

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н. И. Вавилова»

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В МИКРОБИОЛОГИИ

краткий курс лекций

для аспирантов

Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки

Профиль подготовки

Микробиология

Саратов 2014

Методы исследований в микробиологии: краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки - Микробиология) / Сост.: Л.В. Карпунина, А.А. Щербаков // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 84 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Методы исследований в микробиологии» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки - Микробиология). Краткий курс лекций содержит теоретический материал по методам, применяемым в современной микробиологии. Направлен на формирование у аспирантов знаний в области современных методов исследований в микробиологии.

Карпунина Л.В., Щербаков А.А. 2014
ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

Лекция 1

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ

1.1. Помещение микробиологической лаборатории и оборудование рабочего места

Микробиологические лаборатории (МЛ) как самостоятельные структурные единицы организуются при санитарно-эпидемиологических станциях (СЭС), в инфекционных больницах, больницах общего типа, некоторых специализированных стационарах (например, в туберкулезных, ревматологических, кожно-венерологических) и в поликлиниках.

Работа в МЛ в комплексе с другими отделами СЭС имеет определенную задачу – оздоровление внешней среды и снижение заболеваемости населения.

Предметом для исследования в МЛ являются:

1. Выделения из организма человека: моча, кал, мокрота, гной, а также кровь, спинномозговая жидкость и трупный материал.
2. Объекты внешней среды: вода, воздух, почва, продукты питания, смывы с предметов инвентаря, рук и т.п.

Специфика микробиологических работ требует, чтобы помещение, отведенное под лабораторию, было изолировано от учебных комнат или больничных палат, жилых комнат, пищевых блоков.

В состав МЛ входят:

лабораторные комнаты для бактериологических исследований и подсобные помещения:

автоклавная или стерилизационная для обеззараживания отработанного материала и зараженной посуды;

моечная, оборудованная для мытья посуды;

средоварочная, для приготовления, розлива, стерилизации и хранения питательных сред;

виварий для содержания подопытных животных;

материальная для хранения запасных реактивов, посуды, аппаратуры и хозяйственного инвентаря.

В небольших МЛ средоварочную и стерилизационную объединяют в одной комнате; специальное помещение для подопытных животных отсутствует.

Под *лабораторные комнаты* отводят наиболее светлые, просторные помещения. Стены в этих комнатах на высоту 170 см от пола окрашивают в светлые тона масляной краской. Пол покрывают релином или линолеумом (для уборки помещения дезинфицирующими растворами). В комнате должна быть раковина с водопроводной подводкой и полкой для бутылки с дезинфицирующим раствором (ДР). В лаборатории оборудуют застекленный бокс с предбоксником для выполнения работ в асептических условиях.

В боксе ставят стол для посевов, табурет, над рабочим местом монтируют бактерицидные лампы. В предбоксник помещают шкаф для хранения стерильного материала.

Лабораторное помещение оборудуют столами лабораторного типа, шкафами, полками для хранения необходимой при работе аппаратуры, посуды, красок, реактивов.

Большое значение имеет правильная организация рабочего места врача-бактериолога, лаборанта. Лабораторные столы устанавливают около окон, так чтобы

свет падал спереди или сбоку от работающего, лучше с левой стороны, но ни в коем случае не сзади. Желательно, чтобы комнаты для проведения анализов, особенно для микроскопирования имели ориентацию окон на север или северо-запад, так как для работы необходим *ровный рассеянный свет*. Освещенность поверхности столов для работы должна быть 500 лк. Поверхность столов покрывают пластиком (для дезинфекции, а каждое рабочее место на нем – зеркальным стеклом.

За каждым сотрудником лаборатории закрепляют *отдельное рабочее место* площадью 150 X 60 см. Все рабочие места оборудуют предметами, необходимыми для повседневной бактериологической работы (краски, стекла предметные и покровные, штатив для пробирок, петля, шпатели, пинцет, ножницы, банка с ДР микроскоп и т.д.).

1.2. Правила работы и поведения в лаборатории

Особенностью бактериологических работ является постоянное соприкосновение сотрудников лаборатории с заразным материалом, культурами патогенных микробов, зараженными животными, кровью и выделениями больного. Поэтому все сотрудники лаборатории обязаны соблюдать следующие правила работы, которые обеспечивают стерильность в работе и предупреждают возможность возникновения внутрилабораторных заражений.

