

Т. И. Дитченко

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ ПРАКТИКУМ

Рекомендовано

*Учебно-методическим объединением
по естественно-научному образованию
в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования
по специальностям «биология», «биоинженерия
и биоинформатика», «биотехнология»,
«фундаментальная и прикладная биотехнология»*

УДК 602.6:58(075.8)(076.5)

ББК 30.16я73-5

Д49

Р е ц е н з е н т ы:

кафедра биологии и методики преподавания биологии
Белорусского государственного педагогического университета
имени Максима Танка (заведующий кафедрой
кандидат сельскохозяйственных наук *И. И. Жукова*);
кандидат сельскохозяйственных наук *Е. Л. Долгова*

Дитченко, Т. И.

Д49 Биотехнология растений : практикум : учеб.-метод. пособие /
Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2025. – 79 с. : ил.
ISBN 978-985-881-758-9.

Представлены лабораторные работы, отражающие методические подходы, используемые в биотехнологии растений. Описаны базовые методы получения и поддержания каллусных и суспензионных культур растительных клеток, генетически трансформированных корней, способы индукции морфогенеза *in vitro*.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям «биология», «биоинженерия и биоинформатика», «биотехнология», «фундаментальная и прикладная биотехнология».

УДК 602.6:58(075.8)(076.5)

ББК 30.16я73-5

ISBN 978-985-881-758-9

© Дитченко Т. И., 2025

© БГУ, 2025

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
БАП – 6-бензиламинопурин
ИМК – β -индолил-3-масляная кислота
ИПА – изопентиладенин
ИУК – β -индолил-3-уксусная кислота
НУК – α -нафтилуksусная кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
Среда МС – среда по прописи Мурасиге и Скуга
ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
СТАВ – цетилтриметилбромид аммония
DMPO – 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид
RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК
SDS – додецилсульфат натрия
ТЕ-буфер – Трис-ЭДТА буферный раствор

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология растений как самостоятельный раздел современной биотехнологии включает широкий круг направлений в области сельского и лесного хозяйства, декоративного цветоводства, фармацевтической промышленности, сохранения биоразнообразия и др. В ее задачи входит повышение эффективности растениеводства на основе клеточных и генно-инженерных технологий, использования биологических средств защиты растений от вредителей и болезней, применения ДНК-маркеров в селекционном процессе, микрклонального размножения новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур, производства оздоровленного посадочного материала и др. Важным направлением биотехнологии растений является получение вторичных метаболитов и рекомбинантных терапевтических белков с помощью культур клеток, тканей, органов и генетически модифицированных растений. Биотехнологические приемы используются для сохранения генофонда высших растений. На основе растительных объектов разрабатываются перспективные направления экологической биотехнологии, связанные с получением биотоплива, развитием технологий фиторе-медиации, методов биотестирования и биоиндикации.

Значительная роль в биотехнологии растений принадлежит методам культивирования *in vitro* изолированных протопластов, клеток, тканей, органов, эмбриоидов. В связи с этим основная задача лабораторного практикума – формирование у обучающихся навыков работы в асептических условиях с культурами клеток, тканей и органов растений. В учебно-методическом пособии описаны технологии получения и поддержания каллусных и суспензионных культур, а также культур генетически трансформированных корней. Рассмотрены особенности выделения ДНК из растительных объектов, использования молекулярно-генетических маркеров для выявления генетического полиморфизма у растений различных видов и сортов. Практикум включает исследовательские задачи, связанные с определением жизнеспособности, показателей роста и продуктивности культур растительных клеток и тканей, оценкой антиоксидантных свойств экстрактов, получаемых на их основе, а также индукцией различных путей морфогенеза *in vitro*.

Лабораторная работа 1

ТЕХНИКА РАБОТЫ В ЛАМИНАР-БОКСЕ

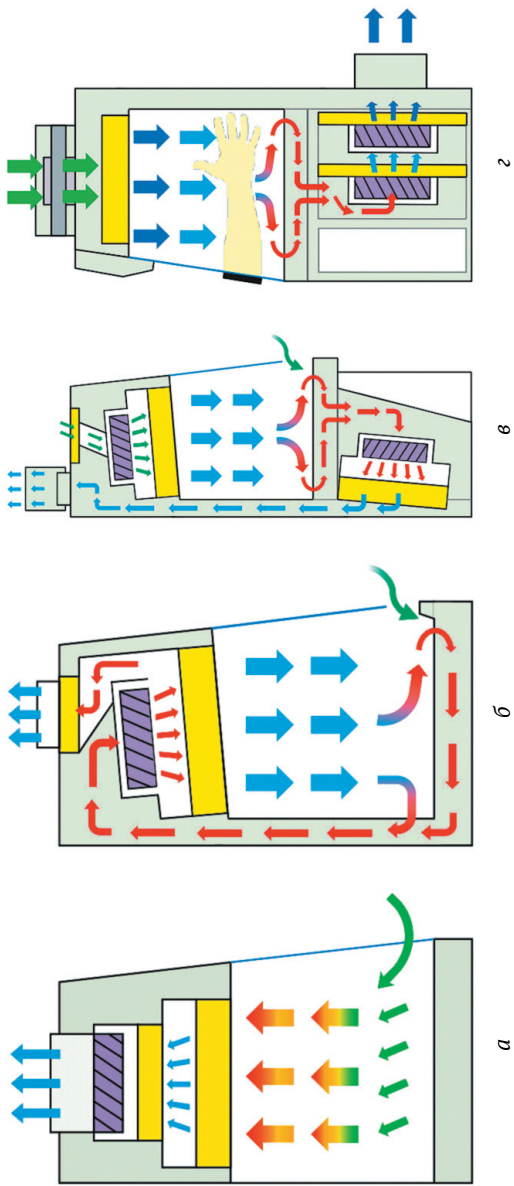
Цель: освоить технику работы в боксе биологической безопасности II класса.

Материалы и оборудование: бокс биологической безопасности II класса, колбы с простерилизованной агаризованной питательной средой, 70%-й и 96%-й этанол, стерильные чашки Петри, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, пинцет, скальпель, стерильная вата, герметизирующая пленка Parafilm.

Одним из условий успешного культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений является соблюдение строгой стерильности. Для работы с культурами клеток необходимо иметь специальные асептические помещения, в которых для создания локальных рабочих мест более высокого класса чистоты используют боксы биологической безопасности. Полы и стены комнаты, в которой ведутся стерильные работы, должны иметь покрытие, не сорбирующее пыль и легко моющееся. Помещение должно быть оснащено бактерицидными лампами.

В боксах биологической безопасности очистка воздуха осуществляется с помощью системы фильтров HEPA (High Efficiency Particulate Air) либо ULPA (Ultra-Low Particulate Air). HEPA-фильтры удаляют 99,95 % частиц размерами от 0,3 мкм. Эффективность ULPA-фильтров составляет 99,999 % для частиц более 0,12 мкм. Такие фильтры применяются в системах с самыми высокими требованиями к чистоте воздуха. В зависимости от лабораторных задач и соответствия требуемому уровню безопасности боксы биологической безопасности делятся на классы.

Боксы биологической безопасности I класса предназначены для защиты оператора и окружающей среды. Характеризуются наиболее простой конструкцией, не обеспечивают защиту от контаминации продукта, с которым проводится работа. Имеют рабочую камеру с открытым фронтальным окном, через которое осуществляется воздухозабор из внешней среды (рис., а). Внутренний вентилятор затягивает контаминированный воздух из рабочей зоны вверх. Опасные аэрозоли пропускаются через HEPA-фильтр на выходе из камеры. В отличие от обычного вытяжного шкафа бокс биологической безопасности I класса защищает окружающую среду, фильтруя воздух до его выпуска.



Боксы биологической безопасности:
 а – I класса; б – II класса (тип А); в – II класса (тип В2); г – III класса
 (стрелками зеленого цвета обозначен нестерильный воздушный поток,
 синего цвета – стерильный воздушный поток, прошедший через HEPA-фильтр)

Боксы биологической безопасности II класса разработаны для защиты оператора, окружающей среды и продукта. Их основное отличие заключается в том, что воздушный поток не поступает сразу в рабочую зону, а проходит через специальную воздухозаборную решетку, расположенную возле оператора, затем пропускается через НЕРА-фильтр и очищается от аэрозольных частиц. Защита продукта осуществляется благодаря тому, что в рабочую камеру непрерывно подается однопоточный (ламинарный или нетурбулентный) поток стерильного воздуха. Нисходящий воздушный поток не создает перекрестной контаминации продуктов в рабочей камере за счет отсутствия в нем завихрений.

В боксах биологической безопасности II класса типа А за пределы рабочей камеры выходит 30 % общего воздушного потока, 70 % возвращается в рециркуляционную систему и формирует нисходящий поток (рис., б). При эксплуатации боксов типа А в них создаются зоны повышенного давления, а выходящий воздух поступает в рабочее помещение. В боксах типа А1 зоны повышенного давления непосредственно граничат с окружающей средой. Боксы типа А2 оснащены специальными зонами пониженного давления, окружающими зоны повышенного давления. При непредвиденных ситуациях воздух из контрольной зоны повышенного давления, содержащий потенциально опасные вещества, не попадает наружу, а задерживается зоной низкого давления. Очень важно правильно выбрать место для установки в лаборатории бокса биологической безопасности. В связи с тем, что скорость потока входящего воздуха у фронтального стекла бокса в большинстве случаев составляет примерно 0,45 м/с, целостность воздушного потока может быть нарушена колебаниями воздуха, возникающими при передвижении людей по лаборатории, открывании и закрывании дверей, сквозняке из окон и т. п. Идеальное расположение ламинар-бокса – вдали от путей перемещения персонала и вне всевозможных возмущений воздушных потоков. В настоящее время боксы биологической безопасности типа А2 наиболее широко применяются в клинических и санитарно-гигиенических лабораториях, тогда как боксы типа А1 считаются устаревшими.

Ламинарные боксы биологической безопасности II класса типа В подключены к наружному вытяжному устройству (рис., в). В боксах типа В1 70 % воздуха выводится наружу, а 30 % – возвращается в систему. Шкафы II класса типа В2 не оснащаются системой рециркуляции. Все воздушные потоки, проходящие через фильтры, выводятся наружу и не используются повторно. Отсутствие рециркуляции обеспечивает еще более высокий уровень защиты, поэтому боксы типа В2 рекомендованы к применению в работе с токсичными химическими веществами.

Боксы биологической безопасности III класса обеспечивают самый высокий уровень защиты. Оборудование имеет герметичную камеру, а для

проведения манипуляций в рабочей зоне используется пара перчаток (рис., 2). Перчатки присоединяются к камере через специальные герметичные порты. Очищенный выходящий поток направляется в помещение лаборатории или удаляется за пределы здания через вентиляционные каналы. В рабочей камере создается пониженное давление, что является дополнительной гарантией безопасности работы с химикатами и биологическими агентами. В оборудовании данного типа можно производить исследования с образцами всех категорий опасности, в том числе с особо опасным микробиологическим материалом, вирусами, радиоизотопами, канцерогенами. Данный тип оборудования относится к лабораторным изоляторам.

Ход работы

Включите бокс биологической безопасности II класса как минимум за 5 мин до начала работы с целью удаления контаминированного воздуха из рабочей камеры. Оператор, приступающий к работе, должен быть в чистом халате, желательно в сменной обуви либо бахилах. Перед началом работы необходимо тщательно вымыть руки с мылом, обработать 70%-м этанолом, антисептический эффект которого обусловлен денатурацией структурных и ферментных белков микроорганизмов. Для соблюдения максимальной стерильности могут быть использованы медицинские перчатки, которые также протирают этанолом.

Разместите в ламинар-боксе все необходимые инструменты и материалы. Предметы, вносимые в рабочую камеру, а также рабочая поверхность должны быть обработаны 70%-м этанолом. Рабочая зона не должна быть переполнена, а воздухозаборная решетка в передней и задней частях устройства не должна быть закрыта посторонними предметами, чтобы не снизить эффективность воздушного потока. После размещения необходимого оборудования отключите фильтры и включите УФ-лампу. Продолжительность бактерицидной обработки внутреннего объема ламинар-бокса составляет 15–20 мин. После выключения УФ-лампы запустите воздушный поток и приступите к работе через 1–2 мин для удаления остатков озона.

Рекомендуется выполнять работы на центральной части рабочей поверхности. Таким образом оператор не будет создавать препятствий движению воздуха и обеспечит себе оптимальную видимость через стеклянную смотровую панель. Основное правило работы в ламинар-боксе с вертикальным потоком воздуха заключается в том, что нельзя проносить руки либо нестерильные предметы над открытой стерильной поверхностью культуральных сосудов. Стерильный инструмент (пинцет, скальпель, микробио-

логическая петля и др.) используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным применением его следует снова простерилизовать.

Металлические инструменты можно стерилизовать с помощью электрического стерилизатора. В случае его отсутствия проводят фламбирование: инструмент окунают в емкость с 96%-м этанолом и затем обжигают в пламени спиртовки. При такой стерилизации необходимо соблюдать особую осторожность. Перед использованием инструментам необходимо дать остыть, чтобы не травмировать растительные объекты.

Колбы и другие сосуды, закрытые крышками из фольги, открывают следующим образом: фольгу обжигают, пронося горло сосуда над пламенем спиртовки, затем осторожно разворачивают края фольги с помощью стерильного пинцета и снимают ее. После окончания работы стерильным пинцетом берут крышку из фольги, обжигают с двух сторон и закрывают горло колбы.

Руководствуясь изложенными выше рекомендациями, проведите розлив простерилизованной питательной среды по чашкам Петри либо стерильную работу с культурами клеток, тканей, органов растений.

По окончании работы произведите тщательную уборку ламинар-бокса. Рабочую поверхность и внутренние стенки протрите 70%-м этанолом. Удалите из бокса использованные материалы и оборудование во избежание контаминации, связанной с размножением микроорганизмов. Прежде чем выключить бокс, рекомендуется оставить его в рабочем состоянии в течение еще 5 мин, чтобы удалить находящийся в нем воздух. Кроме того, можно простерилизовать рабочую камеру с помощью УФ-лампы.

Контрольные вопросы

1. Какие конструктивные особенности имеют боксы биологической безопасности I, II и III классов?
2. Для каких целей используют боксы биологической безопасности разных классов?
3. Каким образом осуществляется подготовка к работе ламинар-бокса?
4. Какие правила необходимо соблюдать при работе в боксе биологической безопасности?

Лабораторная работа 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПО ПРОПИСИ МУРАСИГЕ И СКУГА

Цель: ознакомиться с составом питательной среды МС и порядком ее приготовления.

Материалы и оборудование: NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KJ , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мезоинозит, глицин, никотиновая кислота, пиридоксин- HCl , тиамин- HCl , сахароза, 2,4-Д, ИУК, кинетин, дистиллированная вода, 0,1 н раствор HCl , 0,1 н раствор KOH , аналитические весы, pH-метр, лотки для взвешивания, шпатели, химические стаканчики, мензурки, склянки для хранения растворов, автоматические дозаторы на 1–10 мл, 100–1000 мкл, 1–20 мкл, наконечники для автоматических дозаторов.

Компоненты питательной среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на следующие группы: макроэлементы, микроэлементы, источник углерода, витамины, фитогормоны и их синтетические аналоги.

Минеральная основа питательных сред содержит необходимые для нормальной жизнедеятельности растительных клеток макро- и микроэлементы. Макроэлементы представлены соединениями азота в виде нитратов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; растворимыми солями калия, кальция и магния. Набор микроэлементов, присутствующих в составе питательных сред, включает медь, кобальт, цинк, марганец, молибден, йод, бор и др. Железо используется в виде хелатов с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) или ее натриевой солью $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (трилон Б). В такой форме железо наиболее доступно для усвоения растительными клетками в широких пределах pH.

Выращиваемые в темноте культуры растительных клеток являются гетеротрофами, поэтому нуждаются в источнике углерода и энергии в виде готового органического вещества. С этой целью в питательные среды добавляют углеводы, обычно – сахарозу в концентрации 2–3 %, или 20–30 г/л, реже – моносахариды: гексозы (глюкозу и фруктозу), пентозы (ксилозу и др.). Полисахариды в питательных средах практически не используются. Углеводы добавляют в питательные среды даже в случаях культивирования каллусов на свету и приобретения ими характерной для фотосинтезирующих тканей зеленой окраски, поскольку такие культуры

являются фотомиксотрофными и неспособны полностью обеспечивать себя углеводами за счет фотосинтеза.

Для стимуляции биохимических реакций в культивируемых растительных клетках используют витамины группы В (В₁ (тиамин), В₆ (пиридоксин)), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит, биотин, рибофлавин, пантотеновую кислоту. Большинство витаминов термостабильны, однако аскорбиновая кислота может разрушаться при автоклавировании, поэтому для ее растворов используют стерилизующую фильтрацию.

Для индукции каллусогенеза и пролиферации клеток в культуре *in vitro* в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины и цитокинины. На средах без гормонов растут опухолевые либо «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим классам регуляторов роста или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать значительное количество ауксинов и цитокининов.

В качестве источников ауксинов в питательных средах наиболее часто используют 2,4-Д, НУК, ИУК, ИМК. Для индукции каллусогенеза обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще 2,4-Д), но при последующих пересадках их уменьшают. 2,4-Д и НУК являются синтетическими ауксинами. ИУК быстро окисляется под действием ИУК-оксидазы, присутствующей во всех растительных клетках, поэтому ее редко включают в состав питательных сред в качестве единственного ауксина.

