

Белорусский государственный университет



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

А.Л. Толстик

« 15 » апреля 2014 г.

Регистрационный № УД -978/баз.

Культуры эукариотических клеток

**Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности:**

1-31 01 01 Биология (по направлениям)

направления специальности

1-31 01 01-01 Биология (научно-производственная деятельность)

2014 г.

СОСТАВИТЕЛЬ:

Татьяна Ивановна Дитченко, доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Елена Владимировна Спиридович, заведующая сектором прикладной биохимии Государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», кандидат биологических наук, доцент;

Ольга Борисовна Русь, доцент кафедры молекулярной биологии Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент

РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ:

Кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений Белорусского государственного университета (протокол № 16 от 20 марта 2014 г.);

Научно-методическим советом Белорусского государственного университета (протокол № 4 от 01 апреля 2014 г.)

Ответственный за редакцию: Татьяна Ивановна Дитченко

Ответственный за выпуск: Татьяна Ивановна Дитченко

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Методы клеточной биологии находят все большее распространение в различных областях современных фундаментальных и прикладных исследований. Одним из наиболее используемых является метод культивирования клеток человека, животных и растений, получивших широкое распространение во второй половине XX века. В настоящее время можно культивировать клетки практически всех тканей и органов человека, животных и растений.

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях, что позволяет использовать ее в качестве уникальной экспериментально созданной биологической системы. Такая система может служить модельным объектом для изучения многих биохимических и физиологических процессов. Разработка методов длительного культивирования позволяет формировать банки клеточных линий, обладающих определёнными генетическими и биохимическими свойствами.

Культура клеток и тканей применяется для решения, как фундаментальных теоретических проблем, так и различных практических задач, особенно в области медицины. Этот метод – неотъемлемая составная часть генной инженерии, клеточной инженерии, клонирования и других направлений экспериментальной биологии. Поэтому получение знаний о возможностях культивирования *in vitro* клеток растений, животных и человека является важным компонентом подготовки студентов-биологов направления научно-производственная деятельность.

Предметом курса «Культуры эукариотических клеток» являются принципы и методы культивирования *in vitro* клеток и тканей растений, животных и человека, а также биотехнологии на их основе.

Цель курса – освоение студентами теоретических основ и методических принципов получения и ведения культур клеток растений и животных, а также ознакомление с фундаментальными и прикладными аспектами использования культивируемых *in vitro* клеток и тканей.

В задачи дисциплины входит изучение методов получения и физиолого-биохимических основ поддержания в условиях *in vitro* культур клеток и тканей растений, животных и человека, а также направлений их биотехнологического и биомедицинского использования.

В результате изучения дисциплины обучаемый должен:

знать:

- способы поддержания условий асептики при работе с культурами клеток растений, животных и человека;
- технику введения в культуру *in vitro* изолированных клеток растений, животных и человека;
- способы и системы культивирования клеток и тканей растений, животных и человека;
- биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений и животных;

- биомедицинские аспекты применения культур клеток человека и животных;

уметь:

- осуществлять выбор систем и способов культивирования клеток растений и животных в зависимости от целей исследования;

- применять знания об особенностях культивируемых клеток при осуществлении биотехнологических процессов на их основе;

владеть:

- техникой работы в асептических условиях;

- методами учета показателей роста клеточных культур, оценки жизнеспособности и морфологических характеристик культивируемых клеток.

Учебная программа составлена с учетом межпредметных связей и содержанием учебных программ по смежным дисциплинам «Цитология и гистология», «Ботаника», «Зоология», «Анатомия человека» и др.

Программа учебной дисциплины рассчитана на 88 часов, в том числе 44 часа аудиторных: 28 – лекционных, 12 – лабораторных занятий, 4 – аудиторного контроля управляемой самостоятельной работы.

ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

№ п/п	Наименование разделов, тем	Количество часов				
		Аудиторные				Самост. работа
		Лекции	Практ., семинар.	Лаб. занятия	УСР	
1	Введение	2	–	–	–	2
2	Обеспечение асептических условий в технологии культур клеток растений и животных	2	–	2	–	4
3	Культуры растительных клеток и тканей					
3.1	Физиолого-биохимические основы культивирования клеток растений	2	–	2	–	4
3.2	Способы получения и культивирования клеток растений	4	–	6	–	6
3.3	Направления использования культур клеток и тканей растений	6	–	–	2	10
4	Культуры клеток животных и человека					
4.1	Типы культур животных клеток	2	–	–	–	4
4.2	Физиолого-биохимические основы и системы культивирования клеток животных и человека	4	–	2	–	6
4.3	Направления использования культур клеток животных и человека	6	–	–	2	10
	ИТОГО:	28	–	12	4	44

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

1. ВВЕДЕНИЕ

Понятие «культуры клеток». Предмет и задачи курса. Принципы культивирования *in vitro* клеток растений и животных: соблюдение условий асептики, использование искусственных питательных сред. Каллусные и суспензионные культуры растительных клеток. Монослойные и суспензионные культуры как основные варианты культивирования животных клеток.

