

# 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

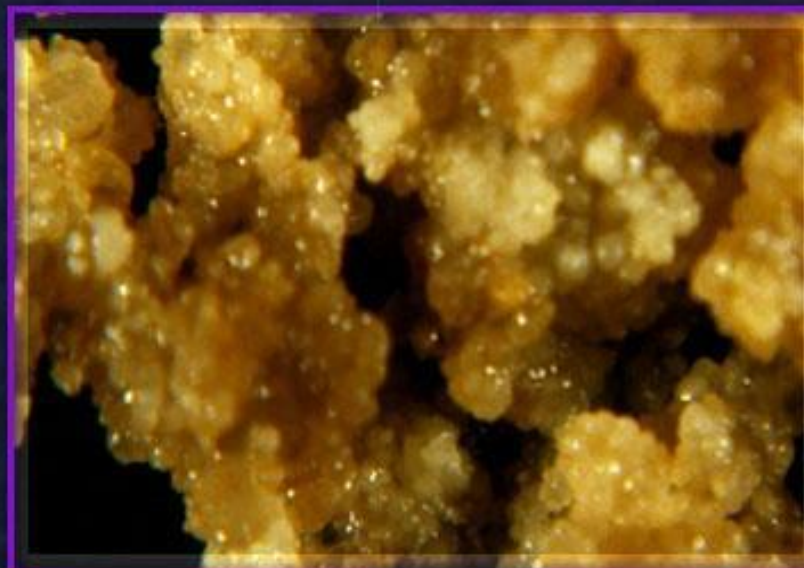


## Понятие культуры изолированных клеток и тканей

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 explantax. 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**

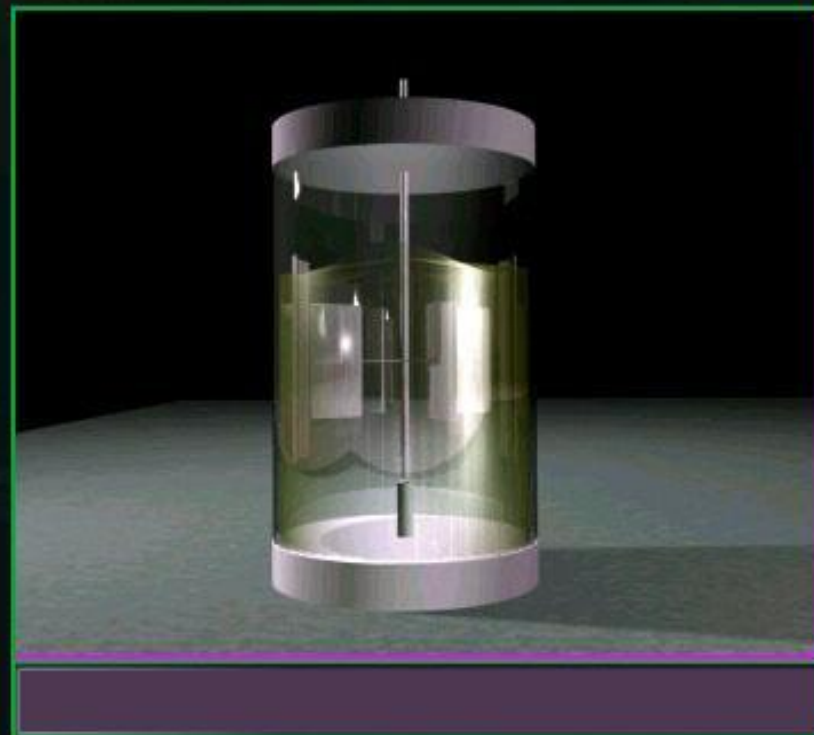
**Оптимальная освещенность**

**Оптимальная температура**

**Оптимальная влажность**

**Аэрация**

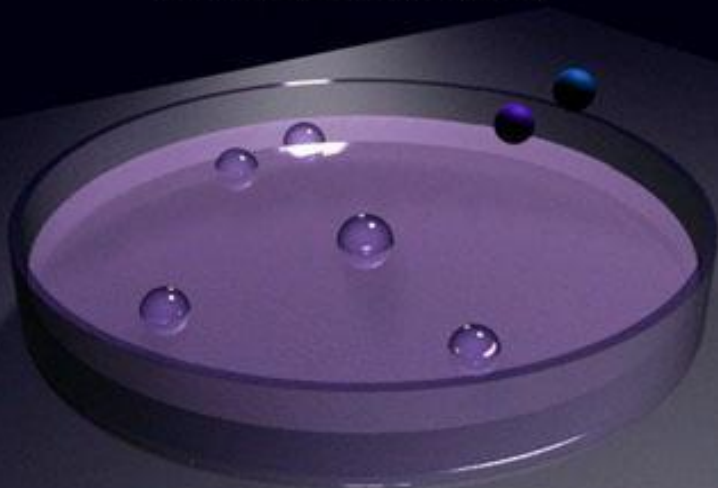
Чистая посуда, предварительно завернутая в бумагу или фольгу; инструменты, бумага, вата стерилизуются сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 1,5–2 часов.