В качестве цитокининов питательные среды могут содержать кинетин (N⁶-фурфуриламинопурин), 6-бензиламинопурин (БАП), N⁶-2-изопентиладинин (ИПА), зеатин, тидиазурон (N-фенил-N-1,2,3-тидазолил-5-мочевина). БАП и кинетин являются синтетическими цитокининами. Зеатин термолабилен, поэтому его растворы стерилизуют путем микрофльтрации.

Кроме ауксинов и цитокининов, отдельные питательные среды включают гиббереллины. Их присутствие в среде не является обязательным, но в некоторых случаях данные гормоны стимулируют рост каллусной ткани либо суспензионных культур при низкой плотности клеток. Гиббереллины термолабильны.

В качестве органических добавок могут быть использованы дополнительные источники азота, в частности отдельные аминокислоты (глицин, аланин, аргинин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и др.) либо гидролизат казеина. Другие органические добавки неопределенного состава (жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), экстракт эндосперма каштана, солодовый экстракт, дрожжевой экстракт, картофельный отвар и др.) используются достаточно редко. Однако в некоторых случаях их присутствие в питательной среде обеспечи-

вает более высокую скорость прироста биомассы культур либо повышает эффективность морфогенеза.

Для культивирования растительных клеток и тканей *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. Агаризованные среды готовят на основе агар-агара, который образует с водой гель, плавящийся при 100 °С и затвердевающий при 45 °С. Обычно концентрация агар-агара в среде составляет 0,7–0,8 %. Желательно использовать агар высокой степени очистки, специально предназначенный для культивирования растительных клеток. В качестве желирующего агента также может выступать Phytigel™ в концентрации 0,2–0,3 %. Образует прозрачный, бесцветный, высокопрочный гель. Состоит из глюкуроновой кислоты, рамнозы и глюкозы. Получают Phytigel™ в результате бактериальной ферментации.

Кислотность питательных сред – важный фактор, определяющий эффективность культивирования. Обычно pH приготовленной среды составляет 5,6–5,8. Уменьшение pH приводит к тому, что после автоклавирования агаризованная среда плохо застывает.

Среда МС является наиболее универсальной и многоцелевой, пригодной для культивирования клеток и тканей многих видов растений. Она была предложена Тошио Мурасиге и Фольке Скугом в 1962 г. для каллусной ткани табака сорта «Висконсин». Содержит минеральную основу, витамины и органические добавки, тогда как регуляторы роста подбираются индивидуально для каждой конкретной культуры. Варьировать может и концентрация сахарозы в зависимости от целей эксперимента. Отличительной особенностью питательной среды МС является высокое содержание аммонийного и нитратного азота. Состав питательной среды МС приведен в таблице. Для приготовления питательной среды МС используют концентрированные маточные растворы отдельных компонентов либо готовую смесь в виде порошка.

Состав питательной среды МС

Компонент	Концентрация, мг/л
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
Na ₂ ЭДТА · 2H ₂ O	37,3
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3

Окончание таблицы

Компонент	Концентрация, мг/л
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
H_3BO_3	6,2
KJ	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Пиридоксин-HCl	0,5
Никотиновая кислота	0,5
Тиамин-HCl	0,1
Мезоинозит	100
Глицин	2

И с т о ч н и к: *Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.*

Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10 раз (обозначение М×10), микросолей – в 100–1000 раз (обозначения М×100 и М×1000), витаминов – в 1000 раз (обозначение ×1000). Их хранят в специальных условиях: в холодильнике в плотно закрытых сосудах при 0...+4 °С либо в морозильной камере при –20 °С в небольших (по 5–10 мл) флаконах.

Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде. Каждую из макро- и микросолей растворяют отдельно, затем сливают в мерную посуду и доводят дистиллированной водой до нужного объема. В смесь макросолей последним добавляют раствор солей магния, а в микросоли – раствор солей молибдена (для предотвращения выпадения осадка). Маточный раствор хелата железа готовят и хранят отдельно от других солей. Компоненты растворяют по отдельности, затем соединяют, подогревают смесь, не доводя до кипения, до образования раствора темно-желтого цвета. Неправильное приготовление хелатного железа может привести к выпадению в осадок после автоклавирования фосфатов кальция и магния.

Концентрированные растворы витаминов готовят каждый отдельно путем растворения соответствующих навесок в дистиллированной воде. Хранят в замороженном состоянии.

Регуляторы роста, как правило, плохо растворяются в воде. Для приготовления маточного раствора в концентрации 1 мг/мл навеску ауксина

(2,4-Д, ИУК, НУК, ИМК) в 10 мг растворяют в небольших количествах (0,5–1 мл) 96%-го этанола, цитокинина (кинетин, зеатин, БАП, ИПА) в 1 н HCl, затем подогревают до полного растворения и водой доводят объем до 10 мл. В холодильнике их можно хранить при температуре +4 °С не более 1 месяца. Поскольку при хранении концентрированного раствора НУК происходит его кристаллизация, рекомендуется готовить более разбавленный маточный раствор (например, 0,1 мг/мл). Растворы зеатина и гиббереллина желательно хранить в морозильной камере при –20 °С.

Протокол приготовления питательной среды

1. В мерный стакан поместите навеску сахарозы, растворите в небольшом количестве воды.
2. Добавьте необходимое количество маточных растворов макросолей, микросолей, витаминов и органических добавок, регуляторов роста.
3. Дистиллированной водой доведите объем до необходимого значения.
4. Измерьте pH питательной среды. С помощью 0,1 н раствора КОН либо 0,1 н раствора HCl доведите его до уровня 5,8.
5. Разлейте среду порциями в чистые конические колбы. Количество питательной среды в колбе не должно превышать 1/2 либо 2/3 ее объема. Например, в колбы объемом 500 мл добавляют не более 300 мл питательной среды.
6. В случае твердой питательной среды добавьте агар-агар из расчета 8 г/л.
7. Колбы закройте сверху алюминиевой фольгой, чехлом из бумаги либо пленки.

Ход работы

Рассчитайте навески солей для приготовления маточных растворов в соответствии с объемами, указанными в нижеприведенной таблице.

Маточные растворы компонентов питательной среды МС

Компонент	Концентрация маточного раствора, мг/л	Объем маточного раствора, мл	Навеска для приготовления маточного раствора, г	Объем маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
Маточный раствор № 1 (М×10)				
KNO ₃		500		
NH ₄ NO ₃				
KH ₂ PO ₄				
MgSO ₄ · 7H ₂ O				

Окончание таблицы

Компонент	Концентрация маточного раствора, мг/л	Объем маточного раствора, мл	Навеска для приготовления маточного раствора, г	Объем маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
Маточный раствор № 2 (М×20)				
CaCl ₂ · 2H ₂ O		500		
Маточный раствор № 3 (М×100)				
FeSO ₄ · 7H ₂ O		200		
Na ₂ ЭДТА · 2H ₂ O				
Маточный раствор № 4 (М×100)				
MnSO ₄ · 4H ₂ O		200		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O				
H ₃ BO ₃				
KJ				
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O				
Маточный раствор № 5 (М×1000)				
CuSO ₄ · 5H ₂ O		100		
CoCl ₂ · 6H ₂ O				
Маточный раствор № 6 (×1000)				
Пиридоксин-HCl		10		
Маточный раствор № 7 (×1000)				
Никотиновая кислота		10		
Маточный раствор № 8 (×1000)				
Тиамин-HCl		10		
Маточный раствор № 9 (×1000)				
Мезоинозит		20		
Маточный раствор № 10 (×1000)				
Глицин		20		

Приготовьте маточные растворы компонентов питательной среды МС.

В процессе приготовления маточных растворов макро- и микро-элементов важно соблюдать приведенный в таблице порядок добавления солей. Рассчитайте объемы маточных растворов, необходимые для приготовления 1 л питательной среды МС. Результаты расчетов занесите в таблицу «Маточные растворы компонентов питательной среды МС».

Приготовьте маточные растворы регуляторов роста 2,4-Д, ИУК и кинетина в концентрации 1 мг/мл. Используя данные таблицы «Состав питательной среды МС», приготовьте 1 л питательной среды МС с добавлением 30 г/л сахарозы и регуляторов роста: 0,2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л кинетина. Приготовленную питательную среду разлейте в колбы, закройте алюминиевой фольгой, сверху целлофаном либо плотной бумагой, передайте на автоклавирование.

Контрольные вопросы

1. Какие компоненты включают питательные среды для культур клеток и тканей растений? Какова их роль?
2. Перечислите особенности приготовления маточных растворов макро- и микроэлементов, витаминов и регуляторов роста.
3. В каких условиях хранят маточные растворы компонентов питательных сред?
4. Почему основная питательная среда МС не содержит регуляторов роста?

Лабораторная работа 3

ТЕХНИКА СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Цель: освоить технику стерилизации семян для введения растительных объектов в культуру *in vitro*.

Материалы и оборудование: семена моркови либо другого растения, бокс биологической безопасности II класса, термостат, климатическая камера либо световая культуральная комната, KMnO_4 , 3%-й раствор гипохлорита натрия, 10%-й раствор хлорамина, 25%-й раствор дезинфицирующего средства Domestos, 70%-й и 96%-й этанол, дистиллированная вода, химические пробирки с безгормональной агаризованной питательной средой МС, содержащей 30 г/л сахарозы, химические стаканчики объемом 100 мл, закрытые металлические сита либо сита-щипцы, пинцеты, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, стерильная вата, алюминиевая фольга.

Процесс получения растительного материала, свободного от грибной и бактериальной инфекции, состоит из нескольких этапов.

Первый этап – предварительная стерилизация. Условия обработки материала варьируют в зависимости от объекта. Фрагменты органов растений (стебли, корни, листья) промывают проточной водопроводной водой и помещают в этиловый спирт (70%-й раствор на несколько секунд). Предварительная стерилизация семян – более длительная процедура. Семена промывают в мыльной воде, погружают на 10–15 мин в раствор KMnO_4 либо CuSO_4 , затем обрабатывают 70%-м этанолом в течение 1–2 мин.

Второй этап – собственно стерилизация, которую проводят в ламинарном боксе биологической безопасности. Предварительно простерилизованный растительный материал погружают в стерилизующий раствор. Тип стерилизующего агента и продолжительность его воздействия подбирают в зависимости от растительного объекта. При этом важно не только обеспечить достаточно высокую эффективность, но и сохранить жизнеспособность растительных объектов.

Наиболее часто используют антисептики на основе хлора – гипохлорит натрия (NaClO) и гипохлорит кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) в концентрации

0,5–5 % в течение 1–20 мин, хлорамин в концентрации 0,5–10 % в течение 20–30 мин. Эффективность стерилизации повышается при добавлении в стерилизующий раствор поверхностно-активного вещества Твин-20 (1 капля на 250 мл раствора), которое способствует лучшему контакту антисептика со всей поверхностью экспланта. Из стерилизующих агентов, содержащих ртуть, чаще всего используют раствор сулемы (HgCl_2) в концентрации 0,1 %. Для стерилизации можно также использовать хлорсодержащие бытовые антисептики, например дезинфицирующее средство Domestos. Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, имеющего внутреннюю инфекцию. Наиболее часто используют стрептомицин и тетрамицин в концентрациях 10–80 мг/л, а также ампициллин, левомицетин, канамицин.

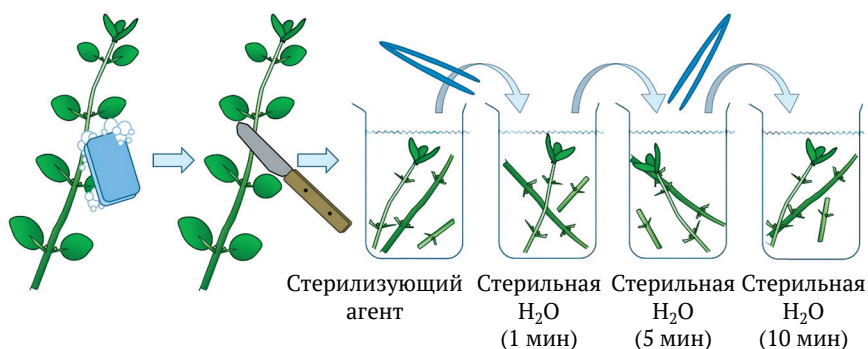


Схема стерилизации растительного материала.

И с т о ч н и к: Основы биотехнологии садовых культур :
учеб. пособие / А. В. Воронина [и др.] ;

Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева. М., 2023

Третий этап – отмывание объекта от стерилизующего раствора (постстерилизация). При этом растительный материал последовательно переносят в три-четыре порции стерильной дистиллированной воды (рисунок).

Ход работы

Поместите семена в закрытые металлические сита и тщательно промойте мыльной водой. Воду слейте, сита с семенами погрузите в светлорозовый раствор KMnO_4 . Через 20 мин перенесите в раствор 70%-го этанола на 1 мин.

Все последующие процедуры проведите в ламинар-боксе биологической безопасности II класса. Предварительно простерилизованные семена на 15 мин погрузите в растворы следующих антисептиков: 3%-й раствор гипохлорита натрия, 10%-й раствор хлорамина, 25%-й раствор дезинфицирующего средства Domestos. По истечении указанного времени отмойте семена от стерилизующего агента. Погрузите сита в стаканчики со стерильной водой, аккуратно встряхните в течение 1–2 мин, после чего слейте воду и добавьте новую ее порцию. Процедуру повторите 3–4 раза.

Простерилизованные семена используйте для получения асептически выращиваемых проростков. Для этого с помощью простерилизованного пинцета перенесите по одному семени в пробирки, содержащие агаризованную среду МС без гормонов. Стерильно закройте пробирки алюминиевой фольгой и поместите в термостат при температуре 25 °С. Через 3–4 сут. проверьте эффективность стерилизации. Определите процент инфицирования в результате неудовлетворительной стерилизации. Пробирки со стерильными семенами переносите в световую культуральную комнату либо климатическую камеру с фотопериодом 16 ч. Через 2–10 сут. (в зависимости от объекта) определите количество нормально проросших семян (%). Результаты оформите в виде таблицы.

Определение эффективности стерилизации и проращивания семян

Стерили- зующий агент	Эффективность стерилизации			Эффективность проращивания		
	Общее ко- личество семян, шт.	Количество стерильных семян, шт.	Уровень инфици- рования, %	Количество стерильных семян, шт.	Количество проросших семян, шт.	Энергия прорас- тания, %

Сформулируйте вывод об эффективности использованных в работе стерилизующих агентов.

Контрольные вопросы

1. Какие этапы включает процесс стерилизации растительных объектов?
2. Приведите примеры антисептиков, используемых для стерилизации растительного материала при введении в культуру *in vitro*.

3. Каким образом осуществляется выбор стерилизующего агента, его концентрации и продолжительности воздействия?

4. Как проводится оценка эффективности стерилизации растительного материала при введении в культуру *in vitro*?

5. При использовании какого стерилизующего агента не требуется проводить процедуру постстерилизации?

6. В каких случаях рекомендуется применять антибиотики при введении растительных объектов в культуру *in vitro*?

7. На какие сутки осуществляется контроль контаминации эксплантов после проведения их обработки антисептиками?

Лабораторная работа 4

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ И ЕЕ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Цель: освоить технику получения первичной каллусной культуры и субкультивирования длительно пассируемой каллусной ткани.

Материалы и оборудование: асептически выращенные растения, длительно пассируемая каллусная культура, бокс биологической безопасности II класса, чашки Петри со стерильной питательной средой МС, содержащей 3 % сахарозы, 2,4-Д и кинетин либо ИУК и кинетин, стерильная вода, 70%-й и 96%-й этанол, стерильные чашки Петри, стерильный скальпель, стерильный пинцет, стерильные ножницы, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, герметизирующая пленка Parafilm, стерильная вата.

Каллусная культура является одним из основных объектов клеточной инженерии растений. В биотехнологии каллусные культуры используются для получения суспензионных культур и протопластов; регенерации растений и получения соматоклональных вариантов; сохранения в растущем состоянии коллекций разных штаммов, линий либо криосохранения генетического материала; в клеточной селекции – для отбора клеток, устойчивых к тяжелым металлам, засолению, гербицидам и др.

Каллусную культуру можно инициировать из эксплантов, изолированных от разных частей растения: листьев, стеблей, корней, тканей клубня, зародышей и др. Выбор экспланта определяется целями исследования. Необходимо убедиться, что выбранный эксплант находится в подходящем физиологическом состоянии. Лучшими эксплантами являются молодые ткани и ткани, ответственные за пролиферацию. Для индукции каллусогенеза нежелательно использовать одревесневшие экспланты, ткани с низким уровнем метаболизма, плохо пролиферирующие ткани (мякоть плодов и др.) и т. п. Проращивание простерилизованных семян в асептических условиях позволяет получить материал, наиболее пригодный для инициации каллусных культур.

Достаточно важным фактором для индукции каллусогенеза является механическое повреждение ткани экспланта. В связи с этим при получении первичного каллуса рекомендуется производить дополнительное поранение эксплантов. Образование каллуса зависит от размеров экспланта. Для каждого вида растений существует минимальный критический размер

экспланта – минимальная масса экспланта, при которой идет каллусогенез. При его уменьшении невозможно индуцировать образование каллуса. Он сильно варьирует у разных видов.