1. В помещении МЛ нельзя входить без специальной одежды – халата, белой шапочки или косынки.
2. Нельзя вносить в лабораторию посторонние вещи.
3. Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнее платье на халат.
4. В помещении МЛ категорически запрещается курить, принимать пищу, хранить продукты питания.
5. Весь материал, поступающий в МЛ должен рассматриваться как инфицированный.
6. При распаковке присланного заразного материала необходимо соблюдать осторожность: банки, содержащие материал для исследования, при получении обтирают снаружи ДР и ставят не прямо на стол, а на подносы или в кюветы.
7. Переливание жидкостей, содержащих патогенных микробов, производят над сосудом, наполненным ДР.
8. О случаях аварии с посудой, содержащей заразный материал, или проливании жидкого заразного материала надо немедленно сообщить зав. лаб. или его заместителю.
9. При исследовании зараженного материала и работе с патогенными культурами микробов необходимо строго соблюдать общепринятые в бактериологической практике технические приемы, исключающие возможность соприкосновения рук с заразным материалом.
10. Зараженный материал и ненужные культуры подлежат обязательному уничтожению, по возможности в тот же день. Инструменты, использованные в работе с заразным материалом, тотчас после их употребления дезинфицируют, как и поверхность рабочего места.
11. При выполнении бактериологических работ нужно строго следить за чистотой рук: по окончании работы с зараженным материалом их дезинфицируют. Рабочее место в конце дня приводят в порядок и тщательно дезинфицируют, а заразный материал и культуры микробов, необходимые для дальнейшей работы, ставят на хранение в запирающийся рефрижератор или сейф.

12. Работники МЛ подлежат обязательной вакцинации против тех инфекционных болезней, возбудители которых могут встретиться в исследуемых объектах.

1.3. Порядок хранения, обращения и отпуск культур патогенных микробов

Возбудители заразных болезней в соответствии со степенью опасности заражения для работающих с ними лиц, учетом клиники вызываемых заболеваний, а также наличием эффективных приемов охраны труда и техники безопасности при работе подразделяются на следующие пять групп:

Группа I. Возбудитель чумы.

Группа II. Возбудитель холеры, натуральной оспы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы, сапа, мелиоидоза, эпидемического сыпного тифа, эпидемических энцефалитов, геморрагических лихорадок, желтой лихорадки, лихорадки Ку, лихорадки цуцугамуши, лихорадки Скалистых гор, орнитозов, гистоплазмоза, кокцидиозов, токсин ботулиновый.

Группа III. Возбудители бактериальных (брюшной тиф, дизентерия, дифтерия, туберкулез и др.), вирусных (бешенство, полиомиелит, корь, грипп и др.), риккетсиозных (болезнь Брилля, клещевые тифы и др.), простейших (малярия, лейшманиоз, бластомикоз, дерматомикозы и др.), инфекционных заболеваний, выделенных в самостоятельные нозологические формы.

Группа IV. Возбудители токсикоинфекций и острых бактериальных отравлений (сальмонеллы, стафилококки, вибрионы, клостридии и др.), энтеритов (эшерихии, энтеро- и аденовирусы и др.), септицемий и пневмоний (стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка и др.).

Группа V. облигатная непатогенная микрофлора, населяющая слизистые и кожные покровы человека, а также микроорганизмы – показатели санитарного состояния внешней среды (эшерихии, энтерококки, клостридии и др.).

Представленная схема распределения возбудителей по группам определяет режим работы, порядок хранения и выдачи микроорганизмов различных групп.

Работу с культурами микробов I и II групп можно проводить только с разрешения Центральной режимной комиссии Главного управления карантинных инфекций Министерства здравоохранения РФ, или Главного санитарно-эпидемического управления Министерства здравоохранения союзной республики, в специально оборудованных лабораторных помещениях, работа которых регламентируется действующими инструкциями по режиму работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза.

Работа с возбудителями, отнесенными в III группу, проводится в соответствии с правилами устройства, техники безопасности, производственной санитарии и личной гигиены при работе в лабораториях санитарно-эпидемиологических учреждений.

Работа с возбудителями IV и V групп требует соблюдения обычного режима работы БЛ, обеспечивающего надежную защиту персонала лаборатории от внутрилабораторных заражений в процессе исследований и надлежащее обеззараживание материала, исключающее возможность распространения инфекции за пределы лаборатории.

