных протопластов

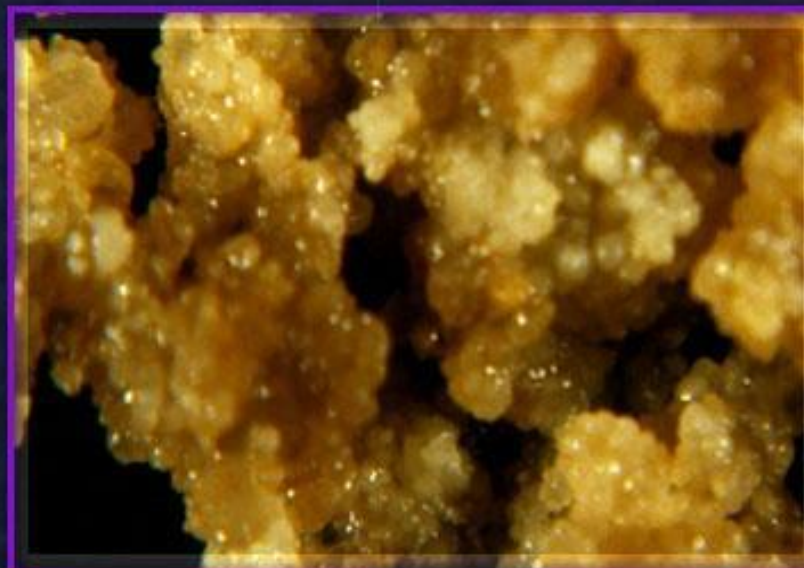


Понятие культуры изолированных клеток и тканей

Метод выращивания изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) получил название культуры изолированных тканей. Культура изолированных тканей обычно представлена каллусными и гораздо реже опухолевыми тканями.

КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

КАЛЛУСНЫЕ



Каллусная ткань образуется в результате повреждения на целых растениях, а также в стерильной культуре на explantах. Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (пролиферацией) дифференцированных клеток.

ОПУХОЛЕВЫЕ



Растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них ДНК бактериальной клетки, так называемой Ti-плазмиды, которая значительно изменяет свойства клетки.

Использование культуры изолированных клеток и тканей

Помимо фундаментальных исследований метод культуры изолированных тканей широко используется в сельском хозяйстве и промышленном производстве.

Клеточные культуры обладают рядом преимуществ в сравнении с традиционным растительным сырьем (дикорастущими и выращиваемыми на плантациях растениями):

**независимость от
внешних условий**

**оптимизация и стандартизация
условий выращивания**

**автоматизация и
компьютеризация процессов**

**возможность выращивания
исчезающих видов растений**



Примером может служить массовое клональное микроразмножение плодовоовощных и декоративных растений, а также их оздоровление от вирусных и других инфекций. С помощью культуры *in vitro* можно расширить возможности селекционной работы: получать клоны клеток, а затем и растения с запрограммированными свойствами. Благодаря способности клеток синтезировать в культуре вторичные метаболиты, возникла новая отрасль промышленности, осуществляющая биологический синтез веществ, необходимых человеку.

Условия культивирования изолированных тканей и клеток

Культивирование фрагментов ткани или органа растения – **эксплантов**, а тем более отдельных клеток, требует соблюдения полной **асептики**. Микроорганизмы, которые могут попасть в питательную среду, выделяют **токсины**, тормозящие рост клеток и приводящие культуру к гибели. Поэтому все манипуляции с клетками и тканями при культивировании *in vitro* проводят с соблюдением определенных правил асептики в **ламинар-боксе** или в **асептических комнатах**. Асептика достигается подачей пропущенного через фильтры стерильного воздуха, направленного из ламинар-бокса наружу, на работающего.

На поверхности растительных тканей всегда находится **эпифитная микрофлора**. Поэтому необходима поверхностная стерилизация, которая достигается путем обработки участков растений, из которых будут выделять **экспланты**, дезинфицирующими веществами (перекись водорода, сулема).