Для образования каллусной ткани клетки экспланта должны дедифференцироваться, т. е. утратить специфические характеристики исходной ткани. В присутствии в питательной среде ауксинов и цитокининов начинается пролиферация дедифференцированных клеток. Оптимальные комбинации ауксинов и цитокининов при получении первичного каллуса подбираются индивидуально для каждого конкретного объекта. Продолжительность процесса получения первичного каллуса составляет от 3 до 8 недель.

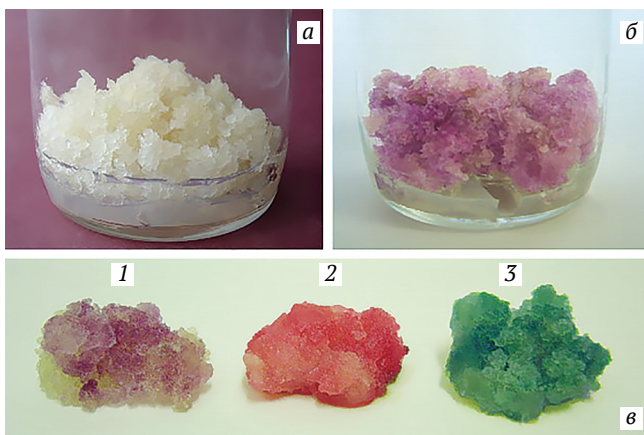


Рис. 1. Каллусные культуры *Cleome rosea*:
 а – непигментированная каллусная линия;
 б – каллусная линия, пигментированная антоцианами;
 в – pH-зависимые изменения окраски каллусной культуры, продуцирующей антоцианы: 1 – контроль; 2 – среда с низким значением pH; 3 – среда с высоким значением pH.
 И с т о ч н и к: Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS / C. Simões [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. 2009. № 47(10). P. 895-903. DOI: 10.1016/j.plaphy.2009.06.005

Каллусные культуры различаются по таким морфологическим признакам, как цвет, консистенция, степень гетерогенности. При культивировании на свету каллусные ткани могут быть полностью или частично пигментированными хлорофиллами или антоцианами (рис. 1). При вы-

рашивании в темноте чаще всего имеют молочно-белую, желтоватую окраску и т. п. Темно-коричневая окраска часто возникает при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов, которые окисляются в хиноны. Для предотвращения этого процесса в питательные среды вносят антиоксиданты.

В зависимости от источника получения различают гомогенные и гетерогенные каллусы. Первые состоят из однотипных клеток, вторые содержат несколько типов клеток. В зависимости от консистенции каллусные ткани бывают рыхлыми, среднеплотными и плотными. Консистенция каллуса в значительной степени зависит от состава среды.

Продолжительность ростового цикла каллусных тканей обычно составляет 3–4 недели. Для обеспечения длительного поддержания каллусных культур *in vitro* необходимо проводить регулярные их пересадки на свежие питательные среды. Этот прием носит название *пассирование* или *субкультивирование*. Следует обратить внимание на размеры трансплантов, переносимых на свежую питательную среду: если они слишком малы, то дальнейший рост каллуса может быть угнетен. Оптимальный размер пересаживаемого каллуса зависит от вида растения. Пассировать каллусные ткани можно неограниченное число раз. Однако при длительном культивировании способность каллусных клеток к регенерации целого растения заметно снижается, а затем и полностью утрачивается. В ряде случаев они становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам и дают начало «привыкшим» тканям.

Ход работы

1. Иницилируйте первичную каллусную культуру из листовых эксплантов.

В условиях ламинар-бокса с помощью стерильных ножниц отделите листья асептически выращиваемых растений и поместите их в стерильную чашку Петри. Для предотвращения подвядания листьев рекомендуется добавить в чашку Петри небольшое количество стерильной воды. Простерилизованным скальпелем нарежьте фрагменты листьев, прилегающие к средней жилке, длиной 1,0–1,5 см. Для лучшего каллусообразования сделайте надсечки (поранения) по всей поверхности листовых эксплантов. Перенесите подготовленные листовые экспланты в чашки Петри с питательными средами, содержащими 2,4-Д либо ИУК в качестве ауксина. Экспланты симметрично расположите на поверхности питательной среды по 6–7 шт на каждую чашку Петри (рис. 2, а).

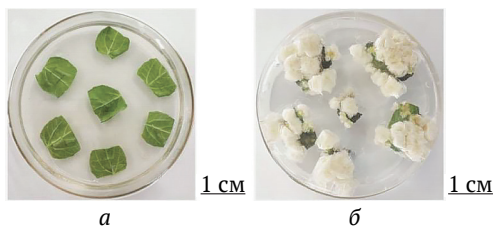


Рис. 2. Получение первичной каллусной культуры гибрида тополя 84К (*Populus alba* × *P. glandulosa* cv. '84K):

а – листовые экспланты;

б – первичный каллус через 6 недель после индукции каллусогенеза.

И с т о ч н и к: An Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation Method for Hybrid Poplar 84K

(*Populus alba* × *P. glandulosa*) Using Calli as Explants

[Electronic resource] / W. Shuang-Shuang [et al.].

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35216331>

(date of access: 12.09.2024). DOI: 10.3390/ijms23042216

2. Произведите субкультивирование длительно пассируемой каллусной ткани.

Используйте длительно пассируемую каллусную культуру в стационарную фазу ростового цикла.

В условиях ламинар-бокса с помощью простерилизованного скальпеля отделите кусочки каллуса для пересадки (транспланты) и перенесите их в чашки Петри со свежей питательной средой, соблюдая строгую стерильность. Следует отбирать наиболее молодые светлые участки каллусных тканей, отбрасывая побуревшие старые фрагменты. В каждую чашку поместите 6–7 трансплантов (рис. 3). Начальный вес каллусов должен быть примерно одинаковым и составлять 0,5–0,7 г сырой массы.

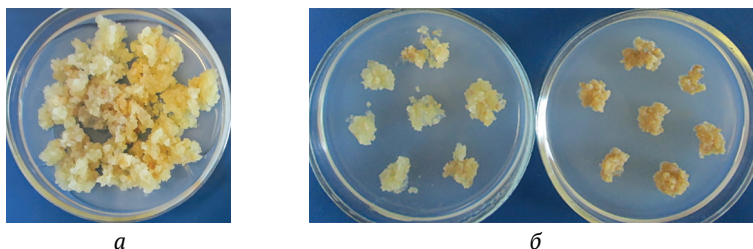


Рис. 3. Каллусная культура *Echinacea purpurea*:

а – стационарная фаза ростового цикла (28 сут. культивирования);

б – после проведения процедуры субкультивирования

Чашки Петри запечатайте пленкой Parafilm и поместите в термостат, инкубируйте при температуре 25 °C в течение 3–4 недель.

Проведите оценку увеличения размеров каллусов.

Контрольные вопросы

1. Что такое дедифференциация?
2. Перечислите факторы, индуцирующие каллусогенез. Какую роль играют ауксины и цитокинины в данном процессе?
3. Чем обусловлена необходимость пассирования каллусных культур на свежую питательную среду?
4. С какой периодичностью осуществляется субкультивирование каллусов?
5. Какие правила необходимо соблюдать при пересадке каллусной ткани на свежую питательную среду?
6. Перечислите основные направления использования каллусных культур.

Лабораторная работа 5

ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ЕЕ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Цель: освоить технику инициирования и субкультивирования суспензионной культуры растительных клеток.

Материалы и оборудование: рыхлая каллусная ткань, суспензионная культура в фазе замедления роста, бокс биологической безопасности II класса, орбитальный шейкер, термостат, стерильные колбы с жидкой средой МС, содержащей 3 % сахарозы и регуляторы роста, 70%-й и 96%-й этанол, стерильный пинцет, стерильный скальпель, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, автоматические дозаторы на 1–10 мл, стерильные наконечники на 1–10 мл, стерильная вата.

Суспензионные культуры растительных клеток выступают в качестве источников получения ценных вторичных метаболитов, могут применяться для массового размножения растений путем индукции соматического эмбриогенеза и создания «искусственных» семян.

Для получения суспензионной культуры наиболее пригодна каллусная ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду. С этой целью при культивировании каллуса из среды исключают цитокинины или снижают их содержание, а концентрацию ауксинов увеличивают. Первичный каллус использовать нежелательно, так как он обычно содержит более плотные агрегаты клеток. Рекомендуется использовать гомогенную интенсивно пролиферирующую каллусную культуру. Для получения первичной суспензии, как правило, берут 2–3 г сырой массы каллусной ткани на 60–100 мл жидкой питательной среды. Колбы помещают на качалку (шейкер) с круговым вращением. Скорость вращения платформы качалки обычно составляет 110–120 об/мин. Для обеспечения оптимального перемешивания степень заполнения колб суспензионной культурой не должна превышать 10–20 % от общего объема культурального сосуда.

Клеточные суспензии требуют более частого субкультивирования, чем каллусные культуры. Часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду, называется *инокулюм*. Для каждой линии клеток существует минимальный размер инокулюма, при уменьшении объема которого культура не растет. Длительность первого цикла выращивания

суспензии обычно составляет 15–20 сут. в зависимости от вида растения, из которого она была получена, состава среды, скорости перемешивания. В течение этого времени происходит дезагрегация каллуса и интенсивное деление клеток. Последующие циклы сокращаются до 10–14 сут. Для пересадки используют культуру в конце фазы замедления роста.

Важно оптимизировать объем инокулюма и начальную плотность культуры. Объем инокулюма, обеспечивающий клеточное размножение в суспензии, обычно составляет 10–20 % от общего объема суспензии в начале культивирования. При этом начальная плотность культуры находится в пределах 1–2 г/л по сухой биомассе и подбирается таким образом, чтобы лаг-фаза составляла 1–3 сут. Повышенное количество инокулюма приводит к угнетению роста клеточной популяции вследствие недостатка кислорода и накопления в среде токсических продуктов метаболизма.

Ход работы

1. Иницируйте суспензионную культуру из каллусной ткани рыхлого типа.

Для получения первичной суспензии кусочки каллуса в асептических условиях перенесите с помощью простерилизованного скальпеля либо пинцета в колбу с жидкой средой МС, содержащей 30 г/л сахарозы и регуляторы роста, из расчета 3 г ткани на 100 мл среды. Используйте только молодой, активно растущий, светлый каллус, отбрасывая побуревшие старые участки.

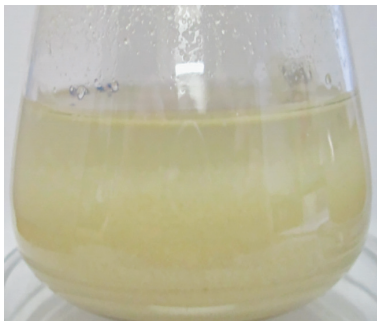
После переноса каллуса горло колбы обожгите в пламени спиртовки, закройте предварительно обожженной крышкой из фольги, а сверху – чехлом из бумаги либо пленки, подпишите и поместите на качалку с круговым вращением и скоростью перемешивания 120 об/мин в термостат. Выращивание проводите в темноте при температуре 25 °С. Через 1–3 сут. проведите контроль контаминации культуры. Если среда становится мутной (признак бактериального заражения во время инокуляции), колбу выбраковывают. При отсутствии признаков контаминации продолжайте культивирование в течение 2–3 недель.

2. Проведите субкультивирование длительно пассируемой суспензионной культуры.

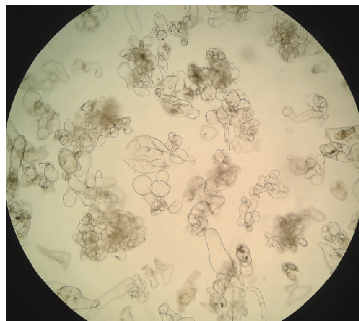
Для субкультивирования возьмите суспензионную культуру в фазе замедления роста либо в начале стационарной фазы. Работу проводите в ламинар-боксе. Стерильным пинцетом аккуратно снимите крышку из фольги с колбы с суспензионной культурой.

Пересадку суспензионной культуры на свежую питательную среду можно осуществлять двумя способами:

1) встряхните колбу с суспензией клеток и слейте 3/4 культуры, к оставшейся части добавьте порцию свежей питательной среды. При добавлении среды учитывайте оптимальный уровень степени заполнения колбы полученной культурой;



а



б

Суспензионная культура *Echinacea pallida*:

а – стационарная фаза ростового цикла (14 сут. культивирования);

б – препарат суспензионной культуры

2) стерильным дозатором отберите часть суспензионной культуры в стационарную фазу ростового цикла и перенесите ее в колбу со свежей средой. Объем инокулята должен составлять примерно 20 % от объема получаемой суспензионной культуры (например, к 160 мл стерильной питательной среды добавляют 40 мл инокулята при культивировании в лабораторных условиях в колбе объемом 500 мл). Для активно пролиферирующей суспензионной культуры объем инокулята может быть уменьшен до 10–15 %. В любом случае количество клеток в инокуляте не должно быть ниже критического уровня, который обеспечивает начальную плотность культуры в пределах 1–2 г/л по сухой массе.

Пересадив суспензию одним из рассмотренных способов, обожгите в пламени спиртовки крышку из фольги, горло колбы и с помощью стерильного пинцета произведите ее закрывание. Перенесите колбу в термостат на качалку с круговым вращением и скоростью перемешивания 120 об/мин. Инкубируйте при температуре 25 °С. Через 1–3 сут. проведите контроль контаминации культуры. При отсутствии признаков контаминации продолжайте культивирование до следующей пересадки.

Контрольные вопросы

1. Какие преимущества имеют суспензионные культуры растительных клеток по сравнению с культурами каллусных тканей?
2. Охарактеризуйте основные способы получения суспензионных культур.
3. Какие требования предъявляются к каллусным тканям, используемым для инициирования суспензионных культур растительных клеток?
4. Какова средняя продолжительность ростового цикла суспензионных культур?
5. Каким образом осуществляется субкультивирование клеточных суспензий?
6. Назовите направления практического использования суспензионных культур.

Лабораторная работа 6

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР В ГРАНУЛЫ СА-АЛЬГИНАТНОГО ГЕЛЯ

Цель: освоить методику иммобилизации суспензионных культур растительных клеток путем включения в Са-альгинатный гель.

Материалы и оборудование: суспензионная культура растительных клеток, бокс биологической безопасности II класса, орбитальный шейкер, термостат, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, стерильные колбы с жидкой средой МС, содержащей 3 % сахарозы и регуляторы роста, стерильный раствор 3%-го альгината натрия, стерильный раствор 0,25 М CaCl_2 , стерильная дистиллированная вода, стерильные чашки Петри, пластмассовые шприцы (5 мл), стерильные химические стаканчики (50 мл), стерильные автоматические дозаторы 100–1000 мкл, стерильные наконечники на 100–1000 мкл, стерильная вата.

Для иммобилизации растительных клеток широко используют альгинатные гели. Альгиновая кислота и ее соли встречаются в морских бурых водорослях (*Phaeophyta*), в которых они составляют основную часть полисахаридов, достигая 40 % сухой массы, а также в красных водорослях семейства *Corallinaceae*. Бактерии родов *Azotobacter* и *Pseudomonas* также способны продуцировать альгиновые кислоты.

Альгиновая кислота представляет собой гетерополимер и состоит из остатков β -D-маннуриновой и α -L-гулуриновой кислот, соединенных (1-4)-связями (рис. 1, а). Повторяющиеся мономеры α -L-гулуриновой кислоты образуют G-блоки, β -D-маннуриновой кислоты – М-блоки (рис. 1, б).

Альгиновые кислоты различаются молекулярной массой (100–500 кДа), процентным соотношением β -D-маннуриновой и α -L-гулуриновой кислот (М- и G-блоки) и распределением мономерных звеньев вдоль цепи полимера. Альгиновые кислоты имеют множество свободных гидроксильных и карбоксильных групп, распределенных вдоль основной цепи полимера, и, в отличие от нейтральных полисахаридов, имеют два типа функциональных групп, которые могут быть модифицированы. В присутствии моновалентных катионов альгинаты образуют вязкий, клейкий раствор, а в присутствии двухвалентных катионов (кальций, магний, стронций и барий) наблюдается образование плотного геля. Альгинаты могут быть монокатионными и поликатионными, когда в образовании

геля участвуют катионы одного или нескольких металлов. В зависимости от присутствующего катиона гели носят различные названия, например кальций-альгинатный гель и т. д.

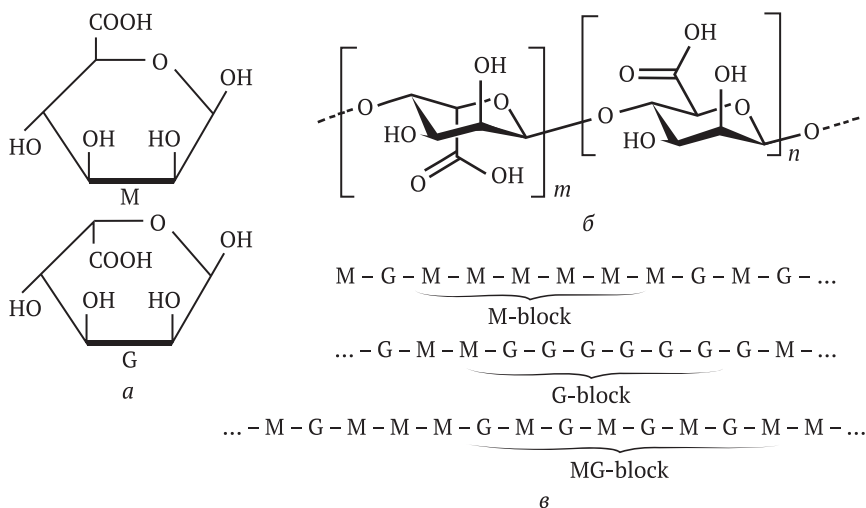


Рис. 1. Химическая структура β -D-маннуриновой (M), α -L-гулуриновой (G) кислот (а) и альгиновой кислоты (б, в)

Переход в состояние геля осуществляется за счет того, что G-блоки углеводных цепей взаимодействуют с двухвалентными катионами, например Ca^{2+} (рис. 2, а), и формируют структуры, именуемые *egg-box* («упаковка для яиц») (рис. 2, б). Альгинатный гель не образуется, если содержание α -L-гулуриновой кислоты меньше 20–25 %.