Порядок хранения культур I и V групп. Культуры микробов хранят в пробирках на плотных питательных средах и в ампулах в лиофилизированном состоянии. На пробир-

ки и ампулы с культурами наклеивают этикетки с номером штамма по инвентарной книге, названием возбудителя и датой посева.

Культуры хранят в холодильниках или сейфах. Холодильники и несгораемые шкафы с культурами I, II и III групп по окончании рабочего дня закрывают на ключ, пломбируют или опечатывают. Места хранения культур IV и V групп запирают. Ключи от замков, пломбир и печати хранятся у зав. лаб. или выделенного им лица. В помещениях, где хранят культуры I и II групп, входные двери закрываются на замок и пломбируют или опечатывают сургучной печатью.

Учет культур и материалов, подозрительных на зараженность возбудителями I и V групп. Культуры возбудителей I и V групп, выделенные при диагностических исследованиях и находящиеся в работе БЛ, подлежат обязательной регистрации в журналах с пронумерованными страницами, прошнурованных и скрепленных сургучной печатью учреждения.

Министерством здравоохранения РФ для лабораторий, работающих с живыми культурами микробов, утверждены следующие формы журналов (Положение о порядке хранения... от 30 января 1974 г.).

Форма 1. Журнал регистрации материалов (культур), поступивших для исследования.

Форма 2. Журнал учета выделенных культур и их уничтожения.

Форма 3. Журнал, ведение которого предусмотрено для лабораторий, работающих с возбудителями I и II групп, отражает движение микробных культур и материалов, подозрительных на зараженность.

Микробные культуры, отнесенные к I и II группам, и зараженные животные учитываются по каждому виду возбудителя отдельно, микробы III и IV групп - суммарно по каждому роду возбудителя. Микроорганизмы V группы специальному учету не подлежат. Регистрация их ведется в рабочих журналах и дневниках.

Порядок передачи культур микробов внутри учреждения и за его пределы (внутри страны). Из лаборатории в лабораторию в пределах одного учреждения музейные культуры микробов III-V групп передаются по письменному разрешению зав. музеем культуры микробов, возбудители I-II групп - с разрешения руководителя учреждения. В пределах одной и той же лаборатории штаммы обозначенных групп бактерий могут быть переданы по письменному разрешению зав.лаб.

Для выдачи культур за пределы лаборатории необходимо официальное требование за подписью руководителя учреждения, скрепленное гербовой печатью.

Разрешение на выдачу культур возбудителей I-V групп дает руководитель учреждения. Культуры микробов I и II групп выдаются лишь в те учреждения, которые имеют разрешение Министерства здравоохранения РФ на работу с этими микроорганизмами. Учреждения, запрашивающие культуры возбудителей III группы, одновременно с требованием должны представить заключение местной (районной, городской) СЭС о наличии условий для работы с возбудителями этой группы.

Культуры микробов I-V групп в высушенном виде (в ампулах) или в пробирках на плотных питательных средах при выдаче заворачиваются в лигнин или гигроскопическую вату и помещаются в металлический (для культур III-V групп можно пластмассовый) плотно закрывающийся опечатываемый пенал.

Культуры бактерий I и II групп пересылают со специальной связью. При этом пенал с отправляемыми культурами укладывают в деревянный прочный ящик, обшивают

его материалом, пломбируют или опечатывают сургучной печатью. На адресной стороне посылки прикрепляется особый ярлык с отметкой "Опасно".

Культуры возбудителя чумы пересылаются в сопровождении 2 лиц, одним из которых должен быть врач.

Микробные культуры, отнесенные в III группу, пересылаются обычной почтовой посылкой в такой же упаковке, как культуры I и II групп, или выдаются через нарочного по предъявлении им официального требования, доверенности и паспорта.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Правила работы и поведения в микробиологической лаборатории.
- 2) Порядок проведения лабораторных исследований.
- 3) Порядок хранения, обращения и отпуск культур микробов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1

2. **Карпунина, Л.В.** Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям для студентов специальности "Биоэкология" / Л.В. Карпунина, Е.С. Мухачева. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова. – 2005. – 100 с.

Дополнительная

1. **Лабинская, А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.