Для работы с биологическим материалом необходимы следующие составляющие:

Чистая посуда

Стерильная питательная среда

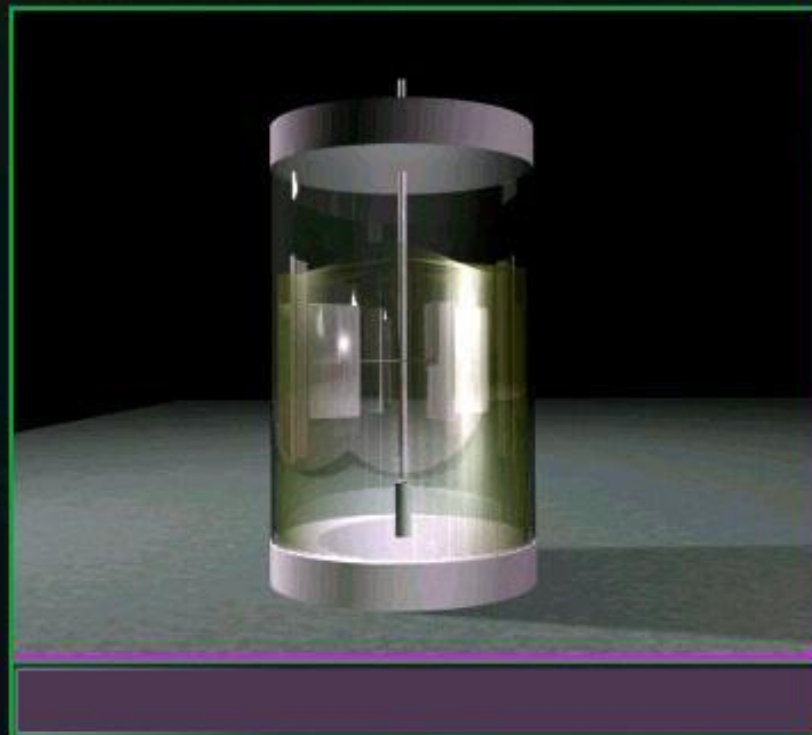
Оптимальная освещенность

Оптимальная температура

Оптимальная влажность

Аэрация

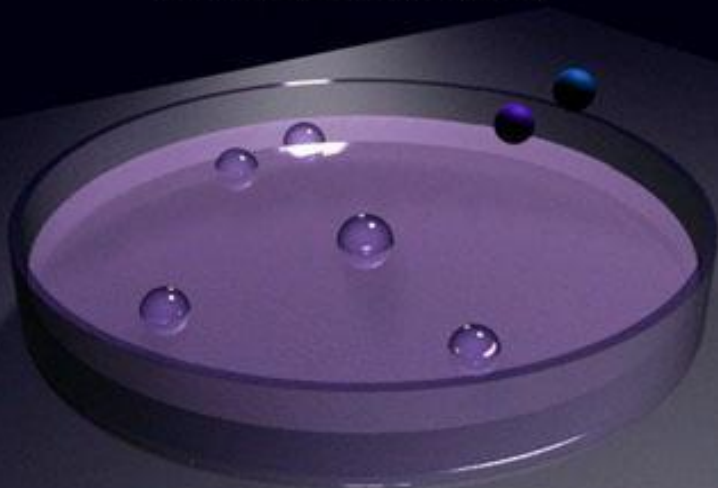
Чистая посуда, предварительно завернутая в бумагу или фольгу; инструменты, бумага, вата стерилизуются сухим жаром в **сушильном шкафу** при температуре 160 °С в течение 1,5–2 часов.



Питательные среды

Культивирование изолированных клеток и тканей происходит на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, однако в состав всех сред обязательно входят следующие необходимые растениям группы веществ: макроэлементы, микроэлементы, углеводы, витамины и фитогормоны.