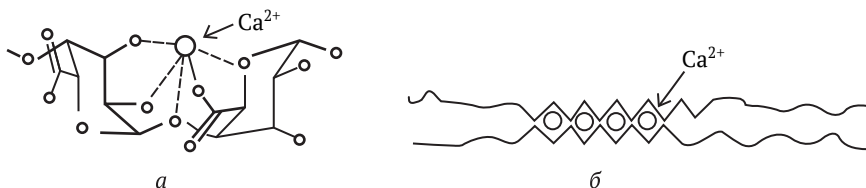


Рис. 2. Схема образования геля альгината кальция:
а – связывание Ca^{2+} с α -L-гулуриновой кислотой;
б – формирование структуры *egg-box*

Физические характеристики гелевой системы зависят от химического состава альгинатов (соотношения и расположения G- и M-блоков), молекулярной массы полимеров, концентрации и типа катионов, темпера-

туры, pH. Так, гели, полученные с использованием бария или стронция, более прочные, чем гели на основе хлорида кальция.

К достоинствам кальций-альгинатных гелей в качестве носителей для иммобилизации клеток относят мягкие условия иммобилизации, обратимость процесса, которая достигается добавлением агента, связывающего кальций, возможность регулирования плотности сшивки геля, а также стерилизации носителя путем автоклавирования.

Благодаря уникальным физико-химическим свойствам альгиновые кислоты и их соли нашли широкое применение не только в биотехнологии, но и в медицине, пищевой и других отраслях промышленности.

Ход работы

В условиях ламинар-бокса перенесите в стерильный химический стаканчик 5 мл 3%-го стерильного раствора альгината натрия с помощью пластмассового шприца, а затем стерильно добавьте 5 мл суспензионной культуры и перемешайте. В чашку Петри добавьте 30 мл 0,25 М стерильного раствора хлорида кальция. Полученной суспензией клеток в растворе альгината натрия заполните пластмассовый шприц и по каплям добавляйте в чашку Петри с раствором хлорида кальция таким образом, чтобы образовывались отдельные гранулы (рис. 3).

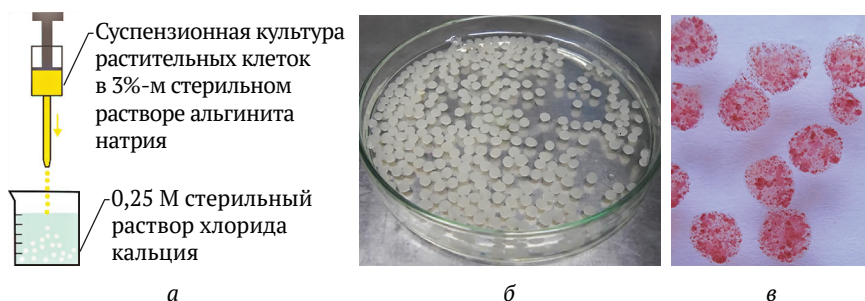


Рис. 3. Иммобилизация клеток суспензионной культуры в гранулы Са-альгинатного геля:

а – схема проведения иммобилизации путем включения в гель;

б – гранулы Са-альгинатного геля и иммобилизованными клетками суспензионной культуры *Echinacea purpurea*;

в – иммобилизованные клетки суспензионной культуры *Echinacea purpurea* после проведения дегидрогеназного теста

Оставьте образовавшиеся гранулы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе CaCl_2 на 15 мин. С помощью шприца стерильно удалите из чашки Петри наружный раствор, к гранулам добавьте порцию

дистиллированной воды, перемешайте. Аналогичным образом дважды повторите процедуру отмывки гранул от хлорида кальция. Перенесите гранулы в колбу со стерильной питательной средой МС, включающей 3 % сахарозы и регуляторы роста. Стерильно закройте колбу и перенесите в термостат на качалку с круговым вращением и скоростью перемешивания 120 об/мин. Инкубируйте при температуре 25 °С. Через 1–3 сут. проведите контроль контаминации культуры.

Контрольные вопросы

1. Что представляют собой носители на основе альгиновых кислот и их солей?
2. Перечислите преимущества Са-альгинатных гелей.
3. Какие факторы оказывают влияние на прочность альгинатных гелей?
4. Перечислите сферы применения альгинатных гелей.

Лабораторная работа 7

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ

Цель: освоить технику получения культуры генетически трансформированных корней.

Материалы и оборудование: трехнедельные асептически выращенные проростки эхинацеи пурпурной, ночная культура *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4 либо 15834 в жидкой питательной среде 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы, стерильная дистиллированная вода, чашки Петри с агаризованной питательной средой 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы, 500 либо 250 мг/л цефотаксима, колбы с питательной средой 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы, бокс биологической безопасности II класса, стерилизатор для металлических инструментов, термостат, орбитальный шейкер, стерильный пинцет, стерильный скальпель, стерильные подложки из фильтровальной бумаги, стерильные чашки Петри, стерильный инсулиновый шприц.

Культура генетически трансформированных корней является перспективным объектом в современной биотехнологии растений, который способствует получению корнеспецифичных вторичных метаболитов разных классов, продукции рекомбинантных белков, осуществлению реакций биотрансформации различных поллютантов, получению композитных растений и др. Биотехнологические преимущества культур генетически трансформированных корней заключаются в активном круглогодичном росте и интенсивном ветвлении при выращивании на питательных средах, не содержащих гормоны, в обеспечении высокого уровня биосинтеза вторичных метаболитов, часто превышающего их уровень в интактных растениях или других системах *in vitro*, а также в способности к экскреции целевых продуктов в питательную среду.

Генетически трансформированные корни получают при помощи почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes*. Попадая в поврежденные части растений, бактерии способны интегрировать в ядерный геном клетки-хозяина Т-ДНК своей Ri-плазмиды (pRi), стимулируя неограниченный рост корневой системы. Т-ДНК pRi состоит из двух копий: левой TL-ДНК и правой TR-ДНК (рис. 1). Для развития заболевания «бородатый корень» критично присутствие четырех *rol*-генов (от англ. *root locus*): *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*, локализованных в TL-области. Встраивание этих локусов Т-ДНК pRi в ядерный геном растительной клетки приводит к изменению

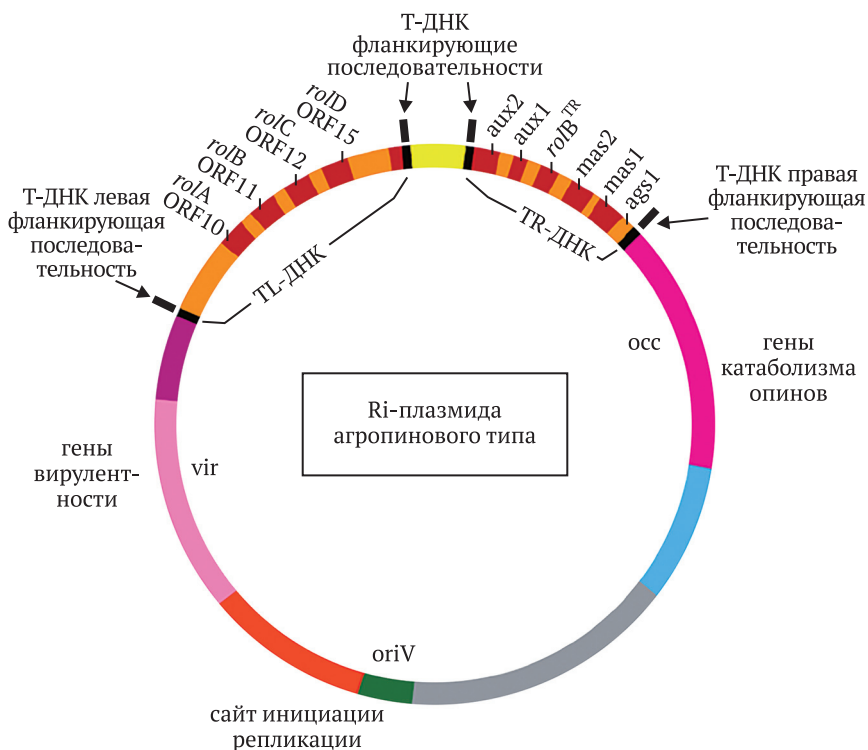


Рис. 1. Ri-плазмида.

И с т о ч н и к: *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation and Its Biotechnological Applications in Crops [Electronic resource] / I. I. Ozyigit, I. Dogan, E. A. Tarhan.

URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-7028-1>
(date of access: 12/09/2024). DOI: 10.1007/978-1-4614-7028-1_1

гормонального статуса клетки и обеспечивает ее независимость от экзогенно вводимых ростовых веществ. Гены биосинтеза опинов находятся в составе области TR-ДНК. Все штаммы *A. rhizogenes* по типу присутствующих в них pRi, кодирующих соответствующие опины, можно подразделить на четыре группы: агропиновые, маннопиновые, кукумопиновые и микимопиновые. Для генетической трансформации используют дикие штаммы *A. rhizogenes* (A4, 15834, 8196, 9402) или рекомбинантные, несущие специальный бинарный вектор со вставкой. Вирулентность штаммов ризогенных агробактерий принято оценивать с помощью корневых дисков моркови, дающих достаточно быстрый и точный ответ в виде образования косматых корней в зоне перикла. Вирулентность почвенных агробак-

терий не проявляется в природных условиях у однодольных растений, а также у ряда двудольных растений (например, *Brassicaceae*, *Papaveraceae*).

Процедура получения культуры генетически трансформированных корней *in vitro* включает четыре этапа.

1. Подготовка растительного материала. Для проведения генетической трансформации растений и последующего получения аксенично растущей культуры корней чаще всего используют стерильно выращенные проростки. Наиболее пригодными эксплантами для проведения трансформации являются семядоли и гипокотили проростков. Листовые пластинки первых настоящих листьев используются в случае, если они имеют выраженное жилкование. Часто для проведения трансформации используются черешки листьев.

2. Подготовка агробактерий. Культивирование проводят на среде YEB, г/л: дрожжевой экстракт – 1, мясо-пептонный бульон – 5, сахара – 6,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3, агар – 7, pH = 7. Бактерии выбранного штамма высаживают на агаризованную питательную среду YEB и выращивают в течение 24–48 ч при температуре 26–30 °C в темноте. Для трансформации используют культуру, которую предварительно в течение 12 ч инкубируют в жидкой среде.

3. Проведение трансформации. Выделяют два способа. В первом случае осуществляют кратковременное совместное культивирование растительных эксплантов с бактериальной суспензией. Второй способ заключается в непосредственной инокуляции стерильных проростков без извлечения их из пробирок. Место повреждения гипокотили смазывают пастообразной массой подготовленных агробактерий. Для повышения результативности трансформации рекомендуется добавлять в среду 20–50 мкМ ацетосингона.



Рис. 2. Культура генетически трансформированных корней эхинацеи пурпурной

4. Получение первичной ризогенной культуры. На данном этапе экспланты помещают на агаризованную питательную среду МС, содержащую 3 % сахарозы и 500 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Для проявления признаков ризогенеза требуется от 2 до 4 недель. Образовавшиеся корни при первом пассаже помещают на агаризованную безгормональную среду МС, содержащую уменьшенную в два раза дозу антибиотика (250 мг/л). После двух-трех пассажей на агаризованной среде корневые инокулянты переводят в жидкую безгормональную питательную среду и выращивают их в колбах (рис. 2). Постоянное перемешивание питательной среды обеспечивают с помощью шейкера с круговым вращением со скоростью 90–100 об/мин. Хорошо растущие корневые культуры нуждаются в регулярных пересадках каждые 4 недели.

Ход работы

В условиях ламинар-бокса с помощью стерильного пинцета извлеките из культуральных сосудов асептически выращенные проростки (рис. 3, а) и поместите на смоченные стерильной дистиллированной водой подложки из стерильной фильтровальной бумаги во избежание подсыхания эксплантов. Стерильным скальпелем отделите от проростков семядоли, первые настоящие листья, гипокотили и черешки в виде 1–2-сантиметровых сегментов. Произведите поранение всех типов эксплантов путем накалывания острой иглой.

Для проведения процедуры трансформации путем совместного культивирования эксплантов и агробактерий используйте ночную культуру *A. rhizogenes* штамма А4 либо 15834. Для этого за сутки до проведения трансформации добавьте в колбы с 50 мл питательной среды 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы, небольшое количество суспензии агробактерий до состояния легкой опалесценции культуральной жидкости. Инкубируйте 12 ч в термостате при температуре 25 °С при постоянном перемешивании питательной среды с помощью орбитального шейкера со скоростью 90–100 об/мин. Оптическая плотность ночной культуры при 600 нм должна находиться в диапазоне 1,0–1,6 отн. ед.

Стерильно перенесите растительные экспланты в колбы с суспензией агробактерий. Колбы поместите на качалку (90–100 об/мин) в термостатированные условия (24–26 °С) без освещения на 30 мин. Затем перенесите экспланты в чашки Петри на агаризованную среду 1/2 МС, содержащую 3 % сахарозы. Культивируйте в течение 2 сут. в термостате при 25 °С в темноте.

Для элиминации агробактерий экспланты стерильно перенесите на чашки Петри с агаризованной средой 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы

и 500 мг/л цефотаксима. Культивируйте в термостате (25 °С) в темноте. Каждые 2–3 дня производите контроль контаминации. В случае появления признаков бактериальной инфекции экспланты перенесите на новые чашки Петри с агаризованной средой 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы и 500 мг/л цефотаксима.

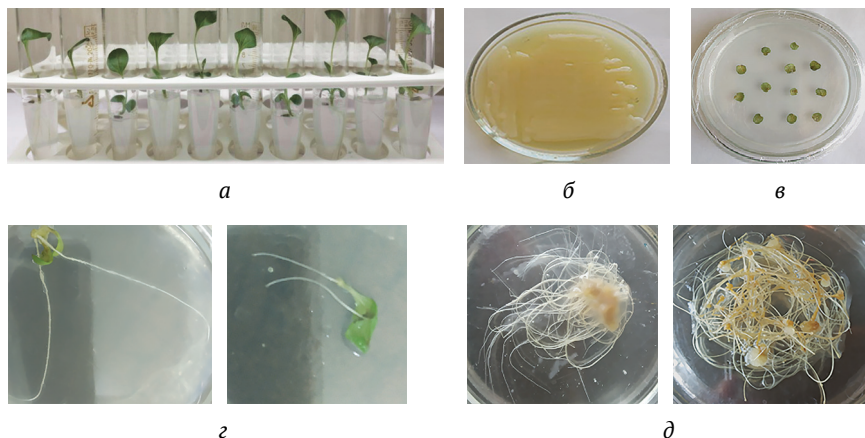


Рис. 3. Получение культуры генетически трансформированных корней (на примере эхинацеи пурпурной):

- а – асептически выращиваемые проростки;
- б – культура *Agrobacterium rhizogenes* штамма 15834;
- в – трансформированные семядольные экспланты на агаризованной среде 1/2 МС, содержащей 3 % сахарозы и 500 мг/л цефотаксима;
- г – образование первичной ризогенной культуры через 14 сут. после проведения трансформации;
- д – глубинное культивирование генетически трансформированных корней

Через 3–4 недели после проведения процедуры трансформации оцените эффективность трансформации как процентное отношение количества эксплантов с признаками ризогенеза к общему количеству эксплантов.

Корни отделите от эксплантов и перенесите на агаризованную среду 1/2 МС с пониженной концентрацией цефотаксима (250 мг/л). Через 2–3 недели поместите корневые культуры в колбы с жидкой средой 1/2 МС и культивируйте на орбитальном шейкере при 120 об/мин. Инкубируйте в течение 2–3 недель, регистрируйте увеличение длины генетически трансформированных корней (рис. 3, д).

Сформулируйте вывод об эффективности агробактериальной трансформации для разных штаммов *A. rhizogenes*.

Контрольные вопросы

1. Перечислите области биотехнологического применения культур генетически трансформированных корней.
2. Каким образом происходит формирование «бородатых» корней в природных условиях?
3. Какие типы растительных эксплантов используются для получения культур генетически трансформированных корней?
4. Каким образом осуществляется подготовка штаммов *Agrobacterium rhizogenes* для проведения процедуры трансформации растительных эксплантов?
5. Опишите способы получения культур генетически трансформированных корней. Какова средняя продолжительность данного процесса?
6. Каким образом осуществляется культивирование генетически трансформированных корней?

Лабораторная работа 8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РОСТА И ПРОДУКТИВНОСТИ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Цель: охарактеризовать культуры растительных клеток по показателям роста и продуктивности.

Материалы и оборудование: суспензионные культуры, данные по динамике изменения сухой биомассы клеток суспензионных культур в течение ростового цикла.