Лекция 2

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Рост микроорганизмов

Термин “**рост**” означает увеличение цитоплазматической массы отдельной клетки или группы бактерий в результате синтеза клеточного материала (например, белка, ДНК, РНК). Достигнув определенных размеров, клетка прекращает рост и начинает размножаться. Под **размножением** микробов подразумевают способность их к самовоспроизведению, увеличению количества особей на единицу объема. Иначе: **размножение** – это повышение числа особей микробной популяции.

Бактерии размножаются преимущественно **поперечным делением** (вегетативное размножение), которое происходит в различных плоскостях с образованием многообразных сочетаний клеток.

Процесс деления состоит из ряда последовательных этапов. **1- этап** начинается формированием в средней части клетки поперечной перегородки, состоящей вначале из ЦМ, которая делит Ц материнской клетки на две дочерние. Параллельно с этим синтезируется КС, образующая полноценную перегородку между двумя дочерними (**2 этап**). В процессе деления бактерий важным условием является репликация (удвоение) ДНК, которая осуществляется ферментами ДНК-полимеразами. При удвоении ДНК происходит разрыв водородных связей и образование двух спиралей ДНК, каждая из которых находится в дочерних клетках. Далее дочерние односпиральные ДНК восстанавливают водородные связи и вновь образуют двуспиральные ДНК.

Репликация ДНК и деление клеток происходит с определенной скоростью, присущей каждому виду микроба, что зависит от возраста культуры и характера питательной среды. При благоприятных условиях деление клеток совершается очень быстро, через каждые 20-30 минут (например, у кишечной палочки скорость роста колеблется от 16 до 20 минут), у термофилов через 5 минут, у кислотоупорных гораздо медленнее, например у туберкулезной палочки через 18-20 часов (микобактерии размножаются не только делением, но и почкованием). Для клетки культуры тканей млекопитающих требуются сутки. Т.е. бактерии большинства видов размножаются почти в 100 раз быстрее, чем клетки культуры тканей.

Типы деления клеток бактерий.

1. Клеточное деление опережает разделение, что приводит к образованию многочисленных палочек и кокков.

2. Синхронное клеточное деление, при котором разделение и деление нуклеотида сопровождается образованием одноклеточных организмов.

3. Деление нуклеотида опережает клеточное деление, обуславливая образование мнгоонуклеотидных бактерий.

Разделение бактерий происходит тремя способами:

1. разламывающее разделение, когда две индивидуальные клетки, неоднократно переламываясь в месте сочленения, разрывают цитоплазматический мостик и отталкиваются друг от друга (при этом образуются цепочки – сибиреязвенные бациллы);

2. скользящее разделение, при котором, после деления клетки обособляются и одна из них скользит по поверхности другой (отдельные формы эшерихий);

3. секущее разделение, когда одна из разделившихся клеток свободным концом описывает дугу круга, центром которого является точка ее контакта с другой клеткой, образуя римскую пятерку или клинопись (коринебактерии дифтерии, листерии).

2.2. Фазы развития в бактериальной популяции

Теоретически допускается, что если бактериям создать условия непрерывного притока и прогрессивного увеличения массы свежей питательной среды и оттока продуктов выделения, то размножение будет возрастать логарифмически, а гибель арифметически.

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции принято показывать графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени. Типичная кривая роста имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

1. Исходная (стационарная, латентная или фаза покоя). Представляет собой время от момента посева бактерий на питательную среду до их роста. В этой фазе роста число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшаться. Продолжительность исходной фазы 1-2 часа.

2. Фаза задержки размножения. В течение этой фазы бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются. Период ~ 2 часа и зависит от ряда условий: а) возраста культуры (молодые культуры припосабливаются быстрее, чем старые; б) биологических особенностей микробных клеток (для бактерий кишечной группы характерен короткий период приспособления, для микобактерий туберкулеза – длительный); в) полноценности питательной среды; г) t выращивания; д) концентрации CO_2 , рН, степени аэрации среды, окислительно-восстановительного потенциала и др. Нередко обе фазы объединяют термином “**лаг-фаза**” (анг. lag –отставание, запаздывание).

