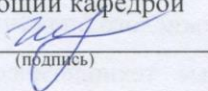


ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ
Кафедра биологии, биоресурсов и аквакультуры

Рег. № БИОТ. 04-12
« » 20 г.

УТВЕРЖДЕН
на заседании кафедры
Протокол № от « » 2017 г.
Заведующий кафедрой

(подпись) Морузи И.В.

ФОНД
ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

**Б1.В.ОД.4 «Основные принципы производства биотехнологических
препаратов»**

19.04.01 Биотехнология (уровень магистратуры)

Новосибирск 2017

**Паспорт
фонда оценочных средств**

№ п/п	Контролируемые разделы (темы) дисциплины*	Код контролируемой компетенции (или ее части)	Наименование оценочного средства
1	Объекты биотехнологии – микроорганизмы, культуры клеток, в т.ч. растений, микробиологические продукты, биологически активные вещества, их физико-химические свойства, функции, способы создания продуцентов биологически активных веществ.	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
2	Создание источников биологически активных веществ, включая методы получения и культивирования рекомбинантных клеток.	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
3	Методы извлечения биополимеров из биоматериала; Методы «грубого» фракционирования биополимеров - Технологии разделения с использованием центрифугирования, фильтрации, диффузии и диализа.	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
4	Хроматографические методы разделения и очистки биополимеров (История возникновения и развития; основные понятия и термины; классификация и примеры хроматографических методов).	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
5	Хроматографические методы разделения и очистки биополимеров (Классификация и примеры хроматографических методов).	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
6	Электрофоретические методы разделения, очистки и анализа	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная

	биополимеров (Принципы метода; материалы и оборудование). Методы получения биополимеров на основе нуклеиновых кислот.		работа, словарь терминов, экзамен
7	Методы получения биополимеров на основе белков. Химические, физические и иммунохимические методы для анализа биологически активных веществ, качественные и количественные реакции на биополимеры.	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
8	Основы и методы разработки препаратов вакцин. Основы разработки иммунофармакологических препаратов (Принципы доклинических и клинических испытаний препаратов медицинского назначения; использование модели лабораторных животных в исследованиях биополимеров, правила GLP).	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен
9	Получение рекомбинантных белков с использованием растительных продуцентов, правовые вопросы получения и использования генно-модифицированных организмов.	ОПК-9, ПК-13, ПК-18	Лабораторная работа, контрольные вопросы, контрольная работа, словарь терминов, экзамен

* Наименование темы (раздела) или тем (разделов) берется из рабочей программы дисциплины.

**Темы лабораторных работ
по дисциплине Б1.В.ОД.4 «Основные принципы производства
биотехнологических препаратов»**

№ 1. Гельфильтрация принцип метода

- забивка и уравнивание колонки сефадексом G15
- калибровка колонки голубым декстраном
- гельфильтрация образца БСА
- сбор целевых фракций

№ 2. Ионообменная хроматография

- принцип метода
- ионообменники
- забивка и уравнивание колонки DEAE 52.
- ионообменная хроматография на примере красителя азина и фенолового красного
сбор целевых фракций

№ 3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

- принцип метода
- приготовление основных растворов для проведения эксперимента
- сборка и заливка камеры
- приготовление образцов для анализа
- проведение электрофореза в 12%-ном ПААГ образцов БСА, полученных в работе №1
- обработка пластины геля
- анализ полученных данных

№4. Определение концентрации белков по методу Бредфорда

- принцип метода
- построение калибровочного графика
- определение концентрации БСА, полученного в работе №1

№5. Осаждение белков при помощи сульфата аммония, определение концентрации белка по методам Варбурга и Витакера

- принцип методов
- приготовление растворов сульфата аммония с выбранными концентрациями
- осаждение белка раствором сульфата аммония
- центрифугирование полученного осадка
- восстановление белка
- определение концентрации белка по методам Варбурга и Витакера

№6. Электрофорез нуклеиновых кислот в 1%-ном геле агарозы

- принцип метода

- приготовление растворов для проведения электрофореза
- сборка и заливка камеры
- проведение электрофореза в 1%-ном геле агарозы
- анализ полученных данных с помощью трансиллюминатора.

№7. Проведение хроматографии белков на хроматографе BioLogic LP фирмы Bio-Rad

- принцип метода
- забивка колонки сорбентом и уравнивание
- подключение колонки к хроматографической системе
- нанесение образца белка
- элюция образца с колонки
- сбор целевых фракций белка с помощью коллектора фракций
- анализа полученных фракций в 12%-ном ПААГ

Критерии оценки:

Оценка «отлично» выставляется обучающемуся, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка «хорошо» выставляется обучающемуся, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач некоторые неточности.

Оценка «удовлетворительно» выставляется обучающемуся, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, недостаточно правильные формулировки базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, но при этом он владеет основными разделами учебной программы, необходимыми для дальнейшего обучения и может применять полученные знания по образцу в стандартной ситуации.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется обучающемуся, который не знает большей части основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубые ошибки в формулировках основных понятий дисциплины и не умеет использовать полученные знания при решении типовых практических задач.