Индекс роста (I) является простейшим показателем ростовых процессов культур клеток и тканей, который определяют по формуле

$$I = (x_t - x_0)/x_0,$$

где x_0 – начальное значение параметра роста культуры (масса, количество клеток); x_t – значение параметра роста в конце цикла выращивания.

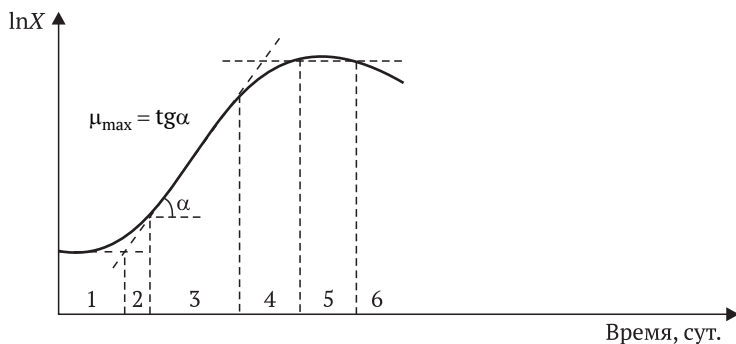
Величины индекса роста культур растительных клеток обычно лежат в пределах 5–15. Для одной и той же культуры значение индекса роста может различаться в зависимости от выбранного критерия (сырая/сухая масса).

Основным недостатком использования индекса роста для характеристики ростовых процессов является его зависимость от начального размера инокулюма/транспланта. Как правило, максимальный уровень накопления биомассы определяется количеством углеводного субстрата в среде, а не начальной плотностью культуры, которая главным образом влияет на длительность лаг-фазы ростового цикла. Таким образом, при высокой начальной плотности клеток можно получить очень низкий индекс роста, несмотря на то что другие ростовые характеристики (например, удельная скорость роста) будут весьма высокими. Следовательно, индекс роста служит объективным критерием ростовой активности только при условии отсутствия значительных различий в показателях начальной плотности культур.

Удельная скорость роста (μ) является параметром, характеризующим рост культуры в ходе фазы экспоненциального или логарифмического роста, в течение которой рост культуры подчиняется следующему закону:

$$x = x_0 e^{\mu t}.$$

Кривые роста культур растительных клеток и тканей обычно изображают в системе координат, когда по оси OX откладывают время культивирования, а по оси ординат – параметр роста (сырая либо сухая биомасса, число клеток). Однако для детального анализа роста культур более целесообразно построение графика ростовой кривой в полулогарифмической системе координат, т. е. по оси OY необходимо откладывать не фактическое значение критерия роста, а его натуральный логарифм ($\ln x$) (рисунок). Преимущество построения ростовой кривой в полулогарифмических координатах в том, что по тангенсу угла наклона линейного участка к оси OX можно определить максимальную удельную скорость роста $\mu_{\max}$.



Кривая роста в полулогарифмической системе координат:

1 – лаг-фаза; 2 – лог-фаза; 3 – фаза линейного роста;
4 – фаза замедления роста; 5 – стационарная фаза; 6 – фаза деградации.

Источники: Носов А. М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений.

М., 2011. С. 386–403

Достаточно удобным является также использование нормированного значения ростового критерия, т. е. значение $\ln(x/x_0)$. В этом случае кривые роста для любого параметра будут идти из начала координат, что значительно облегчает их сопоставление.

Для расчета удельной скорости роста можно использовать два способа – аналитический и графический. Аналитическим способом удельную скорость роста определяют по формуле

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1),$$

где x_1 и x_2 – значения критерия роста (сырая и сухая масса, концентрация клеток) в моменты времени t_1 и t_2 соответственно.

В отличие от графического данный способ может быть использован для любой фазы роста культуры. При этом во всех фазах роста μ_x будет

меньше $\mu_{\max}$, в стационарной фазе μ_x будет равно нулю, а в фазе деградации – иметь отрицательное значение.

Удельная скорость роста измеряется в единицах, обратных времени ($1/t$). Этот параметр аналогичен сложным процентам. Например, удельная скорость роста $0,1 \text{ сут.}^{-1}$ означает прирост биомассы на 10 % за сутки. Для большинства культур значение $\mu_{\max}$ находится в пределах $0,1\text{--}0,4 \text{ сут.}^{-1}$. Если $\mu_{\max}$ меньше $0,1 \text{ сут.}^{-1}$, то необходимо проводить работу по оптимизации роста культуры клеток. При удельной скорости роста выше $0,4 \text{ сут.}^{-1}$ (максимальное значение, известное по данным литературных источников, находится в районе $0,5\text{--}0,6 \text{ сут.}^{-1}$) культуру можно считать очень хорошо растущей. Следует учесть, что $\mu_{\max}$ обычно бывает различной для разных ростовых критериев.

Время удвоения биомассы (τ) рассчитывают по формуле

$$\tau = \ln 2 / \mu \approx 0,692 / \mu.$$

Время удвоения биомассы однозначно определяется удельной скоростью роста культуры. Например, при удельной скорости роста, равной $0,1 \text{ сут.}^{-1}$, время удвоения биомассы составляет около 7 сут.

Экономический коэффициент, или выход биомассы (Y), определяется из уравнения

$$Y = \Delta m / \Delta s,$$

где Δm – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве Δs .

Физиологический смысл экономического коэффициента состоит в том, что он выражает соотношение энергетического и пластического метаболизма клеток или эффективность использования углеводного субстрата среды для построения биомассы клеток. Когда концентрация биомассы достигает своего максимума, сахара или другой источник углерода поглощается клетками полностью. В этом случае экономический коэффициент можно с достаточной точностью определить как

$$Y = (m_{\max} - m_0) / s_0.$$

Например, при начальной концентрации сахарозы в среде 3 % (30 г/л среды) и начальной биомассе культуры 1 г/л (по сухой биомассе) в конце выращивания получили 11 г сухой биомассы, тогда экономический коэффициент Y составляет $(11 - 1) / 30 = 1/3 = 0,33$. Это означает, что $1/3$ субстрата клетки используют на построение биомассы (пластический метаболизм), а $2/3$ – на энергетический метаболизм (дыхание).

Экономический коэффициент Y обычно находится в пределах от 0,2 до 0,5. Более низкие значения экономического коэффициента свидетельствуют о менее эффективном использовании углеводного субстрата,

а при значении Y менее 0,15–0,20 необходимо оптимизировать условия выращивания культуры.

Для проведения биотехнологических исследований целесообразно определить такой параметр, как продуктивность по биомассе (P), измеряющуюся в граммах на литр за (г/л) за сутки:

$$P = (x_1 - x_0)/(t_1 - t_0),$$

где x_0 и x_1 – количество сухой биомассы в начале культивирования и в момент времени t_1 , для которого отмечается максимальное накопление биомассы культуры.

Для суспензионных культур в качестве параметра роста иногда используют осажженный объем клеток либо упакованный объем клеток, который представляет собой отношение объема суспензии после отстаивания или центрифугирования к общему объему пробы. Достоинством этого критерия является простота определения, недостатком – низкая точность метода и, как следствие, невысокая воспроизводимость. Критерий можно использовать лишь для ориентировочного исследования либо мониторинга.

Наиболее полное и достаточно точное определение ростовых характеристик возможно для суспензионной культуры клеток. Для этого в процессе культивирования ежедневно в одно и то же время (особенно это важно в начальных фазах роста) либо через день отбирают из колб пробы для анализа. Характеристика роста каллусных культур представляет собой более сложную и трудоемкую задачу, так как отбор проб для анализа роста не представляется возможным. В качестве основной характеристики роста каллусов обычно применяют индекс роста по сырой/сухой биомассе. Для построения кривой роста начальный вес каллусов должен быть одинаковым (0,5–0,7 г с точностью $\pm 5\%$). Для анализа на каждую точку роста ростовой кривой используют не менее трех каллусов. Поскольку цикл выращивания каллусных культур составляет не менее 30 сут., с учетом аналитических повторностей, для построения ростовой кривой необходимо одновременно культивировать 50–60 каллусов.

Длительность фаз ростового цикла существенно зависит от типа культуры и условий эксперимента. Лаг-фазу можно регулировать количеством инокулюма (начальной плотностью клеток). Считается оптимальным, если лаг-фаза составляет 1–3 сут. Более длительная лаг-фаза увеличивает продолжительность цикла выращивания. Отсутствие лаг-фазы в результате использования высокой начальной плотности культуры при длительном культивировании может привести к снижению ростового потенциала культуры. В то же время выращивание клеток без лаг-фазы может быть эффективным способом повышения продуктивности культуры для биотехнологических целей (для наработки биомассы клеток в биореакторах). Длительность экспоненциальной фазы обычно

составляет 4–9 сут., длительность стационарной фазы сильно зависит от конкретной культуры клеток: для некоторых культур клеток она может практически отсутствовать, в отдельных случаях ее продолжительность составляет 10–12 сут.

Ход работы

На основании данных по динамике изменения сухой биомассы клеток разных суспензионных культур в течение ростового цикла и кривых роста в полулогарифмическом масштабе произведите расчет показателей роста: индекс роста, удельная скорость роста в экспоненциальную фазу, время удвоения биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по биомассе.

Результаты расчетов внесите в таблицу.

Показатели роста суспензионной культуры

Вариант	I	μ , сут. ⁻¹	τ , сут.	Y	P , г/л · сут.

Проанализируйте полученные результаты и определите, существует ли необходимость оптимизации условий культивирования.

Контрольные вопросы

1. В каких единицах измеряются индекс роста, удельная скорость роста, время удвоения биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по биомассе?
2. При каком условии индекс роста можно использовать для сравнения ростового потенциала разных культур клеток?
3. С помощью какого уравнения описывается рост культуры клеток в фазу экспоненциального роста? Что такое удельная скорость роста культуры?
4. Какое преимущество дает построение кривой роста в полулогарифмической системе координат, а также использование нормированного значения ростового критерия?
5. Опишите способы определения удельной скорости роста культуры.
6. В каких пределах обычно варьирует удельная скорость роста культур клеток? Каковы ее максимальные значения? В каком случае требуется оптимизация роста культуры?
7. Как определяется время удвоения биомассы?

8. В чем заключается физиологический смысл такого показателя, как экономический коэффициент?

9. В каких пределах обычно варьирует экономический коэффициент? В каком случае требуется оптимизация роста культуры?

10. Каким образом рассчитывается продуктивность по биомассе культуры растительных клеток?

11. Каковы особенности получения данных для построения кривых роста суспензионных и каллусных культур?

12. Какова продолжительность отдельных фаз ростового цикла культур клеток?

Лабораторная работа 9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Цель: освоить методы определения жизнеспособности суспензионной культуры растительных клеток.

Материалы и методы: суспензионные культуры, различающиеся по физиологическому состоянию (в лог-фазе ростового цикла, стационарной фазе, фазе деградации), 0,1%-й раствор нейтрального красного, 0,01 М NaOH, 0,5%-й раствор ТТХ в 0,5 М KH_2PO_4 , микроскоп, весы, центрифуга, водяная баня, термостат, спектрофотометр, предметные и покровные стекла, пипетки, эппендорфы, химические пробирки, штатив, воронки, бумажные фильтры, автоматические дозаторы на 100–1000 мкл, наконечники для дозатора на 100–1000 мкл.

При работе с культурами растительных клеток необходимо контролировать их жизнеспособность, особенно при изменении параметров культивирования. Доля жизнеспособных клеток в культуре должна быть не менее 60 %, для хорошо растущих культур – 80–90 %. Жизнеспособность клеток обычно изменяется в цикле выращивания, существенно снижаясь при переходе в фазу деградации.

Известен ряд методов, позволяющих определить жизнеспособность клеток растений. Цитологические методы базируются главным образом на оценке нативности и проницаемости плазматической мембраны. Другая группа методов основана на определении активности ферментов как показателя метаболической активности и, следовательно, жизнеспособности клеток.

Для определения жизнеспособности клеток широко используются прижизненные красители. По оптическим свойствам различают витальные красители для видимого света и флуоресцентные красители – флуорохромы. По химическим свойствам выделяют основные, кислотные и электронейтральные витальные красители.

В качестве агента, избирательно прокрашивающего живые клетки, выступает нейтральный красный – липофильный феназиновый краситель. Это кислотно-основной индикатор, который в кислой среде имеет интенсивно-красный цвет, а в щелочной – бледно-желтый. Интервал pH перехода – 6,8–8,0 (изменение окраски раствора – красная → желтая). В слабощелочной среде нейтральный красный находится в форме недис-

социированных молекул, хорошо растворимых в липидах мембран, тогда как в кислой среде ($\text{pH} < 6$) это вещество образует ионы, трансмембранный перенос которых затруднен.

Растительные клетки характеризуются наличием градиента pH между вакуолью и цитоплазмой. Содержимое вакуоли имеет кислую реакцию (pH 5,5 или ниже). В жизнеспособных клетках растений, помещенных в слабощелочную среду, нейтральный красный легко проходит через мембраны в непротонированной форме, присоединяет протон в кислой среде и накапливается в вакуолях, приобретая красную окраску. В клетках, сохраняющих интактность тонопласта и плазмалеммы, нейтральный красный в ионизированной форме не способен свободно диффундировать обратно в наружный раствор. При непродолжительном пребывании клеток в растворе нейтрального красного цитоплазма не отмирает, в чем можно убедиться, вызвав плазмолиз окрашенных клеток (плазмолизироваться могут только живые клетки). В мертвых клетках из-за нарушения барьерных свойств плазмалеммы и тонопласта краситель не может аккумулироваться в вакуоли, поэтому поврежденные клетки имеют бледно-оранжевую окраску аналогично фону среды. Жизнеспособность культуры с помощью нейтрального красного определяют как отношение количества окрашенных клеток к их общему количеству.

Для выявления мертвых или поврежденных клеток чаще всего используется диазокраситель Эванса синий (Evans blue). Плазматическая мембрана живых клеток не пропускает крупные анионы красителя, и клетки остаются неокрашенными. Следовательно, в этом случае, в отличие от метода, основанного на использовании нейтрального красного, неокрашенные клетки жизнеспособны, и по их отношению к общему числу клеток можно судить о жизнеспособности суспензионной культуры. Суспензия считается жизнеспособной, если более 70 % клеток не окрашиваются в синий цвет, агрегат жизнеспособен, если более 50 % его клеток не окрасились. Подобным образом такие прижизненные красители, как метиленовый синий, индигокармин, кислый фуксин, эозин, не проникают через оболочки живых клеток, тогда как легко прокрашивают цитоплазму мертвых клеток.

Для количественного определения жизнеспособности растительных клеток можно использовать вещества, участвующие в метаболизме клеток. Метод определения жизнеспособности клеточных культур с помощью флуоресцеиндиацетата основан на том, что его молекулы легко проходят через плазматическую мембрану, но только в живых клетках расщепляются эстеразами. Расщепление приводит к образованию флуоресцеина, который задерживается в клетках с интактными мембранами. При освещении УФ-светом живые клетки можно визуально различить с помощью флуоресцентного микроскопа по зеленому свечению.

Окрашивание солями тетразолия позволяет определить интенсивность дыхания клеток. Метод определения жизнеспособности клеточных культур с помощью ТТХ заключается в том, что окислительно-восстановительные ферменты (дегидрогеназы) живых клеток необратимо восстанавливают бесцветный раствор ТТХ в окрашенное (красный цвет) вещество – 1,3,5-трифенилформазан, количество которого пропорционально активности ферментов. Метод оценки жизнеспособности клеток с помощью ТТХ получил название тетразолиевого теста.

В отдельных случаях результаты оценки жизнеспособности клеток разными методами могут не совпадать, поскольку разные методические подходы позволяют измерить различные параметры: например, в случае флуоресцеиндиацетата – активность эстераз, а в случае солей тетразолия – активность дегидрогеназ.

Ход работы

1. Проведите определение жизнеспособности клеток суспензионных культур с помощью прижизненного красителя нейтрального красного.

На основании вводных пояснений к лабораторной работе заполните таблицу.

Методы определения жизнеспособности растительных клеток

Используемый агент	Жизнеспособные клетки		Мертвые клетки	
	Накопление *	Окрашивание **	Накопление *	Окрашивание **
Нейтральный красный				
Эванса синий				
Флуоресцеин диацетат				
ТТХ				

* Знаком «+» отмечают способность используемого агента либо продукта реакции аккумулироваться в клетках, знаком «–» – отсутствие способности проникать в клетки и накапливаться в них.

** Знаком «+» отмечают изменение окраски, указывают цвет, а также название продукта реакции, который обуславливает окрашивание, знаком «–» – отсутствие окрашивания.

Для определения жизнеспособности клеток суспензионной культуры с помощью нейтрального красного на первом этапе их отмывают от питательной среды. Для этого в центрифужные пробирки поместите

по 50 мл суспензионной культуры, уравновесьте. Центрифугируйте 3 мин при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость слейте. Добавьте 50 мл 3%-го раствора сахарозы, аккуратно ресуспенсируйте клетки. Полученную клеточную суспензию в растворе сахарозы используйте для дальнейшего определения жизнеспособности клеток.

С помощью автоматического дозатора внесите в пробирку 2 мл суспензионной культуры. Добавьте 0,6 мл 0,1%-го раствора нейтрального красного.

Работать с нейтральным красным необходимо очень аккуратно, так как краситель оставляет стойкие пятна на коже рук, одежде.