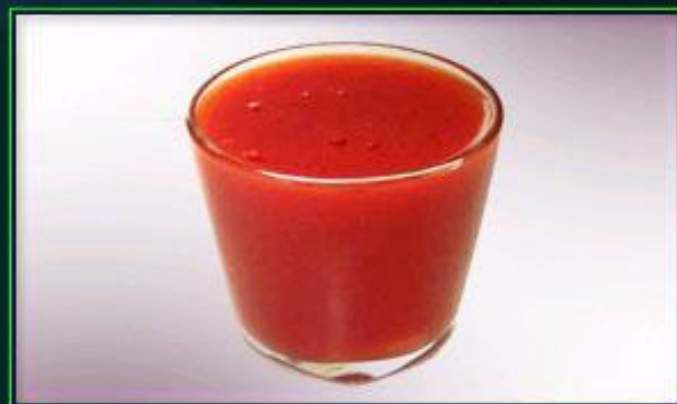
## Питательные среды

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

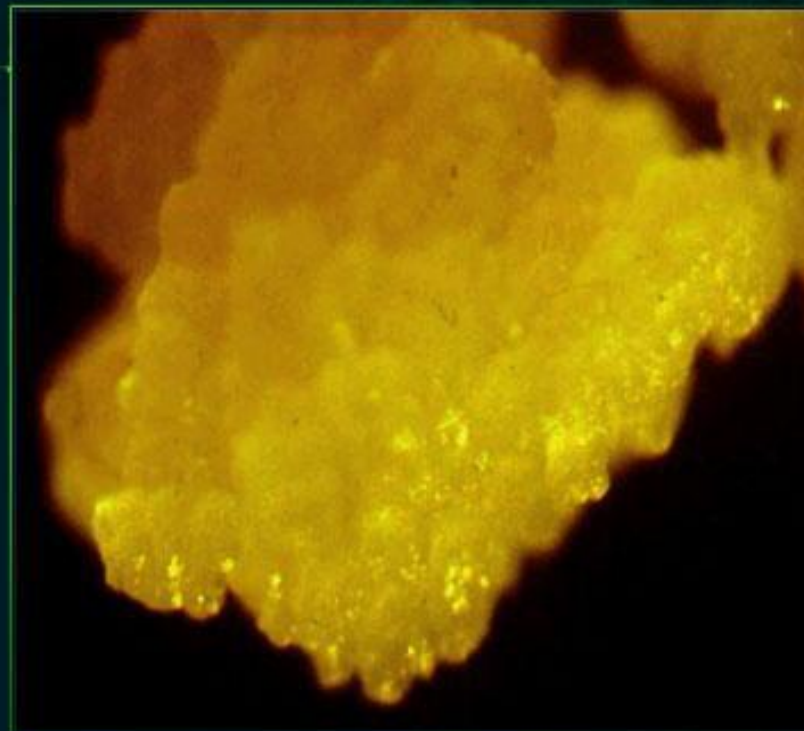
В зависимости от способа и условий культивирования можно выделить несколько типов культур клеток и тканей.