Темы контрольных работ, выносимые на самостоятельное обучение по дисциплине Б1.В.ОД.4 «Основные принципы производства биотехнологических препаратов»

№ п/п	Наименование вида самостоятельной работы
1	2
1	Изучение теории по разделу: биологически активные вещества, их физико-химические свойства, функции, способы создания продуцентов биологически активных веществ, химическая природа белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот, их структура и основные свойства. Основы генной инженерии. Методы выделения и синтеза генов. Получение и клонирование рекомбинантных молекул. Создание векторов на основе плазмид и вирусов. Перспективы применения рекомбинантных молекул. Ферменты обмена нуклеиновых кислот, свойства и специфичность.
2	Изучение теории по разделу: Физико-химические аспекты биотехнологии: Исходные сырье для получения биопрепаратов. Характеристика питательных сред для культивирования микроорганизмов и культур клеток и тканей Кинетика роста популяций. Изменение плотности популяции во времени при периодическом культивировании микроорганизмов и клеток, фазы роста. Производственный ферментёр как экологическая ниша.
3	Изучение теории по разделу Практические методы биотехнологии: методы приготовления экстрактов, разделение белков путем осаждения (солями, органическими растворителями и др.), аппаратное оформление процессов концентрирования, выделения и очистки биотехнологических продуктов.
4	Изучение теории по разделу Разделение белков путем адсорбции (виды хроматографии: ионообменная, адсорбционная, аффинная и др.), виды и принципы разделения молекул при электрофорезе, определение чистоты и концентрации белков и нуклеиновых кислот
5	Изучение теории по разделу химические, физические и иммунохимические методы для анализа биологически активных веществ, качественные и количественные реакции на биополимеры
6	Изучение теории по разделу Единая система GLP, GCP, GMP при внедрении в практику и производство биотехнологических лекарственных препаратов. Основные представления о использовании рекомбинантных молекул (ДНК и белков, в т.ч. - антител) в диагностике (ПЦР, ИФА).

Критерии оценки:

Оценка «отлично» выставляется обучающемуся, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка «хорошо» выставляется обучающемуся, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач некоторые неточности.

Оценка «удовлетворительно» выставляется обучающемуся, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, недостаточно правильные формулировки базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, но при этом он владеет основными разделами учебной программы, необходимыми для дальнейшего обучения и может применять полученные знания по образцу в стандартной ситуации.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется обучающемуся, который не знает большей части основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубые ошибки в формулировках основных понятий дисциплины и не умеет использовать полученные знания при решении типовых практических задач.

ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ
Кафедра Биологии, биоресурсов и аквакультуры

Вопросы к сдаче экзамена по дисциплине Б1.В.ОД.4 «Основные принципы производства биотехнологических препаратов»

- Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства. Нуклеиновые кислоты.

1. Одноцепочечные (ДНК и РНК).
2. Двухцепочечные (ДНК). Структурные характеристики ДНК.
3. Денатурация ДНК. Хаотропные агенты.

- Белки.

4. Разнообразие структур молекул белков. Альбумины, глобулины. Заряд молекулы белка, изоэлектрическая точка. Растворимые и нерастворимые в воде белки, солюбилизующие агенты (гуанидин, карбамид).

5. Денатурация белков с использованием додецилсульфата натрия (ДСН) и 2-меркаптоэтанола.

- Липиды

6. Строение и свойства. Растворимость липидов. Липополисахариды. Фосфолипиды.

- Углеводы.

7. Строение и свойства. Отличие от углеводов. Растворимость углеводов (на примере декстранов и хитозанов).

- Многоатомные спирты, гликозиды, флавоноиды, антибиотики.

8. Общее представление.

- Источники биополимеров.

9. Особенности синтеза биополимеров вирусами, Синтез биополимеров микроорганизмами. Синтез биополимеров эукариотическими клетками.

10. Внутри- и внеклеточная (нуклеазы, бактериоцины, антибиотики и др.) локализация биополимеров при их синтезе.

- Методы «грубого» фракционирования биополимеров

11. Концентрирование биополимеров внеклеточной локализации.

12. Осаждение биополимеров. Общие положения.

13. Осаждение белков при высокой концентрации соли. Общие аспекты растворимости белков при высокой концентрации соли. Осаждение белков сульфатом аммония.

14. Осаждение белков органическими растворителями. Общая теория. Выбор растворителя.

15. Осаждение спиртами, ацетоном, влияние температуры на осаждение полимеров.
16. Осаждение биополимеров другими полимерами.
17. Осаждение белков и нуклеиновых кислот в растворах полиэтиленгликоля, полиэтиленгликоля.
18. Фильтрация через фильтры с фиксированным размером пор. Применение полых волокон. Общие принципы устройства аппаратов с полыми волокнами.
19. Диализ. Принцип метода. Диффузия молекул в объеме.
20. Зависимость коэффициента диффузии от температуры и размера частиц. Коэффициенты диффузии некоторых молекул биополимеров.
- **Извлечение внутриклеточных биополимеров из клеток.**
21. Способы разрушения клеток
22. Мягкое воздействие (лизис клеток, разрушение под действием ферментов, химическая солюбилизация и автолиз).
23. Воздействие средней силы (растирание с абразивом).
24. Сильное воздействие (ультразвук, пресс Френча, шаровая мельница).
25. Влияние на степень экстракции растворителей, значения рН, температуры.
26. Особенности извлечения биополимеров из:
 - тканей животных;
 - дрожжей;
 - бактерий.
27. Солюбилизирующие агенты для белков; (твин, карбамид, гуанидин и др.), растворители для экстракции липидов (пентан, хлороформ и др.)
28. Экстракция клеточного содержимого без разрушения клеток. Растворители.
- **Центрифугирование.**
29. Принципы метода.
30. Седиментация - общие закономерности.
31. Равновесная скорость осаждения. Коэффициент седиментации.
32. Определение коэффициента седиментации из эксперимента. Стандартные условия.
33. Связь между коэффициентом седиментации и свойствами (размеры, плотность, масса) частицы. 1-е уравнение Сведберга.
34. Равновесная седиментация. Форма градиента концентрации.
35. Определение молекулярной массы по результатам равновесного центрифугирования (2-е уравнение Сведберга).
Общее устройство центрифуги.
36. Типы центрифуг: аналитические, препаративные, настольные, ультрацентрифуги.
37. Основные узлы: ротор, привод, холодильник, вакуумный насос. Их назначение.
38. Основные характеристики роторов: максимальная скорость, минимальный и максимальный радиусы. Их значения для разных вариантов седиментации.
39. Основные типы роторов: с горизонтальным ("откидные"), наклонным и вертикальным расположением пробирок. Их сравнительные преимущества и недостатки.
40. Проточное центрифугирование.
41. Скоростная седиментация. Объемная и зональная скоростная седиментация. Зависимость скорости седиментации от расстояния до оси вращения, использование градиентов вязкости и плотности. Степень применимости различных типов роторов.
42. Изопикническое центрифугирование. Вещества, используемые для формирования градиентов плотности и способы их формирования. Наиболее адекватные типы роторов.
43. Варианты практического использования седиментации.
44. Примеры использования центрифугирования: фракционирование клеточных органелл / субмолекулярных комплексов скоростным и зональным центрифугированием; очистка суперскрученной кольцевой ДНК центрифугированием в градиенте плотности.
45. Сепарация. Примеры использования сепарации.
- **Хроматография.**
46. Принципы метода.