Использование культур клеток растений и животных для решения фундаментальных задач биологии. Биотехнологии на основе культур клеток и тканей растений. Биотехнологии на основе культур клеток животных.

История развития методов культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений. История развития методов культивирования клеток животных и человека.

2. ОБЕСПЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ В ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Условия асептики при выполнении работ с культурами клеток растений и животных. Методы стерилизации.

Стерилизация рабочего помещения, требования к рабочему персоналу.

Ламинар-боксы, варианты подачи воздуха в рабочем объеме, классы биологической безопасности (защита окружающей среды, продукта, оператора). Техника работы в ламинар-боксе.

Способы стерилизации культуральной посуды, инструментов, материалов и др. Стерилизация питательных сред. Режимы автоклавирования питательных сред для культур растительных и животных клеток. Стерилизующая фильтрация термолабильных компонентов питательных сред.

Контроль стерильности и контаминации культур растительных и животных клеток.

3. КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

3.1. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Общие требования к лаборатории по культивированию растительных клеток и тканей.

Питательные среды. Основные компоненты питательных сред и их назначение при культивировании изолированных клеток и тканей растений: макроэлементы, микроэлементы, источник углерода, витамины, регуляторы роста. Роль фитогормонов ауксиновой и цитокининовой природы в процессе получения и поддержания клеточных культур.

Дополнительные компоненты питательных сред. Примеры питательных сред, используемых при культивировании растительных клеток.

Физические условия культивирования. Влияние светового, температурного режимов, аэрации, влажности воздуха на физиологическое состояние изолированных клеток и тканей растений.

Цикл выращивания клеточных культур. Фазы ростового цикла культур клеток и тканей, их характеристика. Продолжительности циклов выращивания каллусных и суспензионных культур, необходимость регулярного субкультивирования клеток и тканей растений.

3.2. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Каллусные культуры. Этапы процесса получения каллусных тканей *in vitro*. Выбор экспланта. Антисептики, используемые при стерилизации растительных тканей. Техника стерилизации растительного материала при введении в культуру *in vitro*. Механизм каллусогенеза. Дедифференцировка клеток. Двойной гормональный контроль деления растительных клеток.

Типы каллусных культур и их характеристика. Способы получения каллусов рыхлого типа. Направления использования каллусных тканей в фундаментальных исследованиях и биотехнологии.

Суспензионные культуры. Основные преимущества культивирования клеточных суспензий по сравнению с каллусными культурами. Способы получения суспензионных культур. Этапы получения суспензионной культуры.

Типы клеточных суспензий в зависимости от их состава. Факторы, влияющие на степень агрегированности суспензионных культур. Способы культивирования клеточных суспензий: накопительное и непрерывное. Варианты выращивания суспензионных культур в полупроточном и проточном (закрытый и открытый) режимах. Препятствия к культивированию растительных клеток в проточном режиме.

Культивирование одиночных клеток. Цели культивирования одиночных клеток. Значение культуры одиночных клеток для доказательства тотипотентности растительной клетки. Этапы выращивания *in vitro* одиночных клеток. «Фактор кондиционирования». Методы культивирования одиночных клеток.

Культуры изолированных протопластов. Использование изолированных протопластов для решения теоретических и прикладных проблем биологии. Источники получения протопластов. Методы получения протопластов. Техника выделения протопластов. Определение жизнеспособности протопластов. Условия культивирования протопластов. Этапы развития протопластов. Слияние протопластов. Методы индукции слияния протопластов.

3.3. НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Получение биологически активных веществ из культур клеток растений. Проблемы использования традиционного лекарственного растительного сырья. Преимущества использования клеточных культур в качестве продуцентов БАВ по сравнению с интактными растениями. Перспективные направления использования культур растительных клеток для получения БАВ. Источники получения БАВ: суспензионные культуры, культуры трансформированных корней. Способы повышения продукции БАВ. Режимы культивирования растительных клеток в биореакторах. Этапы создания промышленных технологий получения БАВ с помощью культивируемых клеток растений.