Основные компоненты питательных сред



Экстракты



В питательную среду могут быть добавлены эндоспермы незрелых зародышей (кокосового ореха, конского каштана и других растений), пасока некоторых деревьев, различные экстракты (солодовый, дрожжевой), томатный сок. Введение их в среду дает интересные результаты, но такие эксперименты трудно воспроизводимы, так как действующий компонент, как правило, точно неизвестен.

Дедифференцировка – основа процесса образования каллуса

Дедифференцировка – это возвращение специализированных клеток в меристематическое состояние, когда они сохраняют способность к делению.



ДИФФЕРЕНЦИРОВКА



Типы клеточных культур

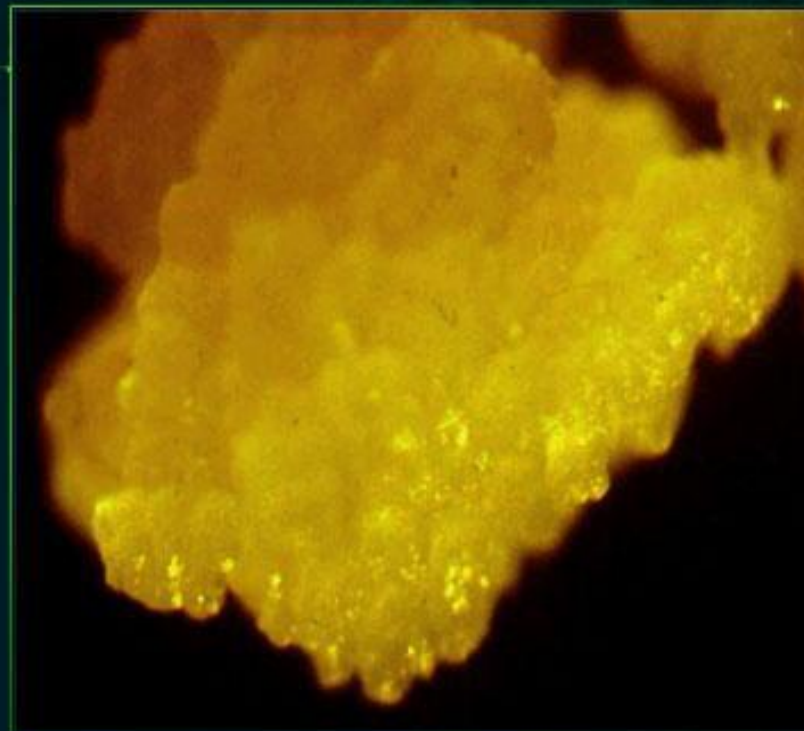
В зависимости от способа и условий культивирования можно выделить несколько типов культур клеток и тканей.

Каллусная культура

Суспензионная культура

Культура одиночных клеток

Если культивирование происходит поверхностно на агаризованной питательной среде, то образуется каллусная ткань. Она не имеет четко выраженной структуры, но может различаться по плотности. Происхождение и условия выращивания определяют, будет ли каллусная ткань рыхлой, средней плотности или плотной.



Общая характеристика каллусных клеток

Каллусная клетка обладает целым рядом свойств, общих со всеми растительными клетками. Это онтогенез клеток, устойчивость к тем или иным неблагоприятным факторам внешней среды и другие свойства. Вместе с тем у каллусных клеток во время их культивирования появляются свои индивидуальные особенности, такие как физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность и некоторые другие.