3. Логарифмическая фаза (экспоненциальная). В этой фазе скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации (лат. generatio –рождение, воспроизведение) т.е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, в этой стадии будет постоянным для данного вида, а количество бактерий станет удваиваться в геометрической прогрессии. Это означает, что в конце второй генерации обе бактерии, разделяясь образуют 4, из них формируются 8 и т.д. Следовательно, после n генераций количество клеток в культуре будет равно 2^n . Длительность \log фазы составляет ~ 5-6 часов.

4. Фаза отрицательного ускорения. Скорость размножения бактерий перестает быть \max , число делящихся клеток уменьшается, а число погибших увеличивается (длительность ~ 2 часа). Одна из возможных причин – истощение питательной среды, т.е. исчезновение из нее веществ, специфичных для данного бактериального вида.

5. Стационарная фаза максимума. В ней число новых бактерий почти равно числу отмерших, т.е. наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися. Продолжительность 2 часа.

6. Фаза ускорения гибели. Характеризуется прогрессивным превосходством числа погибших клеток над количеством вновь нарождающихся. Длится ~ 3 часа.

7. Фаза \log гибели. Отмирание клеток происходит с постоянной скоростью. (~ 5 часов).

8. Фаза уменьшения скорости отмирания. Остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

2.3. Культивирование бактерий

Микроорганизмы выращивают на питательных средах, которые должны быть стерильными, прозрачными, влажными (твердые), содержать определенные питательные вещества (белки, углеводы, витамины, микроэлементы и др.), обладать определенной буферностью, рН, иметь о-в потенциал. Их **классифицируют** по **консистенции** – жидкие, полужидкие, плотные (твердые); по **происхождению** – животные или растительные, синтетические; по **назначению** – универсальные (общие, общеупотребительные), дифференциальные, элективные, среды обогащения и специальные.

Общие (простые) среды – МПА, МПБ. МПЖ. МПА – мясо-пептонный бульон с 1-2% агаром, который получают из водорослей.

Дифференциальные среды - позволяют различать бактерии разных родов и видов по их культуральным и биохимическим свойствам (МПЖ, среды Гисса, Эндо, кровяной агар, бактоагар Плоскирева и др.).

Элективные (избирательные) среды и среды **обогащения**, благоприятствующие размножению бактерий определенных видов и подавляющие рост других микробов (яичные среды Петраньяни, Гельберга для выращивания микобактерий туберкулеза, среды Дюба-Смита для выращивания паратуберкулеза и др.).

Специальные среды, наиболее опт для выращивания бактерий не размножающихся на общеупотребительных средах (кровяной агар, сывороточный агар, среда Китта-Тароцци и др.)

На плотных средах микробы образуют различные по форме и величине колонии, которые представляют собой видимые скопления особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения из одной или нескольких клеток.

Микроорганизмы можно выращивать в **ферментере периодического действия**, **ферментере периодического действия с добавлением субстрата** и в **непрерывной культуре**.

Рост бактерий в периодической культуре. При внесении бактерий в питательную среду они обычно растут до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов среды не достигнет максимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов обмена, то получим так называемую периодическую культуру (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве). При данном выращивании посевной материал вводят в свежую питательную среду и проводят культивирование, не добавляя субстрат до тех пор, пока количество нужного продукта не достигнет максимума. Белки синтезируются в логарифмической фазе, НМВ во время стационарной фазы. Очень важно, чтобы клетки были собраны в нужное время. Рост в такой “закрытой системе” подчиняется закономерностям, действительным не только для одноклеточных, но и для многоклеточных организмов. Периодическая культура ведет себя как многоклеточный организм с генетически ограниченным ростом.

В периодической культуре условия все время меняются; плотность популяции бактерий возрастает, а концентрация субстрата уменьшается. Во многих физиологических исследованиях представляется, однако, желательным, чтобы клетки могли долгое время находиться в фазе экспоненциального роста при постоянной концентрации субстрата и неизменных прочих условиях. В какой-то мере приблизиться к такому положению

можно, многократно и достаточно часто перенося клетки в новую питательную среду. Периодически в ферментер добавляют субстрат и это приводит к удлинению экспоненциальной и стационарной фаз, к увеличению биомассы и количества метаболитов, синтезируемых в стационарной фазе. Свежую питательную среду добавляют через разные интервалы времени, для продления логарифмической фазы (*периодическая культура с добавлением субстрата*). Такую же цель можно достичь, если в сосуд, содержащий популяцию быстро растущих бактерий, в течение всего процесса непрерывно вносить (вводить) новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество бактериальной суспензии и отработанную среду. Именно такой метод положен в основу *непрерывного культивирования в хемостатах и турбистатах*.