Биотехнологии клонального размножения и оздоровления растений. Особенности клонального микрооразмножения растений по сравнению с традиционными методами вегетативного размножения растений. Его преимущества. Области применения клонального микрооразмножения. Использование технологии клонального микрооразмножения растений в Республике Беларусь.

Способы клонирования растений, их характеристика. Основные этапы технологии клонального микрооразмножения. Физиологические особенности регенерантов и необходимость в создании особых условий их адаптации *ex vitro*. Получение безвирусного посадочного материала. Метод культуры меристем, понятие «термо-» и «химиотерапии».

Клеточная инженерия растений. Понятие «клеточной инженерии». Технологии получения гибридных форм растений *in vitro*. Суть метода оплодотворения *in vitro* и его роль в получении межвидовых гибридов. Эмбриокультура. Гибридизация соматических клеток. Виды и примеры соматической ибридизации. Цибридизация. Перенос клеточных органелл в протопласты. Цели создания искусственных ассоциаций растительных клеток с микроорганизмами.

Генетическая трансформация растений. Наиболее важные прикладные проблемы, для решения которых осуществляется генетическая трансформация растений. Этапы получения трансгенных растений. Краткая характеристика метода агробактериальной трансформации и баллистического метода получения трансгенных растений.

Использование культур растительных клеток для сохранения генофонда растений. Особенности методов сохранения генофонда растений *in vitro*. Характеристика пересадочных коллекций. Депонирование культур клеток, тканей и органов растений. Основные этапы технологии криоконсервации растительных объектов.

4. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

4.1. ТИПЫ КУЛЬТУР ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Особенности культивирования клеток животных. Способы классификации культур клеток животных и человека. Типы культур клеток животных в зависимости от их происхождения (культуры фибробластов, лимфоцитов, эпителиальных, мышечных, нервных клеток и др.). Особенности культур клеток, полученных из эмбриональных и зрелых, нормальных и опухолевых тканей.

Первичные культуры и клеточные линии. Характеристики первичных культур. Этапы процесса получения первичной культуры. Способы дезагрегации тканей: механический и ферментативный. Трипсинизация.

Диплоидные штаммы клеток. Источники получения. Преимущества по сравнению с первичными культурами и постоянными линиями. Пассирование культур с ограниченным ростом. Трансформация клеток диплоидных штаммов в постоянные линии.

Признаки постоянных клеточных линий. Источники их получения. Преимущества постоянных клеточных линий. Примеры клеточных линий.

Типы культур животных клеток в зависимости от способа культивирования: монослойные и суспензионные.

4.2. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Питательные среды для культивирования клеток животных и человека. Ростовые и поддерживающие среды. Естественные питательные среды (коагуляты, биологические жидкости, тканевые экстракты и др.). Основные компоненты химически определенных питательных сред.

Среды, содержащие сыворотку, и бессывороточные питательные среды. Компоненты сыворотки. Роль сыворотки при культивировании клеток. Недостатки использования сыворотки при культивировании клеток животных. Преимущества бессывороточных питательных сред. Примеры наиболее широко используемых питательных сред для культивирования клеток животных и человека.

Буферные свойства питательных сред. Диапазоны pH при культивировании клеток животных. Осмотическое давление питательных сред.

Состав газовой фазы при культивировании клеток животных, факторы его определяющие. Температурный режим культивирования.

Монослойные культуры: стационарные и роллерные. Типы клеток животных и человека, выращиваемые в монослойной культуре. Преимущества и недостатки монослойных культур. Типы субстратов и их характеристики, способы модификации поверхности. Механизм адгезии животной клетки к субстрату. Факторы адгезии. Роллерное культивирование, его преимущества по сравнению со стационарными монослойными культурами.

Суспензионные культуры, их преимущества. Типы клеток животных и человека, выращиваемые в суспензионной культуре. Псевдосуспензионное культивирование. Использование микроносителей, их типы, технологическая форма.

4.3. НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Получение биологически активных веществ с помощью культур клеток животных. Преимущества и недостатки культур животных клеток в качестве продуцентов БАВ по сравнению с микроорганизмами.