Через 3 мин добавьте 0,4 мл 0,01 М раствора NaOH. Оставьте на 20 мин. Затем встряхните содержимое пробирки. На предметное стекло с помощью пипетки нанесите каплю окрашенной суспензии клеток. Накройте покровным стеклом. Рассмотрите под микроскопом. Найдите поле зрения, в котором преимущественно представлены одиночные клетки и клеточные группы. Подсчитайте количество окрашенных в красный цвет и неокрашенных клеток и клеточных групп. Аналогичную процедуру повторите еще для 2–5 полей зрения микроскопа. Результаты суммируйте. Общее количество подсчитанных объектов должно быть не менее 100. Определите отношение окрашенных клеток к общему количеству клеток в процентах.

Сравните результаты, полученные для суспензионных культур, находящихся на разных стадиях ростового цикла. Сформулируйте вывод о различиях в степени жизнеспособности суспензий клеток в зависимости от продолжительности культивирования.

2. Проведите определение жизнеспособности клеток суспензионных культур с помощью тетразолиевого теста.

Отделите клетки от питательной среды с помощью бумажного фильтра. Поместите в эппендорф 0,5 г сырого веса клеток. Добавьте 1 мл 0,5%-го раствора ТТХ в 0,5 М KH_2PO_4 , поместите в термостат на 1–2 ч. После окончания инкубации проведите извлечение из клеток образовавшегося трифенилформазана, окрашенного в красный цвет. Для этого суспензию центрифугируйте при 15 000 об/мин и слейте надосадочную жидкость. Добавьте к клеткам 1 мл этанола. Перенесите штатив с эппендорфами на водяную баню, нагревайте в течение 20 мин. Проведите повторное центрифугирование. Надосадочную жидкость перелейте в пробирку, добавьте 3 мл этанола. Проведите измерение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 485 нм. В качестве контроля используйте этанол. Полученные результаты внесите в таблицу. Рассчитайте величину $\Delta E_{485}/\text{г} \cdot \text{ч}$ (восстановление ТТХ).

Дегидрогеназная активность клеток суспензионных культур

Объект	Масса клеток, г	Продолжительность инкубации, ч	Оптическая плотность (E_{485})	$\Delta E_{485}/\Gamma_{\text{сырого веса}} \cdot \text{ч}$

Сравните данные, полученные для разных объектов либо для суспензионных культур, находящихся на разных стадиях ростового цикла, и сформулируйте выводы.

Контрольные вопросы

1. Какие подходы используют для определения жизнеспособности растительных клеток?
2. Перечислите типы и приведите примеры прижизненных красителей.
3. Какими свойствами характеризуется нейтральный красный в кислой и щелочной средах?
4. На чем основан метод определения жизнеспособности клеток с помощью нейтрального красного?
5. В чем заключается принцип метода определения жизнеспособности клеток с помощью Эванса синего?
6. Опишите принцип метода определения жизнеспособности клеток на основе использования флуоресцеин диацетата.
7. На чем основан тетразолиевый тест определения жизнеспособности клеток?
8. Почему для корректной оценки жизнеспособности клеток целесообразно использование нескольких методов?

Лабораторная работа 10

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ТИП МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

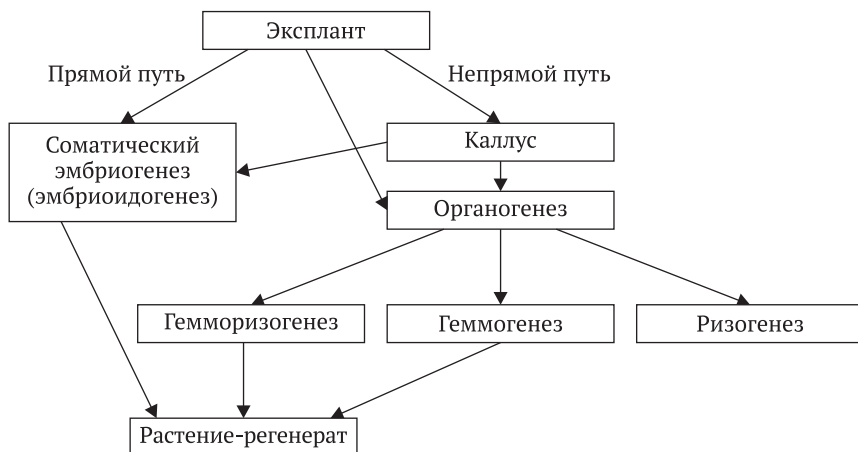
Цель: изучить влияние разных соотношений ауксинов и цитокининов в питательной среде на направление морфогенеза в культуре асептических эксплантов и каллусов.

Материалы и оборудование: асептически выращенные растения, первичная и длительно пассируемая каллусная культура, бокс биологической безопасности II класса, термостат, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, стерильный пинцет, стерильный скальпель, стерильные чашки Петри с питательной средой МС, содержащей 3 % сахарозы, 0,5 мг/л ИУК, 3 мг/л БАП либо 3 мг/л ИУК, 0,5 мг/л БАП, 96%-й и 70%-й этанол, стерильная вата, герметизирующая пленка Parafilm.

Под морфогенезом понимают образование и дифференциацию органов многоклеточного организма. Морфогенетический потенциал растительной клетки в системе *in vitro* проявляется в более широком диапазоне, чем в природных условиях. Типы морфогенеза могут быть классифицированы следующим образом:

- эмбриогенез – формирование растений-регенерантов в стерильной культуре зиготических зародышей, изолированных из семян либо семяпочек;
- соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез) – процесс развития эмбриоидов (биполярных структур) из соматических клеток;
- органогенез – процесс формирования органов (монополярных структур), например побега, корня. Подразделяется на геммогенез – образование почек – и ризогенез – образование корней. При вегетативном геммогенезе развиваются вегетативные почки, при репродуктивном (генеративном, флоральном) – цветочные почки. Укоренение полученных побегов за счет образования адвентивных корней представляет собой процесс геммогенеза.

Кроме того, различают прямой и непрямой пути морфогенеза *in vitro*. Прямой морфогенез – путь, при котором развитие корней, стеблевых и цветочных почек происходит непосредственно из клеток экспланта без образования каллуса. Непрямой морфогенез – путь формирования морфологических структур, приводящий к образованию корней, стеблевых и цветочных почек в каллусной культуре. Рассмотренные варианты морфогенеза представлены на рисунке.



Пути морфогенеза *in vitro*

В основе метода культуры клеток и тканей растений лежит уникальное свойство растительной клетки – тотипотентность. К настоящему времени практически любой вид растений может быть регенерирован из культуры клеток с помощью специальных методических подходов. Термин «регенерант» используется для обозначения стерильных растений с развитой системой корней и побегов, сформированных *in vitro*.

Получение растений-регенерантов может осуществляться за счет эмбриогенеза, эмбриоидогенеза и гемморизогенеза. Реализация конкретного пути регенерации растений в культуре *in vitro* детерминирована, т. е. в значительной степени определяется генетическими и физиологическими факторами, а также условиями выращивания. Например, у одних растений обнаруживаются все три пути регенерации, у других – только один путь.

Знания в области регенерации растений крайне важны для реализации большого числа фитобиотехнологий: генетической трансформации растений, соматической гибридизации, экспериментальной гаплоидии, промышленного клонирования с целью быстрого размножения трудно-размножаемых видов растений, получения безвирусного посадочного материала с помощью культуры меристем и др.

Индуктировать морфогенез можно с помощью различных факторов, в первую очередь за счет изменения соотношения в питательной среде фитогормонов ауксиновой и цитокининовой природы. В 1955 г. Ф. Скуг и К. Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна как *правило Скуга – Миллера*: если концентрация ауксинов в питательной среде значительно превос-

ходит концентрацию цитокининов, то отмечается формирование корней (ризогенез); если концентрация ауксинов намного меньше концентрации цитокининов, то образуются побеги (геммогенез); если концентрации ауксинов и цитокининов в питательной среде равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то наблюдается каллусогенез.

Гормональную регуляцию морфогенеза можно наблюдать в культуре эксплантов (прямой морфогенез) либо в каллусной культуре (непрямой морфогенез). Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно матовые, компактные, структурированные, имеют участки, которые представляют собой зоны морфогенеза. Впоследствии из них формируются адвентивные побеги или растения-регенеранты. Рыхлые каллусы либо совсем неспособны к органогенезу, либо формируют только корни. Появление корней свидетельствует о сдвиге гормонального баланса в сторону ауксинов, что препятствует образованию побегов.

Ход работы

Проведите подготовку ламинар-бокса и инструментов к работе.

Произведите изоляцию эксплантов из листьев асептически выращиваемых растений и перенесите их на чашки Петри с агаризованными средами МС, различающимися по содержанию ауксинов и цитокининов. Аналогичные варианты питательных сред используйте для субкультивирования первичной и длительно пассируемой каллусных тканей. Чашки Петри запечатайте, подпишите и поместите в термостат, в котором поддерживается температура 25 °С. Инкубируйте в течение 4–5 недель. По истечении указанного времени проведите анализ морфогенетических реакций, обусловленных разным соотношением гормонов с ауксиновой и цитокининовой активностью в питательной среде.

Результаты оформите в виде таблицы.

Влияние ауксинов и цитокининов на тип морфогенеза *in vitro*

Концентрация регуляторов роста, мг/л		Тип морфогенеза
ИУК	БАП	
0,5	3,0	
3,0	0,5	

Сформулируйте выводы о влиянии ауксинов и цитокининов на дифференциацию органов растений в культуре *in vitro*, а также о влиянии продолжительности культивирования каллусных тканей на их способность к морфогенезу.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные типы морфогенеза *in vitro*.
2. В чем отличие прямого морфогенеза от непрямого?
3. Охарактеризуйте способы регенерации растений *in vitro*.
4. Какие факторы оказывают влияние на направление морфогенеза в культуре клеток и тканей растений?
5. Сформулируйте правило Скуга – Миллера.
6. Какие отличия имеют морфогенные каллусные культуры по сравнению с неморфогенными?
7. Каким образом продолжительность культивирования каллусных тканей влияет на их способность к морфогенезу?

Лабораторная работа 11

МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ ПОБЕГОВ И ИНДУКЦИЯ ИХ УКОРЕНЕНИЯ

Цель: освоить технику микрочеренкования побегов и индуцировать их укоренение.

Материалы и оборудование: асептически выращиваемые растения, бокс биологической безопасности II класса, климатическая камера либо фитостат, стерилизатор для металлических инструментов, спиртовка, пробирки с безгормональной агаризованной питательной средой МС, содержащей 3 % сахарозы, пробирки с агаризованной питательной средой МС, содержащей 3 % сахарозы и 3 мг/л БАП, культуральные сосуды с питательной средой МС, содержащей 1 мг/л ауксина (ИМК, НУК либо ИУК) и PhytigelTM, 70%-й и 96%-й этанол, стерильный пинцет, стерильный скальпель, алюминиевая фольга, стерильная вата.

Микрклональное размножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым путем растений, идентичных исходному. В основе технологии лежит высокая способность растительных объектов к регенерации. По своей сути микрклональное размножение идентично вегетативному размножению растений. Его основные отличия заключаются в том, что клонирование протекает в стерильных условиях, а для размножения могут быть использованы экспланты предельно малых размеров (менее 1 см). Для оценки эффективности процесса микрклонального размножения используют коэффициент размножения (мультипликации) – количество побегов, полученных из одного экспланта за определенный промежуток времени (как правило, один пассаж либо один год).

Процесс микрклонального размножения включает четыре этапа:

- 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2) размножение, приводящее к получению максимального количества микропобегов либо эмбриоидов;
- 3) укоренение размноженных побегов;
- 4) адаптация регенерантов к почвенным условиям произрастания.

Микрочеренкование – один из наиболее простых и эффективных способов микрклонального размножения растений, основанный на подавлении апикального доминирования, что приводит к активации развития пазушных почек. Из них на питательных средах образуются побеги, которые в дальнейшем подвергаются черенкованию. Побеги, сформировавшие

пять-шесть листочков, в стерильных условиях извлекают из культуральных сосудов и разрезают на черенки (отрезок стебля с листом и пазушной почкой) длиной 1,0–1,5 см (рис. 1).

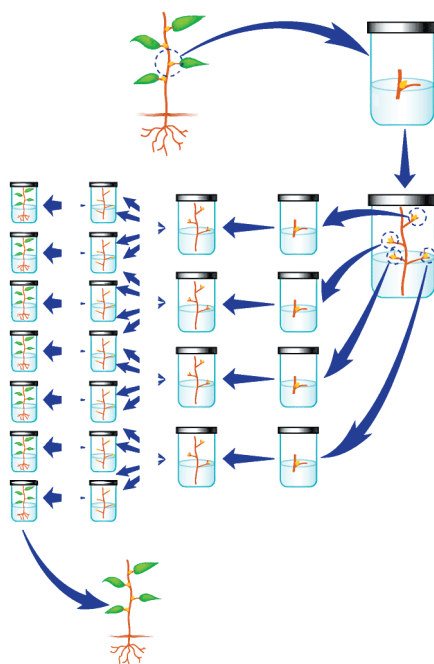


Рис. 1. Схема процедуры микрочеренкования побегов и индукции их укоренения

Черенки высаживают на безгормональные питательные среды либо среды с высоким содержанием цитокининов. В первом случае из каждой пазушной почки формируется новый побег, во втором – образуется конгломерат побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования. Обычно черенки культивируют при температуре 24–25 °С, освещенности 5000–6000 лк и продолжительности фотопериода 16 ч. Субкультивирование побегов осуществляется в среднем с интервалом в 3–4 недели.

Для укоренения побегов, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на питательную среду с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, среда МС, разбавленная в 2–4 раза) и уменьшенной до 0,5–1,0 % концентрацией сахарозы. При этом полностью исключают цитокинины, оставляя лишь ауксин (ИМК, ИУК, НУК).

Существуют два основных варианта использования ауксинов для индукции ризогенеза:

1) выдерживание микропобегов в течение 2–24 ч в стерильном концентрированном растворе ауксина (20–50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);

2) культивирование микропобегов в течение 3–4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысокой концентрации (1–5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

Укоренение черенков можно проводить в условиях гидропоники.

Ход работы

1. Проведите микрочеренкование побегов асептически выращиваемых растений.

Подготовьте ламинар-бокс и инструменты к работе. Стерильно извлеките проростки из культуральных сосудов и поместите в чашки Петри. С помощью простерилизованного скальпеля разделите побеги на микрочеренки длиной 1,0–1,5 см. Часть стебля над листом должна быть в два-три раза меньше, чем часть ниже листа (рис. 2). Стерильным пинцетом перенесите каждый черенок в отдельный культуральный сосуд, заглубив базальную часть в среду примерно на 0,3–0,5 см. Используйте два варианта сред:

- 1) безгормональная питательная среда МС;
- 2) среда МС, содержащая БАП.



Рис. 2. Изоляция микрочеренков

Культуральные сосуды стерильно закройте крышками из фольги, перенесите в климатическую камеру либо поместите в фитостат. Культивируйте при освещенности 5000 лк и температуре 25 ± 2 °С.

Через 3–4 недели проанализируйте результаты. Отметьте количество микропобегов и сформированных междоузлий на безгормональной питательной среде МС и среде, содержащей БАП. На основании анализа данных для пяти культуральных сосудов каждого варианта найдите средние значения и внесите результаты эксперимента в таблицу.

Эффективность микрочеренкования побегов

Вариант питательной среды	Среднее количество микропобегов, шт.	Среднее количество междоузлий, шт.

Сформулируйте вывод о степени пролиферации почек на безгормональной питательной среде и среде с цитокинином.

2. Проведите укоренение микропобегов.

Подготовьте ламинар-бокс и инструменты к работе.

Побеги, состоящие из двух-трех междоузлий, с помощью стерильного пинцета извлеките из культуральных сосудов и перенесите в сосуд со средой МС, содержащей 1 мг/л ауксина (ИМК, НУК либо ИУК) и PhytigelTM. Сосуды стерильно закройте крышками из фольги, поместите в климатическую камеру либо поместите в условия фитостата. Культивируйте при освещенности 5000 лк и температуре 25 ± 2 °С.

Результаты укоренения оцените через 2–3 недели. Отметьте количество сформированных адвентивных корней, измерьте их среднюю длину. На основании анализа данных для пяти культуральных сосудов каждого варианта найдите средние значения и внесите результаты эксперимента в таблицу.

Эффективность укоренения микропобегов

Ауксин	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, мм

Сформулируйте выводы об эффективности разных ауксинов для укоренения микропобегов.

Контрольные вопросы

1. Перечислите способы микроклонального размножения растений.
2. На чем основан метод активации уже существующих меристем?
3. Какие способы микроклонального размножения растений представляют собой варианты прямого морфогенеза *in vitro*?
4. Каким образом изменяют состав питательной среды на этапе укоренения микропобегов?
5. Какие ауксины используют для укоренения побегов?
6. При каком способе микроклонального размножения отсутствует необходимость в проведении процедуры укоренения?
7. Охарактеризуйте способы укоренения микропобегов.

Лабораторная работа 12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Цель: провести сравнительную оценку антирадикальной активности водно-спиртовых экстрактов из каллусной и суспензионной культур клеток, а также интактных растений с помощью методов DPPH и ЭПР-спектроскопии.