47. Хроматографическая система. Основные понятия: сорбент, элюент, коэффициент распределения, коэффициент селективности.

48. Свободный объем, объем удержания, коэффициенты распределения и емкости. Коэффициент разделения и степень разделения.

49. Концепция теоретических тарелок. Идеализация хроматографической системы. Зависимость доли вещества в выбранной тарелке от времени. Форма и скорость миграции хроматографической зоны. Число теоретических тарелок, высота теоретической тарелки. Зависимость степени разделения от числа теоретических тарелок и коэффициента селективности. Экспериментальное определение ширины зоны и числа теоретических тарелок.

50. Классификация и примеры хроматографических методов.

51. По агрегатному состоянию фаз:

52. Газо-жидкостная, жидкостно-газовая. Носитель стационарной фазы.

53. Жидкость-твердая фаза. Сорбенты. Пористые и поверхностные сорбенты. Размеры частиц твердых сорбентов, шкалы размеров. Влияние размеров частиц на емкость, гидравлическое сопротивление и радиус диффузии (макс. скорость хроматографии).

54. Типы хроматографического процесса: Колоночная .

55. Плоскостная: бумажная, тонкослойная (ТСХ на пластинках). Относительная подвижность. Особенности использования тонкослойной хроматографии для разделения аминокислот, нуклеотидов.

56. Капиллярная.

57. По природе сорбции (физико-химическим свойствам сорбента):

Адсорбционная. Параметры разделения. Используемые сорбенты и элюенты.

58. Гель-фильтрация. Принцип и параметр разделения. Диапазон изменения объема удержания. Сорбенты для гель-фильтрации, их подготовка. Микроколоночный вариант гель-фильтрации с использованием микроцентрифуги: достоинства, недостатки, эффективность разделения.

59. Ионообменная хроматография. Параметр разделения. Типы и химическая структура сорбентов (катионообменные и анионообменные сорбенты). Особенности подготовки сорбентов для ионообменной хроматографии. Влияние значений pH на эффективность фракционирования биополимеров на ионообменных сорбентах.

60. Аффинная и псевдоаффинная (метало-хелатная) хроматографии. Параметры разделения. Наиболее распространенные матрицы для сорбентов и способы иммобилизации на них лигандов.

61. Хроматография на окрашенных сорбентах. Иммуноадсорбенты. Адсорбция в объеме.

- Электрофорез.

62. Принципы метода. Движение заряженной частицы в растворе под действием электрического поля. Зависимость равновесной скорости частицы от параметров процесса и свойств частицы. Параметр разделения. Подвижность, относительная подвижность.

63. Изотахорофорез – принцип метода, равновесные концентрации зон (вывод соотношений), сфера применения.

64. Эндоэлектроосмос.

65. Буферы для электрофореза.

66. Критерии выбора компонентов буфера: зависимость проводимости раствора от заряда и размера частиц;

67. Примеры наиболее часто используемых буферов, их характеристики, достоинства, недостатки. Электрофорез в гелях.

68. Типы гелей. Их свойства.

69. Гели агарозы: химическая структура, размеры и однородность пор.

70. Гели полиакриламида: структура мономеров, реакция полимеризации, катализаторы, источники свободных радикалов, фотоактивируемая полимеризация. Зависимость размера пор от концентрации и соотношения мономеров.

71. Подвижность биополимеров в гелях.

72. Зависимость подвижности от размеров молекул. Диапазон эффективного использования гелей агарозы и ПАА различных концентраций.

73. Электрофорез в переменном ("пульсирующем") поле (PFGE): аномальная подвижность больших молекул ДНК.

74. Приборы для электрофореза. Технология нанесения образцов.

75. Приборы для горизонтального открытого и вертикального электрофореза. Рециркуляция буфера.

76. Термостатируемые приборы для электрофореза.

- Электрофорез нуклеиновых кислот (НК).

77. Электрофорез НК в неденатурирующих условиях. Зависимость подвижности оц- и дц- нуклеиновых кислот от длины. Подвижность кольцевых и суперскрученных молекул дц-ДНК.

78. Электрофорез в денатурирующих условиях. Денатурирующие агенты для денатурации ДНК и РНК. Разрешающая способность.

