

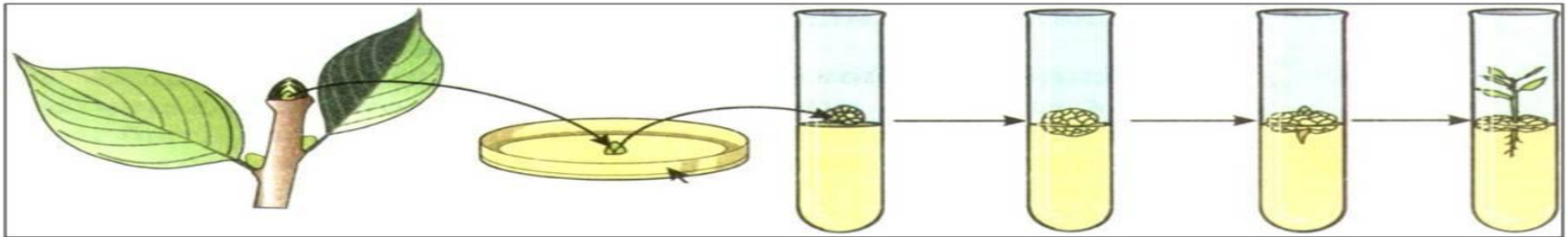
Техника протопластирования и слияния клеток микроорганизмов

выполнила: Сеил А

Проверила: Кадырбаева Г.М.

- **Клеточная инженерия** - метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции. При гибридизации искусственно объединяют целые клетки с образованием гибридного генома. Клеточная реконструкция связана с созданием жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, хромосом и др.).

Клеточная инженерия



Методы клеточной инженерии связаны с культивированием отдельных клеток в питательных средах, где они образуют *клеточные культуры*. Оказалось, что клетки растений и животных, помещенных в питательную среду, содержащую все необходимые для жизнедеятельности вещества, способны делиться. Клетки растений обладают еще и свойством *тотипотентности*, то есть при определенных условиях они способны сформировать полноценное растение.

- С помощью клеточных культур можно получать ценные биологически активные вещества (культура клеток женьшеня). Получение и изучение гибридных клеток позволяет решить многие вопросы теоретической биологии (механизмы клеточной дифференцировки, клеточного размножения и др.). Клетки, полученные в результате слияния протопластов соматических клеток, относящихся к разным видам (картофеля и томата, яблони и вишни и др.), являются основой для создания новых форм растений.

- Техника клеточной инженерии основана на технике протопластирования. Протопласт – это клетка без клеточной стенки, окруженная цитоплазматической мембраной. Протопласт получают, обрабатывая клетку ферментами, которые гидролизуют полимеры в клеточной стенке.

Впервые протопласты в 1892 г. выделил Дж. Клеркер, который использовал **механический** способ. При этом способе у плазмолированных клеток разрезают клеточную стенку, протопласты выходят в среду.

невысокая
производительность,
можно использовать ткани
только с экстенсивным
плазмолизом,
трудоемкость и длительность.

Другой метод выделения протопластов - **энзиматический**, с использованием ферментов. В 1952 году Салтон с помощью фермента лизоцима впервые разрушил клеточную стенку бактерий. В 1960 году Коккинг обработал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов (*Myrothecium verrucaria*) и впервые получил изолированные протопласты высших растений энзиматическим способом.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ

Способы культивирования протопластов

метод жидких
капель

В первом случае суспензию протопластов в виде капель помещают на пластиковые чашки Петри. Вариацией этого способа является культивирование единичных изолированных протопластов в микрокаплях объемом 1 мкл, предложенное Ю. Глебой в 1978 г.

метод
платирования.

Во втором - суспензию протопластов наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же среды с 1% агаром при температуре не выше 45°C. После остывания чашки Петри переворачивают и культивируют при 28°C. В данном случае протопласты фиксированы в одном положении и физически отделены друг от друга.

Техника получения протопласта

1

Выбор биообъектов

2

Обработка клеточных стенок ферментами.

3

Стабилизация протопластов

4

Слияние протопластов.

5

Регенерация
(восстановление клеточной
стенки протопласта.

6

Хранение гибридов, новых
продуктов.

Слияния клеток микроорганизмов

- Изолированные протопласты, еще не образовавшие клеточной стенки, могут сливаться между собой. Слияние протопластов - своеобразный метод гибридизации, так называемая парасексуальная, или соматическая гибридизация. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки растений. Внеядерные генетические детерминанты у большинства высших растений наследуются в половом процессе строго одноядерно и матерински.

- Слияние бывает спонтанным (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и индуцированным. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов, как физических, так и химических.
- При физическом способе слияния протопластов, разработанном Г. Циммерманом с сотрудниками в 1981 году, протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2 - 3 протопластов, либо цепочки из 5 - 6 протопластов между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в сильно сжатых мембранах, происходит перетекание цитоплазмы, так как переменный ток удерживает протопласты вместе некоторое время, и протопласты в таких агрегатах сливаются. Затухающий ток приводит к возвращению сферической формы у слившихся протопластов

- Протопласты могут сливаться как попарно, так и в большем количестве. Многоядерные продукты слияния, как правило, разрушаются. Первое сообщение о получении соматических гибридов на уровне растений появилось в 1972 году (Карлсон и коллеги), в нашей стране подобное осуществили в лаборатории Бутенко Р.Г. в 1975 году. Таким образом, слияние протопластов приводит либо к образованию гибрида, либо к образованию цибрида.