Материалы и оборудование: водно-спиртовые экстракты из каллусной и суспензионной культур эхинацеи пурпурной, водно-спиртовой экстракт из надземной части растений эхинацеи пурпурной, 0,3-ммоль/л спиртовой раствор 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила, 70%-й этанол, спектрофотометр, ЭПР-спектрометр Spinscan X, кварцевые кюветы, химические пробирки, штативы, автоматические дозаторы на 100–1000 мкл, наконечники на 100–1000 мкл, автоматические дозаторы на 10–100 мкл, наконечники на 10–100 мкл.

Культуры клеток, тканей и органов растений способны синтезировать разнообразные вторичные метаболиты, которые используют при создании лекарственных препаратов, пищевых добавок и косметических средств. Большой интерес представляют растительные объекты, продуцирующие комплекс веществ, обладающих антиоксидантным эффектом, поскольку многие патологические процессы в организме человека, в частности сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, онкологические заболевания, связаны с оксидативным стрессом и образованием свободных радикалов. Методы определения общей антиоксидантной активности различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения продукта реакции. Для этого создается определенная модель окисления какого-либо соединения, параметры которой контролируются и могут быть изменены.

Тест-системы, в которых используются стабильные свободные радикалы, например 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH), представляют информацию о клиренсе радикалов, или антирадикальной активности. К достоинствам метода относятся высокая воспроизводимость, чувствительность и селективность по отношению к антирадикальным антиоксидантам, общедоступность необходимого оборудования. Реакция с DPPH может служить тестом для первичной количественной оценки антиоксидантной активности растительных экстрактов, обусловленной обрывом цепей окисления.

Принцип метода основан на том, что в видимой части спектра этанольный раствор DPPH имеет максимум поглощения при длине волны 517 нм, который исчезает при взаимодействии радикала с веществами – донорами атома водорода или свободными радикалами иного строения. Реакция DPPH с антирадикальными антиоксидантами происходит по последовательно-параллельному механизму. На первом этапе (лимитирующая стадия реакции) молекула антиоксиданта отдает радикалу самый подвижный атом водорода, т. е. происходит восстановление этого радикала, в результате чего его фиолетовая окраска переходит в желтую (рис. 1).

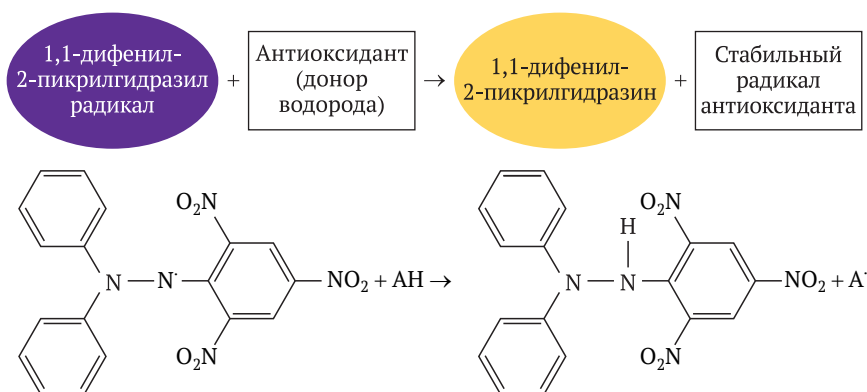


Рис. 1. Взаимодействие DPPH с антиоксидантом

На втором этапе образовавшийся радикал антиоксиданта ($A^\bullet$) атакует новую молекулу DPPH:



В итоге формируется неокрашенный продукт реакции.

Для сравнительной оценки антирадикальной активности экстрактов, полученных из разных объектов либо при разных условиях, наиболее часто используют величину IC_{50} – концентрацию антиоксидантов, при которой наблюдается 50%-е ингибирование радикалов DPPH. Чем ниже величина IC_{50} , тем выше антирадикальные свойства экстракта.

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) – явление резонансного поглощения электромагнитного излучения парамагнитными частицами (органические и неорганические радикалы, а также парамагнитное триплетное состояние вещества), помещенными в постоянное магнитное поле. Парамагнитная частица должна обладать не равным нулю магнитным моментом – спином.

Одними из традиционных объектов исследования ЭПР-спектроскопии являются свободные радикалы, например активные формы кислорода. Они имеют высокую реакционную активность и короткий период полураспада, что делает концентрацию данных частиц непостоянной и затрудняет их прямое определение. Для обнаружения таких молекул используются специальные реагенты – спиновые ловушки – химические вещества, способные реагировать с короткоживущими радикалами, образуя при этом стабильные парамагнитные соединения – спиновые аддукты. Примером спиновой ловушки служит 5,5-диметилпирролин-N-оксид (DMPO). Продукт реакции DMPO со свободным радикалом является достаточно стабильным, что позволяет детектировать его не только с помощью ЭПР и ЯМР, но и с помощью специфических антител к DMPO.

Некоторые свободные радикалы являются достаточно стабильны при нормальных условиях. Наиболее часто в качестве модели стабильного радикала используют DPPH. Его стабильность в различных средах и в широком интервале температур объясняется максимальной делокализацией свободного электрона по всей молекуле и пространственным экранированием атомов, несущих наибольшую спиновую плотность, а также отсутствием атомов водорода в тех положениях, где может происходить изомеризация или диспропорционирование. При взаимодействии с антиоксидантом, способным отдавать протон, происходит восстановление радикала DPPH и снижение интенсивности ЭПР-сигнала (рис. 2).

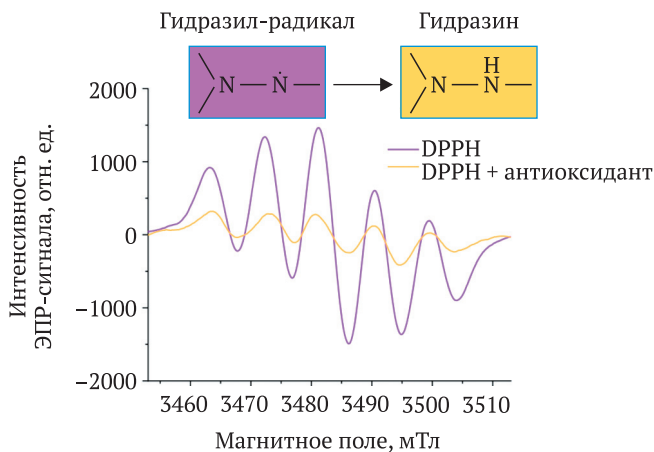


Рис. 2. Изменение ЭПР-спектра DPPH в результате взаимодействия с антиоксидантом

Таким образом, определение антирадикальной активности природных и синтетических антиоксидантов может осуществляться на основе безэталонного метода ЭПР-спектроскопии на модели стабильного радикала DPPH.

Ход работы

1. Проведите определение антирадикальной активности экстрактов на основе спектрофотометрического метода.

В работе используют экстракты, полученные из каллусной и суспензионной культур эхинацеи пурпурной (1 % по сухой биомассе), а также лекарственного сырья «трава эхинацеи пурпурной» (0,1 % по сухой биомассе).

Для определения величины IC_{50} получите концентрационную зависимость ингибирования радикала DPPH компонентами экстрактов, обладающих антирадикальными свойствами. С этой целью на первом этапе с помощью 70%-го этанола приготовьте серию последовательных разведений водно-спиртовых экстрактов из каллусной и суспензионной культур согласно схеме (рис. 3). В случае водно-спиртового экстракта из надземной части растений эхинацеи пурпурной получают на порядок более низкие концентрации. Для проведения дальнейшего анализа общий объем приготовленного раствора во всех вариантах должен составлять 2 мл.

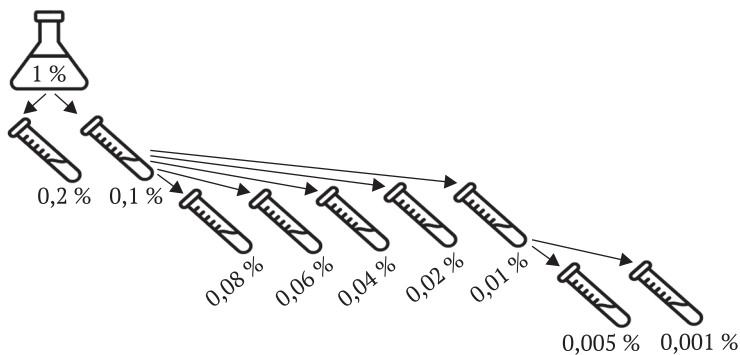


Рис. 3. Схема приготовления разведений водно-спиртовых экстрактов из культур клеток и тканей эхинацеи пурпурной

Затем в каждую пробирку, содержащую 2 мл пробы, добавьте 1 мл 0,3 ммоль/л спиртового раствора DPPH. Реакционную смесь (раствор В) *тщательно перемешайте*, перенесите в темное место и инкубируйте

при комнатной температуре в течение 30 мин. Приготовьте негативный контроль (раствор А), который включает 2 мл 70%-го этанола и 1 мл 0,3-ммоль/л спиртового раствора DPPH.

Через 30 мин с помощью спектрофотометра измерьте оптическую плотность каждой пробы при длине волны 517 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве нулевого раствора (blank) используйте 70%-й этанол. Полученные результаты внесите в таблицу.

Результаты определения антирадикальной активности экстрактов спектрофотометрическим методом

№	Концентрация экстракта, %	Оптическая плотность при 517 нм	Антирадикальная активность, %

На следующем этапе работы для каждого опытного варианта произведите расчет величины антирадикальной активности как процента ингибирования радикалов DPPH по формуле

$$AP_A = ((A - B) / A) \cdot 100,$$

где А – оптическая плотность негативного контроля (раствор А) при длине волны 517 нм; В – оптическая плотность раствора В при длине волны 517 нм, содержащего экстракт из растительного материала.

Для определения величины IC₅₀ постройте график зависимости степени ингибирования радикалов DPPH от концентрации экстракта, на котором выделите линейный участок. Получите линию тренда, уравнение линейной зависимости, а также величину коэффициента аппроксимации. На основании уравнения линейной зависимости произведите расчет IC₅₀.

Сформулируйте вывод о степени различий в показателях антирадикальной активности для экстрактов из традиционного лекарственного растительного сырья и культур клеток и тканей эхинацеи пурпурной.

2. Проведите определение антирадикальной активности экстрактов на основе метода ЭПР-спектроскопии.

К 25 мкл спиртового раствора DPPH в концентрации 1 ммоль/л добавьте 25 мкл 70%-го этанола. Пробу поместите в стеклянный капилляр, герметизируйте инертным воском и перенесите в резонатор ЭПР-спектрометра Spinscan X. Зарегистрируйте ЭПР-спектр, который служит в качестве базового сигнала.

Затем смешайте 25 мкл раствора DPPH и 5 мкл экстракта из каллусной культуры эхинацеи пурпурной. Доведите объем пробы до 50 мкл 70%-м этанолом. Через 5 мин зарегистрируйте ЭПР-спектр. Аналогичным образом проведите анализ ЭПР-спектров из суспензионной культуры эхинацеи пурпурной, а также надземной части интактных растений. Полученные результаты внесите в таблицу.

Результаты определения антирадикальной активности экстрактов методом ЭПР-спектроскопии

Вариант	Концентрация экстракта, %	Величина сигнала, отн. ед.
Контроль	0	
Каллусная культура	1,0	
Суспензионная культура	1,0	
Интактное растение	0,1	

Сформулируйте вывод об антирадикальной активности экстрактов из тестируемых объектов в модельной системе, включающей радикал DPPH.

Контрольные вопросы

1. Какие преимущества имеет метод определения антирадикальной активности на основе DPPH?
2. На чем базируется метод определения антирадикальной активности с помощью DPPH?
3. Каким образом метод ЭПР-спектроскопии может быть использован для оценки антирадикальной активности?

Лабораторная работа 13

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Цель: освоить технику выделения ДНК из растительного материала.

Материалы и оборудование: бокс биологической безопасности II класса, термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С, вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости, микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 000 об/мин, вортекс, набор автоматических дозаторов переменного объема, одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся микропробирки на 1,5 мл, штативы для микропробирок на 1,5 мл и накопечников, одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл, одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 и 1000 мкл, холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше –16 °С, одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов, набор для выделения ДНК «Нуклеосорб С» («Праймтех»), 70%-й этанол.

Выделение ДНК является определяющим этапом в любой сфере использования молекулярно-генетических подходов для изучения растительных организмов. Полученная ДНК должна быть «доступна» для ферментов рестрикции и реакций амплификации, отвечать требованиям последующего клонирования, секвенирования, гибридизации и др. Решающее значение чистота выделенной ДНК имеет при выявлении генетически модифицированной составляющей в сельскохозяйственной продукции, продуктах питания и кормах. Метод экстракции ДНК должен быть достаточно простым, удобным, недорогим и при этом воспроизводимым.

При выборе частей растения для выделения ДНК необходимо исключать участки, пораженные грибковыми и другими заболеваниями, чтобы избежать загрязнения проб чужеродной ДНК. Если ДНК из образцов ткани не может быть экстрагирована в ближайшие 48 ч, образец должен быть заморожен при температуре от –20 до –80 °С или подвергнут сушке. Повторение циклов замораживания-оттаивания проводить не рекомендуется из-за возможности разрушения ДНК.

Процесс выделения ДНК включает следующие процедуры:

- разрушение клеток;
- удаление мембранных липидов, белков, вторичных метаболитов и запасных веществ, РНК;
- осаждение ДНК.

Первый этап – разрушение клеток, лизис. Физическое разрушение тканей осуществляется растиранием в ступке либо с использованием гомогенизатора. Погружение растительного материала в жидкий азот с последующей гомогенизацией облегчает разрушение клеток, тормозя при этом любые биохимические и физические процессы, повреждающие ДНК. Обычно процедура лизиса, помимо механического разрушения, включает химическую обработку (с помощью детергентов, хаотропных агентов) и ферментативное расщепление белков (например, с помощью протеиназы К).

Для разрушения клеточных стенок и мембран гомогенизированный образец обрабатывается экстрагирующим буфером, который обычно содержит ЭДТА, Трис-НСI и цетилтриметиламмония бромид (СТАВ). Удаление липидов и мембранных белков достигается благодаря воздействию детергентов и хаотропных агентов. В буферных растворах детергенты разрушают фосфолипидный слой мембран, переводят в растворимое состояние мембранные белки. Классический катионный сурфактант, используемый при экстракции ДНК, СТАВ лизирует клеточную мембрану. Его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в присутствии СТАВ. При высоких концентрациях солей (0,7 М NaCl) нуклеиновые кислоты образуют стабильные, но вместе с тем растворимые комплексы со СТАВ. При снижении концентрации соли ниже 0,4 М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов «СТАВ/нуклеиновая кислота», тогда как большая часть полисахаридов остается в растворе. Додecilсульфат натрия (SDS) и меркаптоэтанол осаждают белки и полисахариды. Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. Реже используются неионные детергенты (например, Тритон X-100), но, так как они более «мягкие», белки могут оставаться интактными.

Хаотропные агенты, присутствующие в буфере экстракции, такие как соли, денатурируют макромолекулы, нарушая водородные связи, гидрофобные взаимодействия, Ван-дер-ваальсовы силы. Высокие концентрации солей осаждают полисахариды, которые могут образовывать с ДНК желеобразный комплекс. В присутствии в буфере экстракции ЭДТА, хелатирующего агента, связывающего ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} и др.), происходит дезактивация металлзависимых ферментов, находящихся в растительных экстрактах, в том числе нуклеаз, разрушающих ДНК.

Важнейшая процедура при выделении ДНК – удаление белков с помощью протеаз. Щелочные протеазы гидролизуют белки, в том числе гистоны, связанные с ДНК, ферменты клеточного содержимого, в частности

нуклеазы. В качестве примера можно привести широко применяемую протеиназу К, которая эффективно инактивирует нуклеазы, при этом будучи устойчивой к денатурирующим (SDS, мочевины), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидрильным агентам, а также ингибиторам трипсина и хемотрипсина. Данная протеаза работает в широком диапазоне pH (4–12).

Для облегчения отделения ДНК от вторичных метаболитов часто применяются процедуры очистки с помощью силиконового матрикса или ионообменной хроматографии. Силиконовый матрикс связывает ДНК в присутствии высоких концентраций хаотропных солей, таких как гуанидингидрохлорид. К основным преимуществам данного метода относится дешевизна силикондиоксида и универсальность протокола для широкого приложения очистки ДНК из растительных объектов.

РНК может быть удалена на соответствующем этапе осаждением хлоридом лития или добавлением РНКазы к растворенному в воде осадку нуклеиновых кислот при 37 °С. Затем ДНК должна быть осаждена и переосаждена спиртом, так как мелкие фрагменты РНК после обработки РНКазой могут послужить «затравками» в ПЦР.

Неполное удаление полисахаридов, полифенолов, а также превышающие определенный порог концентрации СТАВ, ЭДТА, этанола, изопропанола, ацетата натрия, хлорида натрия, фенола и др. приводят к угнетению дальнейших ферментативных реакций в процессе ПЦР.

Нуклеиновые кислоты из экстракционного буфера осаждают охлажденным этанолом или изопропанолом. Концентрация спирта при переосаждении не должна быть меньше 70 % во избежание потерь ДНК.

Экстрагированная ДНК может долгое время храниться при –80 °С. Для непродолжительного хранения достаточно температуры 4 °С. Крайне не рекомендуется замораживание-оттаивание препаратов ДНК вследствие разрывов молекулы.