79. Разделение цепей дц-ДНК электрофорезом: принцип и особенности электрофореза.

80. Электрофорез ДНК в пульсирующем поле (PFGE): преимущества, сфера применения.

- Электрофорез белков.

81. Электрофорез в неденатурирующих условиях. Параметр разделения

82. Электрофорез в денатурирующих условиях.

83. Денатурация белка. Параметр разделения.

84. Принцип DISC-электрофореза (электрофорез SDS-денатурированных белков по Лэммли).

85. Использование градиента концентрации геля, равновесный электрофорез.

86. Изоэлектрофокусирование.

87. Принцип метода, параметр разделения.

88. Амфолины. Формирование и стабильность градиента рН.

89. Специальные варианты электрофореза.

90. Детекция не полностью комплементарных ДНК-дуплексов (гетеродуплексов) электрофорезом в градиенте денатурирующего агента (DGGE).

91. Элюция биополимеров из геля.

92. Пассивная элюция.

93. Элюция с использованием диффузии.

94. Способы частичного разрушения геля.

95. Солюбилизация гелей агарозы. Агароза с низкой температурой плавления. Использование хаотропных агентов. Способы удаления агарозы.

96. Солюбилизация ПААГ.

97. Электроэлюция. Принцип, устройство аппарата ISCO.

98. Перенос на мембраны. Перенос под действием потока жидкости (по Саузерну и с использованием вакуума) и электрического поля: эффективность, преимущества и недостатки.

99. Непрерывная элюция (извлечение биополимеров в процессе электрофореза): использование диализных мембран; непрерывная элюция олигонуклеотидов после электрофореза в денатурирующем ПААГ потоком жидкости.

- Методы детекции биополимеров.

100. Поглощение света веществом (спектрофотометрия).

101. Коэффициент пропускания. Оптическая плотность. Приборы для ее определения. Зависимость относит. погрешности определения от ее величины.

102. Спектр поглощения. Типичные спектры ДНК, РНК, белков.

103. Гипер- и гипохромный эффект на примере плавления ДНК-дуплексов.

104. Использование красителей для детекции биополимеров.

105. Примеры красителей, используемых для разных классов биополимеров, чувствительность окрашивания.

106. Использование флуоресценции на примере этидия бромида (EtBr) и акридинового оранжевого. Причины и примеры изменения интенсивности и смещения спектра испускания при интеркаляции.

107. Использование флуоресцентных меток. Преимущества флуоресцентных меток.

108. Методы определения концентрации белка спектрофотометрическими методами.

109. Определение концентрации белка с красителем Кумасси синим.

- Определение чистоты биополимеров

110. Определение чистоты белков (электрофоретический анализ, кристаллизация, ВЭЖХ);

111. Определение чистоты нуклеиновых кислот (электрофоретический анализ, спектральные характеристики);

112. Определение чистоты углеводов (ТСХ).

113. Требования GMP к процессам при разделении, очистке биополимеров и конечному продукту.

Критерии оценки:

Оценка «отлично» выставляется обучающемуся, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка «хорошо» выставляется обучающемуся, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач некоторые неточности.

Оценка «удовлетворительно» выставляется обучающемуся, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, недостаточно правильные формулировки базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, но при этом он владеет основными разделами учебной программы, необходимыми для дальнейшего обучения и может применять полученные знания по образцу в стандартной ситуации.

Оценка «неудовлетворительно» выставляется обучающемуся, который не знает большей части основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубые ошибки в формулировках основных понятий дисциплины и не умеет использовать полученные знания при решении типовых практических задач.

**МАТРИЦА СООТВЕТСТВИЯ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ УРОВНЮ
СФОРМИРОВАННОСТИ КОМПЕТЕНЦИЙ**

Критерии оценки	Уровень сформированности компетенций
Оценка по пятибалльной системе	
«Отлично»	«Высокий уровень»
«Хорошо»	«Повышенный уровень»
«Удовлетворительно»	«Пороговый уровень»
«Неудовлетворительно»	«Не достаточный»

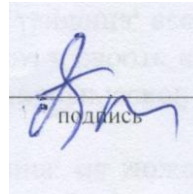
Методические материалы, определяющие процедуру оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

1. Положение «О балльно-рейтинговой системе аттестации студентов»: СМК ПНД 08-01-2015, введено приказом от 28.09.2011 №371-О, утверждено ректором 12.10.2015 г. (<http://nsau.edu.ru/file/403>: режим доступа свободный);

2. Положение «О проведении текущего контроля и промежуточной аттестации обучающихся в ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ»: СМК ПНД 77-01-2015, введено в действие приказом от 03.08.2015 №268а-О (<http://nsau.edu.ru/file/104821>: режим доступа свободный).

Программу разработал(и):

Профессор, кафедры биологии
биоресурсов и аквакультуры
доктор. биол. наук



Ю.С. Аликин

ФИО

(должность)

Лекция 1. Вводная лекция. Объекты биотехнологии – микроорганизмы, культуры клеток, в т.ч. растений, микробиологические продукты, биологически активные вещества, их физико-химические свойства, функции, способы создания продуцентов биологически активных веществ.

Биотехнология – современная отрасль деятельности человека, основанная на использовании наук о природе и технических знаний для производства с помощью биосистем полезных продуктов. В буквальном смысле слова биотехнология – это «биологическая технология», то есть применение фундаментальных биологических знаний в практической деятельности, направленной на производство лекарственных препаратов, ферментов, белков, красителей, ароматических веществ, витаминов и целого ряда биологически активных соединений. Кроме того, речь идёт об использовании биотехнологических методов в селекции и конструировании принципиально новых организмов, ранее не существовавших в природе.