Онтогенез

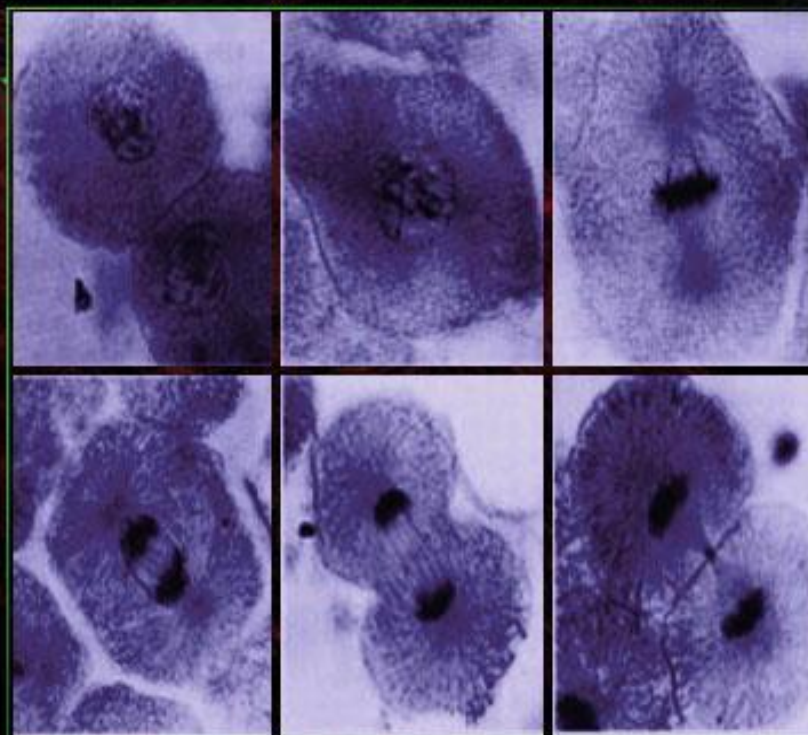
Физиологические особенности

Физиологическая асинхронность

Генетическая гетерогенность

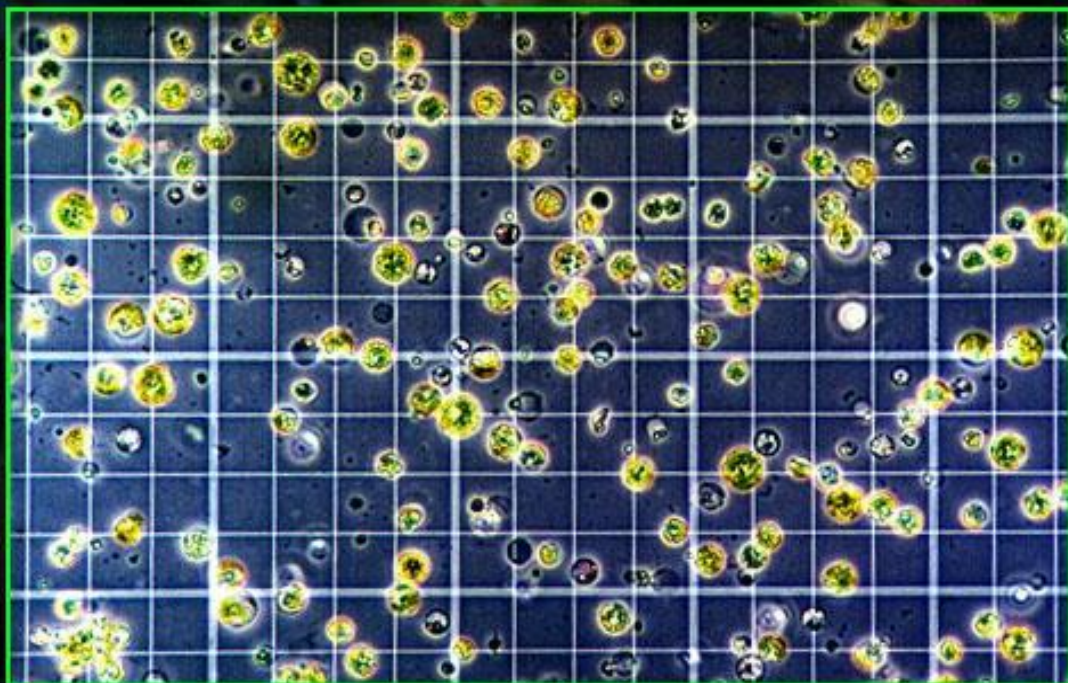
Гормоннезависимость

Онтогенез каллусной клетки аналогичен развитию любой растительной клетки. Он включает в себя деление (эмбриональная фаза), рост растяжением (фаза растяжения), дифференцировку (фаза дифференциации), старение и гибель клетки.