Для выделения ДНК широко используются различные коммерческие наборы. Набор реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб» («Праймтех») включает универсальный сорбент, лизирующие растворы, отмывочные растворы, раствор протеиназы К, ТЕ-буфер и отрицательный контрольный образец. Для разрушения клеточных мембран исследуемые образцы обрабатывают лизирующим буфером, который содержит детергент и хаотропные соли. К образуемому раствору белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов и других биополимеров добавляют сорбент на основе оксида кремния. Перешедшие в раствор нуклеиновые кислоты в присутствии хаотропных солей связываются с частицами сорбента, затем отмываются специальными буферными растворами от остальных компонентов лизированного образца. При добавлении элюирующего буфера к сорбенту ДНК переходит в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается

высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования. Набор имеет пять комплектаций. Для выделения ДНК из растительных объектов используют комплектацию С.

Ход работы

Включите термостат и установите температуру 64 °С. Прогрейте лизирующий раствор и отмывочный раствор 1, периодически перемешивая, до полного растворения кристаллов.

Растительную ткань (50–70 мг) измельчите на гомогенизаторе. В каждую пробирку с образцом для выделения ДНК отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внесите по 400 мкл лизирующего раствора «С» и по 17 мкл раствора протеиназы К. Тщательно перемешайте содержимое пробирок. Инкубируйте пробирки при температуре 60 °С в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе (каждые 10–12 мин). Допускается инкубация в течение 12 ч при температуре 60 °С. Для осаждения нерастворенных частиц образцов проведите центрифугирование при 12 000–14 000 об/мин в течение 5 мин. Отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами отберите надосадочную жидкость в объеме 200–350 мкл и перенесите в новые пробирки.

Тщательно ресуспендируйте сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавьте по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешайте на вортексе, оставьте в штативе на 10–15 мин, перемешивая каждые 2 мин. Осадите сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 мин. Удалите надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавьте в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешайте на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадите сорбент универсальный центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 мин. Удалите надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавьте в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешайте на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугируйте 1 мин при 10 000 об/мин. Отберите надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Повторите процедуру отмывки, полностью отберите надосадочную жидкость. Поместите пробирки в термостат при температуре 64 °С на 5–10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

Добавьте в пробирки по 50–100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК (в зависимости от размера образца для выделения ДНК). Перемешайте на вортексе. Поместите в термостат при температуре 64 °С на 5–10 мин, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугируйте пробирки при 12 000 об/мин в течение 1 мин. Перенесите надосадочную жидкость, содержащую ДНК, в чистые подписанные пробирки на 1,5 мл. Полученные пробы можно хранить в течение одной недели при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Контрольные вопросы

1. Перечислите особенности выделения ДНК из растительных объектов.
2. Какие процедуры включает процесс выделения ДНК?
3. Каким образом проводят лизис растительных клеток для выделения ДНК?
4. Какие функции выполняют хаотропные агенты при выделении ДНК?
5. С помощью каких методов проводят очистку препаратов ДНК от вторичных метаболитов растений?
6. Каким образом обеспечивается осаждение и хранение молекул ДНК?
7. Как влияет чистота препарата нуклеиновых кислот на проведение ПЦР?

Лабораторная работа 14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И ЧИСТОТЫ ДНК

Цель: провести спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты препарата ДНК.

Материалы и оборудование: растворы ДНК, выделенные из разных растительных образцов, спектрофотометр, кварцевые микрокуветы, автоматические дозаторы на 1–20 мкл и 10–100 мкл, стерильные наконечники на 1–20 мкл и 10–100 мкл, пробирки типа эппендорф, штативы для пробирок, деионизированная вода, ТЕ-буфер (10 мМ Трис, pH которого доведен до 8,0 раствором HCl, и 1 мМ ЭДТА), 96%-й этанол.

Количество и качество выделенной ДНК можно оценить с помощью спектрофотометрического метода. Нуклеиновые кислоты поглощают УФ-излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания, особенно пиримидиновые. Для оценки чистоты препарата ДНК и РНК проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 230 нм. Препарат нуклеиновых кислот считается чистым, если отношение значений 260/280 нм приблизительно равно 1,8 для ДНК и 2,0 для РНК. В случае меньших значений данного показателя препарат содержит большое количество примесей белка, фенола или иных контаминирующих агентов, имеющих значительное поглощение при 280 нм. Другим показателем чистоты препарата ДНК или РНК является отношение значений поглощения 260/230 нм. В случае чистого препарата это соотношение обычно равно 1,8–2,2. Меньшие значения коэффициента 260/230 нм свидетельствуют о присутствии в препарате примесей углеводной природы, хаотропных солей.

Нижний предел концентрации ДНК, которую можно определить спектрофотометрически, составляет 0,1 мкг/мл. На определение обычно берут аликвоту исследуемого раствора ДНК, например 1 мкл, и разбавляют в 50–100 раз и более. Затем пересчитывают полученное значение концентрации раствора. Важно, чтобы в разведенном образце было более 10 нг ДНК. Для сравнения при гель-электрофорезе также можно визуализировать полосу, содержащую от 10 нг ДНК.

Ход работы

Образец нуклеиновой кислоты разведите в пропорции 1 : 50 деионизированной водой либо ТЕ-буфером. С помощью спектрофотометра произведите определение оптической плотности полученного раствора при длине волны 260 нм относительно деионизированной воды либо ТЕ-буфера. Полученное значение должно лежать в пределах 0,005–2,5. В противном случае нужно разбавлять или концентрировать ДНК путем ее пересадения спиртом. Точность измерения снижается при слишком больших и слишком малых значениях A_{260} из-за нарушений закона светопоглощения. Ошибка при значении 0,05 составляет 18 %, при значении от 0,1 до 1,0 – 1 %. Измерения при значениях свыше 2,5 недостоверны.

Концентрацию нуклеиновой кислоты в образце рассчитывают по формуле

$$C[\text{нг/мкл}] = A_{260} \cdot Df \cdot K,$$

где A_{260} – оптическая плотность образца при $\lambda = 260$ нм; Df – фактор разведения; K – коэффициент пересчета (таблица).

Коэффициенты молярной экстинкции и пересчета концентрации для разных видов нуклеиновых кислот

Тип нуклеиновой кислоты	Коэффициент экстинкции, $(\text{нг/мкл})^{-1} \text{ см}^{-1}$	Коэффициент для пересчета концентрации, нг/мкл
ДНК (двуцепочечная)	0,020	50
ДНК (одноцепочечная)	0,027	37
РНК (одноцепочечная)	0,025	40

Аналогичным образом измерьте поглощение при длинах волн 230 и 280 нм, чтобы оценить степень очистки ДНК от примесей белков и полисахаридов. Заполните таблицу.

Результаты определения количества и качества выделенной ДНК

Вариант	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	[C], нг/мкл

Сформулируйте выводы о степени чистоты полученного препарата ДНК и его концентрации.

Контрольные вопросы

1. Какие хромофорные группы содержат нуклеиновые кислоты? Охарактеризуйте оптические свойства растворов ДНК и РНК.
2. Какой химический смысл имеют отношения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} ? Каковы их пороговые значения?
3. Какие загрязнители могут понижать A_{260}/A_{280} ?
4. Какие загрязнители могут понижать A_{260}/A_{230} ?
5. Чему равен нижний предел спектрофотометрического метода определения содержания ДНК?

Лабораторная работа 15

АМПЛИФИКАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК С ПРОИЗВОЛЬНЫМ ПРАЙМЕРОМ (RAPD-МАРКЕРЫ)

Цель: с помощью RAPD-диагностики выявить генетический полиморфизм у растений различных видов, сортов одного вида или индивидуальных образцов в пределах одного сорта.

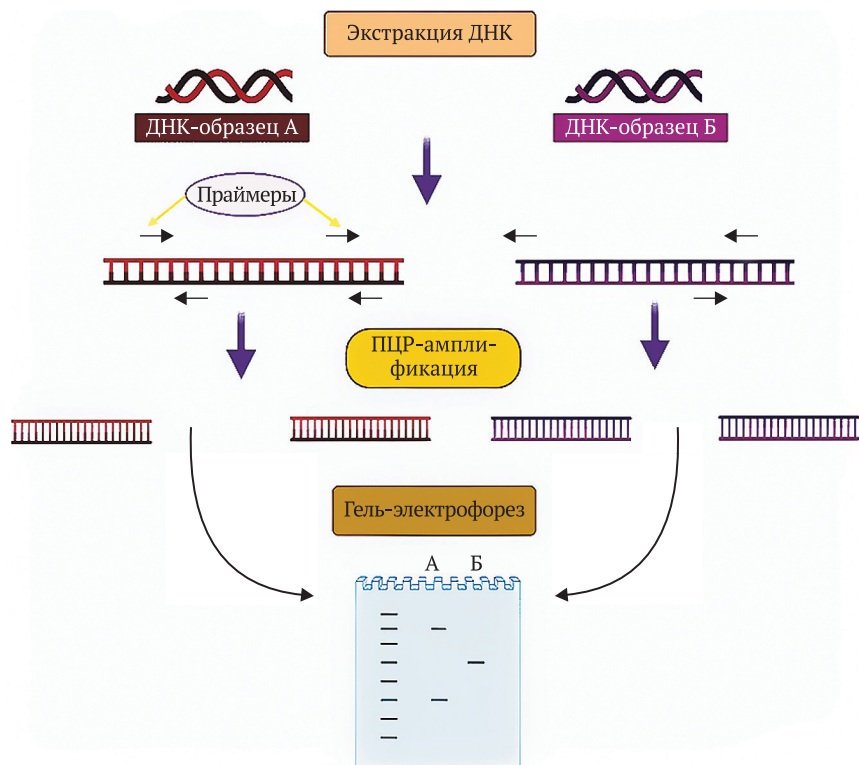
Материалы и оборудование: образцы ДНК, реакционная смесь для ПЦР, 10-нуклеотидный произвольный праймер, ПЦР-бокс, амплификатор, дозаторы, штативы, пробирки для ПЦР, наконечники, камера для горизонтального электрофореза, источник тока, гель-документатор, 1%-й агарозный гель, 1x TAE-буфер.

RAPD (случайно амплифицированная полиморфная ДНК) – один из первых молекулярных методов, основанный на амплификации фрагментов ДНК с произвольным праймером длиной 10 нк. Использование олигонуклеотидных праймеров произвольной структуры основано на том, что в больших геномах для них имеются множественные сайты посадки, а следовательно, и инициации ПЦР. В результате амплифицируются случайные последовательности генома, часть из которых может быть полиморфна у исследуемых образцов. В отличие от большинства традиционных ПЦР-маркеров RAPD не требует знания специфических последовательностей генетических локусов. Данный метод можно успешно применять для идентификации и дифференциации редких и малоизученных видов, информация о геноме которых отсутствует.

С 1990 г. метод RAPD активно используется в генетике растений для оценки полиморфизма среди соматклонов, выявления межсортовой дифференциации у одного вида растений (например, лен культурный, ирис, ротанг, цитрус, манжетка), межсортовых различий и т. д. На основе RAPD-метода построены генетические карты для некоторых видов растений.

Для проведения RAPD-анализа из большого количества декануклеотидов эмпирическим путем подбираются такие, которые дают у данного объекта исследований наиболее легко типизируемые продукты амплификации. Если правильно подобрать последовательность праймера и условия реакции, то после электрофореза пробы будут отличаться друг от друга

количеством и (или) расположением полос (рисунок). При этом для решения некоторых задач, например генетической паспортизации особей или сортов, целесообразнее подбирать праймеры, дающие большее число ампликонов, для межвидовых сравнений – с меньшим спектром продуктов амплификации.



Принцип метода случайно амплифицированной полиморфной ДНК.

И с т о ч н и к: Integration of advanced technologies
for plant variety and cultivar identification /
M. M. F. Azizi [et al.] // J Biosci. 2021. № 46. P. 91

Методика RAPD включает шесть этапов:

- 1) экстракция высокочистой тотальной ДНК;
- 2) добавление в смесь определенного произвольного праймера (возможны варианты с использованием нескольких праймеров в одной реакции (multiplex RAPD-PCR));
- 3) проведение ПЦР;

- 4) разделение ПЦР-фрагментов гель-электрофорезом;
- 5) визуализация RAPD-спектра после окрашивания этидиумбромидом под УФ-светом трансиллюминатора;
- 6) определение размеров RAPD-фрагментов.

Для RAPD важна высокая концентрация и хорошее качество исходной геномной ДНК. Метод не может использоваться в случаях, когда ДНК подвергалась деградации. Важным моментом при проведении анализа является подбор оптимальной температуры отжига, которая обычно варьирует в пределах от 30 до 40 °С. Следует учитывать, что низкая температура отжига увеличивает вероятность образования продуктов амплификации с большим количеством неспаренных оснований (ошибки отжига).

К преимуществам метода относятся простота проведения и относительно невысокая стоимость проведения анализа. Он выступает в качестве экспресс-метода для оценки полиморфизма геномной ДНК, позволяет быстро обнаружить вариабельность большого числа локусов по всему геному. RAPD-маркеры полиморфны, универсальны, не требуют знания о геноме вида, к которому применяются. Вместе с тем метод имеет недостаточно высокую воспроизводимость и трудности стандартизации для применения в разных лабораториях, поскольку результаты анализа могут зависеть от характеристик амплификатора и ДНК-полимера.

Ход работы

В ПЦР-боксе в пластиковой тонкостенной пробирке на 0,5 мл приготовьте ПЦР-смесь, включающую 10 мкл 2х-буфера для ПЦР (Master Mix), 2 мкл праймера (5-мкМ раствор), 2 мкл ДНК-матрицы (50–100 нг). Доведите до конечного объема 20 мкл водой. Перемешайте ПЦР-смесь, осадите на центрифуге и поместите в амплификатор.

Примерная программа амплификации:

- 1) 95 °С – 4 мин (первичное плавление ДНК);
- 2) 95 °С – 30 сек (плавление ДНК);
- 3) 35–40 °С – 30 сек (рассчитывается по последовательности праймера);
- 4) 72 °С – 60 сек, п. 2–4 повторяют 30 раз;
- 5) 72 °С – 5 мин (элонгация цепей ДНК).

Результаты ПЦР визуализируйте методом агарозного электрофореза. На основе наличия либо отсутствия конкретных фрагментов на электрофореграмме и степени интенсивности полос на ней сформулируйте вывод о генетическом полиморфизме исследуемых объектов.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается суть метода случайно амплифицированной полиморфной ДНК?
2. Каким образом осуществляется подбор праймера для проведения анализа?
3. Перечислите основные направления использования RAPD-маркеров?
4. Какие процедуры включает метод случайно амплифицированной полиморфной ДНК?
5. В чем преимущества и недостатки использования RAPD-маркеров?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Боксы биологической безопасности и другие устройства первичной изоляции. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях / Biological safety cabinets and other primary containment devices. Laboratory biosafety manual. – 4-е изд. – Женева : Всемир. орг. здравоохранения, 2022.

Носов, А. М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений / А. М. Носов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М. : БИОНОМ, 2011. – С. 386–403.

Основы биотехнологии садовых культур [Электронный ресурс] : учеб. пособие / А. В. Воронина [и др.] ; Рос. гос. аграр. ун-т – МСХА им. К. А. Тимирязева. – М. : Изд-во РГАУ – МСХА, 2023.

Особенности выделения геномной ДНК из растений : учеб.-метод. пособие / М. Р. Халилуев [и др.]. – М. : Русайнс, 2023. – 66 с.

Размножение плодовых, ягодных растений, винограда и хмеля в культуре *in vitro* / под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск : Колорград, 2021. – 397 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Список условных обозначений.....	3
Введение.....	4
Лабораторная работа 1. Техника работы в ламинар-боксе	5
Лабораторная работа 2. Приготовление питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга	10
Лабораторная работа 3. Техника стерилизации растительных объектов при введении в культуру <i>in vitro</i>	17
Лабораторная работа 4. Получение каллусной ткани и ее субкультивирование	21
Лабораторная работа 5. Получение суспензионной культуры растительных клеток и ее субкультивирование	26
Лабораторная работа 6. Иммобилизация клеток суспензионных культур в гранулы СА-альгинатного геля	30
Лабораторная работа 7. Получение культуры генетически трансформированных корней	34
Лабораторная работа 8. Определение показателей роста и продуктивности культур растительных клеток и тканей	40
Лабораторная работа 9. Определение жизнеспособности культур растительных клеток.....	46
Лабораторная работа 10. Влияние регуляторов роста растений на тип морфогенеза в культуре <i>in vitro</i>	51
Лабораторная работа 11. Микрочеренкование побегов и индукция их укоренения	55
Лабораторная работа 12. Определение антирадикальной активности экстрактов из культур растительных клеток и тканей	60
Лабораторная работа 13. Выделение ДНК из растительного материала	66
Лабораторная работа 14. Определение концентрации и чистоты ДНК	71
Лабораторная работа 15. Амплификация фрагментов ДНК с произвольным праймером (RAPD-маркеры).....	74
Список литературы.....	78

Учебное издание

Дитченко Татьяна Ивановна

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ
ПРАКТИКУМ**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Ж. В. Запартыко*

Художник обложки *А. А. Рабкевич*

Технический редактор *В. П. Явуз*

Компьютерная верстка *Е. В. Севрук*

Корректор *Н. А. Ракуть*

Подписано в печать 28.02.2025. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 4,65. Уч.-изд. л. 3,95.

Тираж 85 экз. Заказ 183.

Белорусский государственный университет.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.

Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие

«Информационно-вычислительный центр

Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/41 от 29.01.2014.

Ул. Кальварийская, 17, 220004, Минск.