Успешное развитие биотехнологии стало возможным благодаря многочисленным открытиям в биохимии, генетике, биологии клетки и молекулярной биологии, и, в первую очередь, на установлении структуры и функции определённых ферментов, их использовании в иммобилизованной форме в разнообразных производственных процессах, а также на том, что был открыт способ модификации ДНК и перенесения её из одних организмов в другие.

Развитие биотехнологии коснулось и растений, хотя и позднее. Для широкомасштабного производства клонов растений используются меристемы, а культуры растительных клеток применяют для синтеза различных веществ, как самых обычных (алкалоиды и другие вторичные метаболиты), так и экзотических (идиолиты).

В 1937 году Готере с успехом культивировал недифференцированную ткань моркови. Полученный при этом каллус, отделенный от родительского растения, фрагментировали и получали растительный гормон роста – ауксин. Позднее были получены культуры из отдельных растительных клеток, из которых были выделены протопласты. Слияние протопластов позволяет увеличивать число и разнообразие гибридов без применения полового размножения. В лабораториях обнаружили способность изолированных клеток некоторых видов растений закаляться. Так, если клетки без закалки еле переносят температуру -20°C , то с закалкой способны выдержать и -35°C , а клетки сибирской яблони с закалкой терпят мороз ниже 50°C . Вот только клетки теплолюбивого лимона никаким закалкам не поддаются. Появилась возможность отбора клеток с большой морозостойкостью из каллуса пшеницы и ели. Изолированные клетки сохраняют способность синтезировать вещества, присущие ей *in vivo*, то есть в теле живого организма, — витамины, гормоны, алкалоиды, кумарины, стероиды и так далее. Это заинтересовало

биологов с точки зрения утилизации этих веществ для промышленности. В лабораториях обнаружена еще одна способность клеток: отдели одну от других или посади ее на питательную среду поодаль от сородичей, и она наотрез откажется делиться и размножиться. Экспериментаторы, естественно, предполагают, что «телепатия» клеток имеет химическую природу, однако выделить и рассмотреть «в лицо» виновника «телепатии» до сих пор не удалось. Прямо не вещество, а привидение - очень уж мала его концентрация. Киевскому соратнику — все же удалось заставить клетку, «страдающую» от одиночества, делиться в мельчайшей капелке питательной среды.

Чем дольше занималась лаборатория культурой клеток, тем больше интересных явлений открывалось перед ее сотрудниками. Ну, хотя бы то, что клетки каллуса, имеющие единственного предка — одну прапрапра... (и так далее) клетку, оказываются через несколько поколений генетически различными. Может быть, изучив это явление, мы обнаружим, что предком обезьяны и человека был прозаический кольчатый червь.

Изменения, наблюдаемые в изолированной культуре, могут возникать вследствие мутаций специфических генов и хромосомных перестроек. Частота, тип и стабильность изменчивости зависят от генотипа исходного растения и физиолого-биохимического состояния («настроения») клетки. Высказано предположение, что условия изолированной культуры приводят к глубокой клеточной дестабилизации. Широкий спектр вариантов, образующихся из культивируемого материала, является отражением дестабилизации, за которой следуют действие отбора и вторичные наследственные изменения в популяции клеток. Наблюдаемая изменчивость имеет большое значение при применении культуры клеток и тканей для улучшения сельскохозяйственных культур.

Воздействие мутагенами - веществами или радиацией, вызывающими наследственные изменения, увеличивает частоту измененных клеток, а использование селективных условий (например, повышенного инфекционного фона) создает предпосылки для размножения только измененных в нужном человеку направлении клеток. Однако многие исследователи, памятуя, вероятно, строки стихотворения Федора Тютчева («Природа — сфинкс. И тем она верней своим искусом губит человека...»), отказываются от использования мутагенов, чтобы избежать добавочных нежелательных мутаций. Тем более что мутантных клеточных линий возникает вполне достаточно и без их вмешательства. В клетках каллуса часто меняется и число хромосом. Каллус растения гаплопаппус, например, через два года оказался состоящим на 95 процентов из полиплоидных (содержащих в ядре более двух геномов) клеток с числом наборов основного (базисного) числа хромосом, равным восьми и более. В США получены полиплоидные формы табака из клеток каллуса, культивируемых вне организма, отличающиеся рядом хозяйственно ценных признаков. Выход полиплоидных форм оказался настолько значительным, что этот метод рекомендован для экспериментального получения полиплоидов. Такие же результаты получены у лимона и клевера ползучего. Да и вообще регенерировавшие из каллуса растения часто отличаются от своих родителей числом хромосом. Генетически идентичное воспроизведение генотипов через дифференциацию в культуре каллуса в настоящее время можно осуществить у сравнительно немногих видов. Для селекции генетическая изменчивость клеток каллуса может представить определенный интерес. На основе регенерации в культуре тканей и органов растений получены высокопродуктивные формы подсолнечника. К сожалению, у таких важнейших сельскохозяйственных культур, как зерновые и бобовые, активировать морфогенез на питательных средах пока удается редко, но есть успехи при работе и с этими «непокорными» культурами. На питательных средах при высокой интенсивности освещения ныне выращивают растения-гаплоиды из пыльцевых зерен. У них вдвое меньше хромосом, чем в обычных соматических клетках стеблей, листья и корня родительского растения. Из них при удвоении хромосом путем обработки колхицином или закисью азота под давлением