Изолированные протопласты

Изолированные протопласты являются одним из наиболее ценных объектов в биотехнологии. Они позволяют исследовать различные свойства мембран, а также транспорт веществ через плазмолемму. Главное преимущество этого объекта состоит в том, что в изолированные протопласты достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и клеток животных.



Получение и культивирование изолированных протопластов

Впервые протопласты были выделены Дж. Клернером в 1892 году при изучении плазмолиза в клетках листа телореза (*Stratiotes aloides*) во время механического повреждения ткани.

Изолированные протопласты можно культивировать. Обычно для этого используют те же среды, на которых растут изолированные клетки и ткани. Сразу же после удаления ферментов у протопластов в культуре начинается образование клеточной стенки. Протопласт, регенерировавший стенку, ведет себя как изолированная клетка – способен делиться и образовывать клон клеток.



ПРОТОПЛАСТ

Главное:

- 1 Каллусные ткани – это ткани, возникшие путем неорганизованного деления клеток растений.
- 2 Асептика является главным условием выращивания каллусных тканей.
- 3 Обязательными компонентами питательных сред являются углеводы, гормоны, макро- и микроэлементы, витамины.
- 4 Генная инженерия основана на получении гибридных молекул ДНК и введении этих молекул в клетки других организмов.
- 5 Дедифференцировка – это возвращение специализированных неделящихся клеток к пролиферации и неорганизованному росту.
- 6 Основными типами клеточных культур являются каллусная, суспензионная и культура одиночных клеток.
- 7 Характерные свойства каллусных клеток – физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность и гормоннезависимость.

Проверьте свои знания

1

Найдите правильные ответы.

Культура изолированных клеток и тканей может быть использована:

А	при фундаментальных научных исследованиях
Б	для клонального микроразмножения
В	для селекционной работы
Г	для получения вторичных метаболитов
Д	для хлебопечения
Е	для производства синтетических волокон
Ж	при получении биогаза

Проверьте свои знания

2

Культура изолированных клеток и тканей может быть использована...

А	при фундаментальных научных исследованиях
Б	для хлебопечения
В	для клонального микроразмножения
Г	для селекционной работы
Д	для производства синтетических волокон
Е	при получении биогаза
Ж	для получения вторичных метаболитов

3

В океане обнаружена губка, подавляющая рост патогенных грибов. Как лучше всего применить ее для борьбы с грибными заболеваниями?

А	Выявить ген, ответственный за образование данного вещества; ввести его в геном дрожжей и получить активное вещество с помощью дрожжей
Б	Построить океанариум и выращивать губку в оптимальных условиях
В	Получить данное вещество с помощью культуры ткани губки
Г	Собирать организмы на дне океана, размалывать и применять
Д	Определить структуру данного вещества и синтезировать химическим путем

Проверьте свои знания

4

- | | |
|----|--|
| 1 | Стерилизация питательной среды |
| 2 | Стерилизация воздуха в комнате |
| 3 | Стерилизация поверхности растения – экспланта |
| 4 | Стерилизация посуды |
| 5 | В питательную среду добавляют сахар (глюкозу) |
| 6 | В питательную среду добавляют NH_4NO_3 |
| 7 | В питательную среду добавляют K_2HPO_4 |
| 8 | В питательную среду добавляют набор микроэлементов |
| 9 | В питательную среду добавляют абсцизины |
| 10 | Освещение хорошее |
| 11 | Освещение слабое |
| 12 | Температура 25 °С |
| 13 | Температура 18 °С |
| 14 | Температура 32 °С |
| 15 | Влажность 90 % |
| 16 | Влажность 60 % |
| 17 | Влажность 30 % |
| 18 | Аэрация высокая |
| 19 | Аэрация низкая |

Выберите условия культивирования каллусных культур