### **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

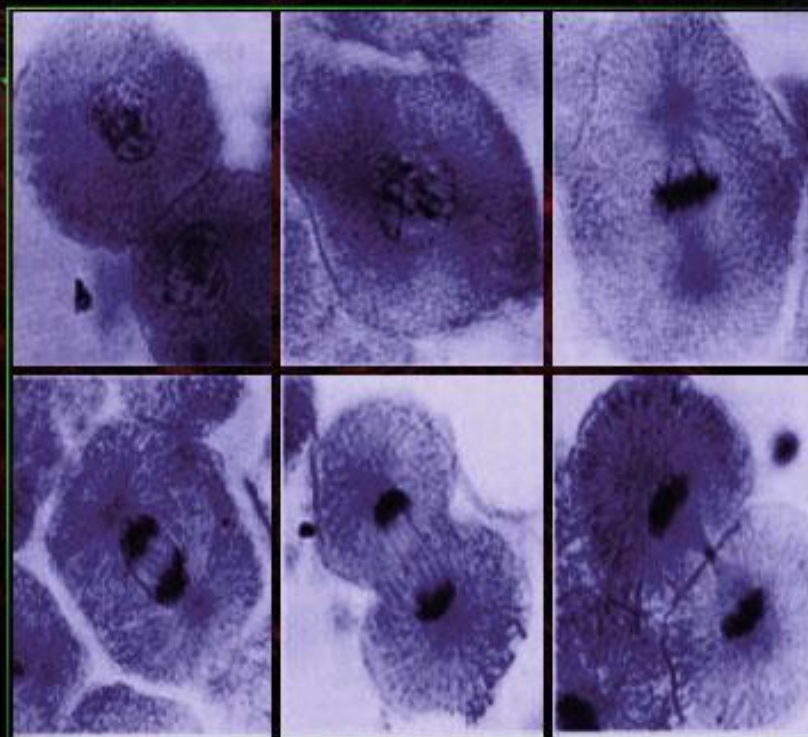
#### Физиологические особенности

#### Физиологическая асинхронность

#### Генетическая гетерогенность

#### Гормоннезависимость

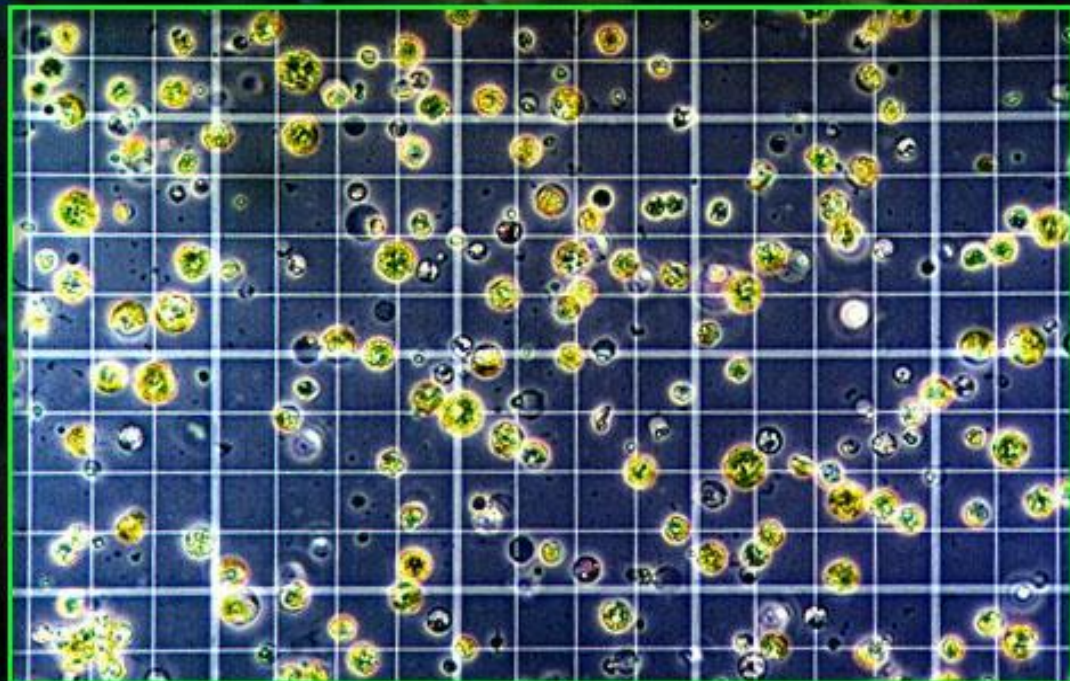
Онтогенез каллусной клетки аналогичен развитию любой растительной клетки. Он включает в себя деление (эмбриональная фаза), рост растяжением (фаза растяжения), дифференцировку (фаза дифференциации), старение и гибель клетки.





## 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:

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

## Проверьте свои знания

2

Культура изолированных клеток и тканей может быть использована...

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

3

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

<b>А</b>	Выявить ген, ответственный за образование данного вещества; ввести его в геном дрожжей и получить активное вещество с помощью дрожжей
<b>Б</b>	Построить океанариум и выращивать губку в оптимальных условиях
<b>В</b>	Получить данное вещество с помощью культуры ткани губки
<b>Г</b>	Собирать организмы на дне океана, размалывать и применять
<b>Д</b>	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 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ |
| 7  | В питательную среду добавляют $\text{K}_2\text{HPO}_4$ |
| 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