(есть и иные пути удвоения) получают дигаплоиды (или, допустим, тетрагаплоиды, если основной набор учетверен). Они гомозиготны, то есть обеспечивают проявление свойственных им признаков устойчиво на протяжении многих поколений. У них, как говорят генетики, не выщепляются новые признаки, если, конечно, не появляются мутации - внезапные новые наследственные признаки. Гомозиготные линии нередко используют в селекции на гетерозис - достоверное повышение продуктивности, качества или иного показателя против родительских форм, вовлеченных в гибридизацию. Используют гаплоиды и иначе. В Китае с помощью культуры пыльников выведены короткостебельные, скороспелые и высокоурожайные сорта риса. Применение в этой стране питательных сред, включающих картофельный экстракт, привело к ранее недостижимому — получению гаплоидов у ржи, что открыло новые возможности в селекции этой перекрестноопыляющейся культуры. Получены интересные результаты у ячменя, перца, мака, люцерны, винограда, тополя, яблони и масличного рапса. У последней культуры, проведенной через культуру пыльников, несколько уменьшили и надеются уменьшить еще более содержание вредных гликозидных соединений. Всего в Китае к 1984 году из пылевых зерен выращено около 40 видов растений. Изучение популяций пшеницы, риса, кукурузы и табака из пыльников показало, что около 90 процентов удвоенных гаплоидов является генетически однородными, хотя у 10 процентов все же отмечена нестабильность числа хромосом и их структуры.

В России эффективный способ получения пшеницы из пыльцы в культуре пыльников разработан саратовскими учеными и самое интересное, что иногда и гибридизацию удается провести в чашках Петри, пробирках, вообще в каких-либо сосудах, в которые помещают изолированную от растения семяпочку. На нее наносят пыльцу, преодолевая таким образом самонесовместимость — отказ растения дать семена, если его пытаются оплодотворить собственной пыльцой. В пробирке случается порой преодолеть несовместимость довольно отдаленных видов, и даже родов растений. Однако бывает и так, что скрестить растения, относящиеся к двум разным видам или родам, удается, но полученные от гибридизации семена не желают прорасти — сказывается несовместимость, допустим, зародыша с эндоспермом. Это обычное явление при скрещивании пшеницы и ржи (есть, однако, и другие факторы, препятствующие прорастанию). В таких случаях с успехом прибегают к отделению зародыша от эндосперма на ранних этапах развития зерновки и помещению зародыша на искусственную питательную среду, состоящую из многих компонентов.

При выращивании молодых эмбрионов добились завязывания жизнеспособных семян у межродовых гибридов - ячмень X рожь, элимус X пшеница, трипсакум X кукуруза; томат культурный X томат перуанский, чина пурпурная X чина членистая, лядвенец тонкий X лядвенец топяной, донник желтый X донник белый, фасоль обыкновенная X фасоль остролистная (тепарн), клевер сходный X клевер гибридный (розовый), слива североамериканская X слива персидская. с сотрудниками получил межвидовой гибрид табака с новыми свойствами устойчивости благодаря культуре на искусственной питательной среде каллусов из неспособных к прорастанию гибридных семян. Таким же путем получены нормальные гибриды первого поколения от скрещивания диплоидных и тетраплоидных форм райграса.

И, наконец, еще одно важное достоинство использования питательных сред. В пробирке удастся слить воедино соматические клетки разных видов. Для этого, правда, их приходится беззастенчиво «раздевать» — освобождать от оболочки с помощью специальных ферментов. После этой процедуры мы имеем дело уже не с клеткой, а с протопластом. Протопласты двух видов кидают в один протопласт - гетерокариот, который через некоторое время обзаводится новой «одежкой». Так удастся объединять даже животные клетки с растительными, например клетку табака с обнаженной клеткой дрожжевой клетки. Надо сказать, что такие клетки,

хотя и пытаются делиться, но впустую. К делению способны пока лишь слитые клетки видов в пределах одного рода, изредка - различных родов и семейств. Но как знать! Со временем будет преодолена и эта несовместимость, и селекционеры получают гибриды, которые им и во сне не снились.

К настоящему времени удалось совместить протопласты и получить соматические гибриды картофеля и томата, правда, с мизерным урожаем плодов и клубней. А вот соматическая гибридизация устойчивых к болезням и вредителям диких диплоидных видов картофеля ($2x$) с культурными диплоидными ($2x$) может представить практический интерес: $2x + 2x = 4x$ - это как раз оптимальный уровень пloidности у картофеля. Неожиданны результаты канадца, который получил гетерокариотические (с совмещенными ядрами) клетки из слившихся протопластов сои и табака сизого (табачного дерева), способные к делению, и линии клеток сои и табака с синхронным делением хромосом. При использовании культуры клеток и тканей удастся быстро размножить новый сорт, если культуру в производстве размножают вегетативно, или линию для производства гибридных семян у овощных, декоративных и других возделываемых растений. Чаще всего размножают (клонировуют) верхушки побегов (такое размножение не совсем точно называют культурой меристемы - ведь, кроме последней, в процесс включаются и другие элементы) и латеральную (боковую) меристему - образовательную, интенсивно делящуюся ткань. Возрастает использование культур тканей для клонирования соцветий, цветков, боковых почек, листьев и корней, культуры каллуса и в отдельных случаях культуры клеток. У спаржи для размножения наиболее пригодны верхушки побегов, у пасленовых и краснокочанной капусты - кусочки (экспланты) листа, у цветной капусты и нарцисса - частички соцветий, у лилейных, ирисовых (касатиковых) и амариллисовых - экспланты из луковиц, клубней, ризомов (коротких мясистых корневищ), листьев, соцветий и семян, у птицемлечника - экспланты из стебля, листьев, завязи, чашелистиков и даже луковичной чешуи, у глоксинии - высечки из листьев и цветоножек, у лука порея - кусочки луковицы, у герани при получении диплоидных растений - экспланты пыльников. Наиболее экономически выгодно размножение в культуре тканей селекционных сортов цветов: орхидей, агав, бегоний, хризантем, цикламена, драцены, ириса, лилий, нарцисса, флокса и других. Новой областью применения клонирования в стерильной среде верхушек побегов и других эксплантов стало размножение пород кустарников, плодовых культур и ананаса. Из каллуса от зубчиков чеснока получили безвирусные растения. Экономически оправдано размножение методом стерильной культуры гетерозисных гибридных семян овощных и декоративных культур.