Репродукции вирусов и получения вирусных вакцин для человека и животных. Техника получения вирусных вакцин на основе куриных эмбрионов (метод овокультур). Техника получения вирусных вакцин на основе почечных тканей (вакцина Солка).

Получение моноклональных антител. Направления использования моноклональных антител. Гибридомы. Этапы процесса создания гибридом. Способы культивирования гибридом (в асцитных жидкостях лабораторных животных, в условиях *in vitro*), их преимущества и недостатки.

Получение интерферона, гормонов человека, факторов роста и др.

Получение инсектопатогенных вирусов. Преимущества клеточных культур насекомых по сравнению с клетками млекопитающих.

Клеточная инженерия животных. Клонирование животных. История клонирования. Методы трансплантации ядер. Примеры клонированных животных.

Получение трансгенных животных, общая характеристика методов. Направления создания трансгенных животных: источники для производства фармацевтических белков, источники трансплантантов для человека, трансгенные животные, служащие источником пищи, модельные системы для изучения болезней человека и др.

Гибридизация клеток животных. Спонтанное и индуцированное слияние клеток. Методы создания химер (агрегационный и инъекционный). Примеры межвидовых гибридов, полученных методами клеточной инженерии.

Использования культур клеток животных и человека в медицине. Культуры клеток как альтернатива экспериментов на целых животных. Применение культуры клеток животных для тестирования и изучения механизма действия химических агентов. Изучение противоопухолевых химиотерапевтических веществ с помощью перевиваемых опухолей животных.

Диагностика и лечение наследственных заболеваний. Изучение перерождения нормальных клеток в опухолевые.

Свойства стволовых клеток, перспективы их применения. Создание клеточного материала для трансплантации.

Криоконсервация клеток.

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

ЛИТЕРАТУРА

О с н о в н а я:

1. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина [и др.]; под общ. ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.
2. Биотехнология биологически активных веществ / под ред. И.М. Грачевой, Л.А. Ивановой. – М.: Изд-во Элевар, 2006. – 453 с.
3. *Бутенко, Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М. : ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.
4. *Войнов Н.А.* Современные проблемы и методы биотехнологии: электрон. учеб. пособие / Н.А. Войнов [и др.]; под науч. ред. Т.Г. Воловой. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 418 с.
5. *Дитченко, Т.И.* Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций / Т.И. Дитченко. – Мн.: БГУ, 2007. – 107 с.
6. Животная клетка в культуре. Методы и применение в биотехнологии / под ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситькова. – М. : Компания Спутник, 2000. – 400 с.
7. Культура животных клеток. Методы / под ред. Ф. Фрешни. – М. : Мир, 1989. – 333 с.

Д о п о л н и т е л ь н а я:

1. Биотехнология растений: культура клеток / под ред. Р.Г. Бутенко. – М. : Агропромиздат, 1989. – 280 с.
2. *Валиханова, Г.Ж.* Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. – Алматы : «Конжык», 1996. – 272 с.
3. *Егорова, Т.А.* Основы биотехнологии: учеб. пособие / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М. : Изд. Центр «Академия», 2003. – 208 с.
4. *Ефимова Н.В.* Введение в прикладную биотехнологию / Н.В. Ефимова. – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2004. – 95 с.
5. *Першина Л.А.* Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений: учеб. пособие. Ч. 1. / Л.А. Першина. – Новосибирск : НГУ, 2000. – 46 с.
6. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин [и др.]. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.
7. *Цыренов, В.Ж.* Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных. Учебно-методическое пособие / В.Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 48 с.

И н т е р н е т - р е с у р с ы

1. Темников Д.А., Мезина З.Р. Обучающий интернет-курс «Основы культивирования клеток животных» – Казань: Казанский университет, 2003.
www.ksu.ru/nilkto/cell

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Для организации управляемой самостоятельной работы студентов по курсу следует использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа, конспект лекций, презентации лекций, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов, вопросы для самоподготовки, задания в тестовой форме для самоконтроля и др.).

Эффективность самостоятельной работы студентов целесообразно проверять в ходе текущего и итогового контроля знаний в форме устного опроса, контрольных работ, тестового контроля по темам и разделам курса.

ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ

Учебным планом специальности 1-31 01 01-01 Биология (научно-производственная деятельность) в качестве формы итогового контроля по учебной дисциплине рекомендован зачет.

Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами можно использовать следующий диагностический инструментарий:

- защита подготовленного студентом реферата;
- письменные контрольные работы по отдельным темам курса;
- устные опросы;
- тестирование.