Культура тканей растений, главным образом верхушек побегов (меристем), играет очень важную роль в освобождении семенного материала от вирусов. Цветоводы первыми обнаружили, что растения, выращенные не из клубней или луковиц, а из делящихся клеток, помещенных в питательную среду, вирусными болезнями, как правило, не поражены и дают здоровое вегетативное потомство клубней и луковиц. Этот прием взяли на вооружение и картофелеводы-семеноводы. Получение свободных или, вернее, почти свободных от вирусов растений - обычный прием первичного семеноводства некоторых сельскохозяйственных культур: картофеля, клевера, люцерны и хмеля, овощных (хрена, ревеня, шампиньона, цветной капусты), плодовых культур (малины, красной и черной смородины, яблони, сливы), а также декоративных растений (хризантемы, гвоздики, пеларгонии, фрезии, цимбидиума, гортензии, нарцисса, лилии, гиацинта, ириса, тюльпана, гладиолуса).

Кроме того, оказалось, что клетки растений, растущие в культуре, синтезируют вещества, которые не обнаруживаются в целом растении, что расширяет возможность получения специфических гормонов, ферментов, алкалоидов и других веществ.

Словарь терминов по курсу «Основные принципы производства биотехнологических препаратов»

1. *In vitro* – выращивание растительных объектов «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) на искусственных питательных средах в асептических условиях (Бутенко, 1999).
2. *In vivo* – выращивание живого материала в естественных условиях (Шевелуха и др., 1998).
3. Амфимиксис – обычный тип полового процесса, при котором зародыш образуется в результате слияния женской и мужской гамет с последующей кариогамией (Гуляев, Мальченко, 1975).
4. Анеуплоид – ядро, клетка, организм с числом хромосом, отклоняющимся от $X \cdot 3 \cdot X$ от чисел, кратных X (Чайлахян и др., 1982).
5. Апомиксис – замена полового размножения не половым процессом, при котором образуется жизнеспособный зародыш и развивается новый организм без слияния мужской и женской гамет. Апомиксис подразделяют на партеногенез, апогамию и адвентивную эмбрионию (Гужов и др., 1999).
6. Ауксины – фитогормоны, преимущественно индольной природы: индолилуксусная кислота и ее производные, активирующие рост отрезков coleoptилей, стеблей и корней, вызывающие тропические изгибы, а также стимулирующие образование корней у черешков растений (Чайлахян и др., 1982).
7. Биотехнология – (от греческого *bios*– жизнь, *techné*– искусство, мастерство и *logos*– учение), использование биологических процессов и систем в различных областях сельского хозяйства, промышленности и медицины; научное направление, объединяющее возможности биологии и техники. *Биотехнология* наука о применении биологических процессов и систем в производстве (Пирузян, 1988).
8. Вектор (лат. *vehere*– вести) – вирус или плаزمид, в которые включается ген для переноса в клетку (Рейвн и др., 1990).
9. Гаметогенез – процесс образования гамет. Мужские гаметы образуются вследствие микрогаметогенеза, женские – макрогаметогенеза (Гуляев, Мальченко, 1975).
10. Гаплоид – ядро, клетка, организм, характеризующиеся одним набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду. Представлен в гаплофазе (символ n) (Чайлахян и др., 1982).
11. Генетическая инженерия – использование генетико-инженерных методов для создания организмов с новыми, полезными для человека свойствами (Гужов и др., 1999).
12. Генная инженерия – один из вариантов генетической инженерии, когда генетико-инженерные манипуляции осуществляют на уровне отдельных генов или их фрагментов (Гужов и др., 1999).
13. Гетерозис – увеличение мощности и жизнеспособности гибридов первого поколения по сравнению с родительскими формами (Гужов и др., 1999).

14. Гиббереллины – фитогормоны, преимущественно производные флюороенового ряда – гибберелловая кислота и другие гиббереллины, индуцирующие или активирующие рост стеблей растений, вызывающие прорастание семян и образование партенокарпических плодов, нарушающие период покоя у многих растений, а также индуцирующие цветение длиннодневных видов (Чайлахян и др., 1982).
15. Гипокотиль – часть зародыша или проростка между семядолями и зародышевым корешком (Рейвн и др., 1990).
16. Гистогенез процесс образования в культуре тканей и клеток тканевых элементов ксилемы (ксилемогенез), флоэмы (флоэмогенез) (Чайлахян и др., 1982).
17. Дедифференциация – переход специализированных клеток к пролиферации и неорганизованному каллусному росту (Бутенко, 1999)
18. Диплоид – ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида. Характерен для соматических клеток, находящихся в диплофазе (символ $2n$) (Чайлахян и др., 1982).
19. Инокулюм – часть клеточной суспензии, используемая для переноса в свежую среду (Бутенко, 1999).
20. Интегумент – наружный слой или слои клеток, покрывающие нуцеллус семязачатка; развивается в семенную кожуру (Рейвн и др., 1990).
21. Каллус – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений (Чайлахян и др., 1982).
22. Культура (culture) – клетки или организмы, выращенные в искусственных условиях (Дрыгин и др., 1990).
23. Культура «привыкших» тканей – выращивание тканей, возникших путем дедифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей. Основным признаком «привыкших» культур является способность к росту на питательной среде без фитогормонов (Чайлахян и др., 1982).
24. Культура суспензионная или культура клеток – выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание (Чайлахян и др., 1982).
25. Культура тканей растений – область биологии, изучающая клетки, ткани и органы, изолированные от растения и выращиваемые на искусственных питательных средах, *in vitro* (в стекле) (Чайлахян и др., 1982).
26. Морфогенез – процесс формообразования, т. е. заложения, рост и развитие органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез или клеточная дифференцировка) у растений (Чайлахян и др., 1982).
27. Морфогенез *in vitro* – развитие формы или структур при регенерации в культуре тканей (Чайлахян и др., 1982).
28. Нативный (от лат. *nativus* – врожденный) – естественный, натуральный, не поврежденный при исследовании.
29. Нуцеллус (лат. *nucella* – орешек) – ткань, образующая основную массу молодого семязачатка, в которой развивается зародышевый мешок (Рейвн и др., 1990).

30. Органогенез *in vitro*– образование органов в культуре ткани и клеток *denovo*, а не из предшествующих инициалей, корней и почек (Чайлахян и др., 1982).
31. Партеногенез (греч. *parthenos*– девственница, *genus*– происхождение) – развитие зародыша без оплодотворения (Тырнов, 2000).
32. Плазмиды – внехромосомные, автономно реплицирующиеся в клетках бактерий фрагменты ДНК (Атанасон. 1993).
33. Поликросс – множественное скрещивание (Гуляеп, Мальченко, 1975).
34. Полиплоидия – увеличение числа полных гаплоидных наборов хромосом в клетке свыше диплоидного (Чайлахян и др., 1982).
35. Прокариоты – организмы (бактерии и сине–зеленые водоросли), у которых генетический материал представлен молекулой (молекулами) ДНК, прямо включенной в цитоплазму в виде одного или нескольких нуклеотидов (Гуляев, Мальченко, 1983).
36. Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих (Чайлахян и др., 1982).
37. Протопласт – у растений клетка, лишенная оболочки (Рейвн и др., 1990).
38. Регуляторы роста и развития – органические соединения иного типа, чем питательные вещества, вызывающие стимуляцию или ингибирование процессов роста и развития растений. Регуляторами роста и развития являются как природные вещества, так и синтетические препараты, применяемые при обработке сельскохозяйственных культур (Чайлахян и др., 1982).
39. Ростовые вещества – фитогормоны, стимулирующие рост растений: ауксины, гиббереллины, цитокинины, а также природные соединения негормональной природы, стимулирующие рост растений: некоторые фенолы, производные мочевины, витамины и другие вещества (Чайлахян и др., 1982).
40. Сельскохозяйственная биотехнология – любая технология, использующая живые организмы или их части для создания или модификации продуктов, улучшения растений или животных, а также создания микроорганизмов для специального применения (James. 1991).
41. Соматональные вариации и варианты – фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных цитоплазматических геномов культивируемых клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменения в структуре генов, хромосом, геномов) (Бутенко, 1999).
42. Соматический эмбриогенез – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток путем, напоминающим нормальный зиготический эмбриогенез (Чайлахян и др., 1982).
43. Субкультивирование – перенос транспланта или инокулюма в культуральный сосуд на свежую питательную среду (Бутенко. 1999).
44. Тетраплоид организм, имеющий в клетках тела четыре основных набора хромосом – 4х. Если генотип тетраплоида представлен удвоенным диплоидным набором хромосом одного и того же вида – автетраплоид, если тетраплоид произошел вследствие

соединения и удвоения геномов различных видов аллотетраплоид или амфидиплоид (Гуляев, Мальченко, 1975).

45. Тотипотентность – свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т. е. реализовать омнипотентность ядра с образованием целого организма (Чайлахян и др., 1982).
46. Трансплант – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую среду (Бутенко, 1999).
47. Трансплантат – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую Среду (Чайлахян и др., 1982).
48. Фитогормоны, или гормоны растений – соединения, образующиеся в малых количествах в одной части растения, обычно транспортирующиеся в другую его часть и вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект (Чайлахян и др., 1982).
49. Цибрид – растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом (Бутенко. 1999).
50. Цитокинины – фитогормоны, главным образом производные пуринов, активирующие деление клеток и прорастание семян, а также способствующие заложению почек у целых растений и в культуре изолированных растительных тканей (Чайлахян и др., 1982).
51. Эксплант – фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса (Бутенко, 1999).
52. Экспрессия гена – проявление генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака (Шевелуха и др.. 1998).
53. Эмбриогенез– развитие зародыша (Рейвн и др., 1990).
54. Эукариоты – организмы, клетки которых имеют ядро, органеллы, ограниченные мембранами, и хромосомы, состоящие на ДНК и белков (Рейвн и др., 1990).
55. Ювенильный период – характеризуется формированием вегетативных органов (листьев, стеблей, корней). Его иногда называют виргинальным (девственным), отмечая тем самым неподготовленность растений к плодоношению (Куперман. 1977).