Рост в хемостате. Хемостат состоит из сосуда культиватора, в который из особого резервуара поступает с постоянной скоростью питательный раствор. Благодаря аэрации и механическому перемешиванию в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и для быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора. По мере поступления в культиватор питательного раствора из него вытекает бактериальная суспензия. Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. Стабильность динамического равновесия культуры в хемостате обусловлена тем, что ее рост лимитирует концентрация какого-то субстрата. В хемостате скорость потока жидкости устанавливается на определенном уровне, а скорость роста культуры приходит в соответствие со скоростью потока. Хемостат представляет собой саморегулирующуюся систему, простую в работе; если скорость притока достаточно долго остается постоянной, то работа хемостата регулируется автоматически.

Рост в турбистате. Работа в турбистате основана на поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляющую систему поступление питательного вещества. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста бактерий приближается к максимальной. Работа с турбистатами технически сложнее, чем с хемостатами.

Системы непрерывного культивирования обладают **двумя** особенностями, полезными при изучении микроорганизмов. **Во-первых**, они обеспечивают стабильное получение клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, а **во-вторых** - дают возможность выращивать культуры при чрезвычайно низких концентрациях субстратов. Практические преимущества первой особенности очевидны. Выращивание микроорганизмов при низких концентрациях субстратов важно для изучения регуляции синтеза или катаболизма лимитирующего субстрата, для получения в результате селекции мутантов различных типов и для проведения экологических исследований.

Синхронизация клеточного деления (синхронная культура).

Для изучения метаболических процессов на протяжении цикла клеточного деления нужны такие суспензии, в которых клетки делились бы одновременно (синхронно).

Синхронная культура, т.е. культура, в которой все клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла. Чтобы достичь такого совпадения фаз цикла у разных клеток, прибегают к синхронизации культуры. Синхронизировать деление в какой-либо популяции клеток можно с помощью различных искусственных приемов, таких как изменение температуры, воздействие света, ограничение количества питательных веществ или пропускание микроорганизмов через специальный фильтр с целью получить клетки одного размера. Клеточная суспензия, синхронизированная той или иной обработкой,

после нескольких одновременных делений постепенно переходит снова к асинхронному делению, так что число клеток увеличивается в дальнейшем уже не ступенчато, а непрерывно.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Рост и размножение микроорганизмов.
- 2) Питательные среды. Классификация.
- 3) Фазы развития бактериальной популяции.
- 4) Периодическое и непрерывное культивирование.
- 5) Отличие хемостата от турбистата.
- 6) Синхронная культура.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1
2. **Гусев, М.В.** Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
3. **Лысак, В.В.** Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.

Дополнительная

1. Микробиология / А.В. Воробьев [и др.]. – М.: Медицина, 2003. – 336 с. – ISBN 5-225-04411-5
2. **Шлегель, Г.** Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 568 с.

Лекция 3

МЕТОДЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Световая микроскопия

Микроскоп (от греч. *micro* — малый, *scopos* — смотрю) — оптический прибор для изучения малых объектов, недоступных невооруженному глазу.

При микроскопировании окрашенных объектов необходимо создавать хорошее освещение, что достигается правильным использованием зеркала, конденсора и диафрагмы. При микроскопировании с искусственным светом (лучше пользоваться специальным осветителем) применяют плоское или вогнутое зеркало, полностью открывают диафрагму и поднимают конденсор. Для микроскопического изучения неокрашенных объектов следует ограничивать освещенность препарата, для чего суживают диафрагму и опускают конденсор.

Объективы представляют собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. На оправе объективов обозначается даваемое ими увеличение, например: X8, X40, X90.

Все объективы разделяются на *сухие* и *иммерсионные*, или погруженные.

Сухим называют такой объектив, между фронтальной линзой которого и рассматриваемым препаратом находится воздух. При этом ввиду разницы показателей преломления стекла (на котором находится изучаемый препарат) и воздуха, часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя.

При применении иммерсионного объектива между стеклом и линзой устанавливается однородная (гомогенная) среда (стекло препарата — масло — стекло объектива) с одинаковым показателем преломления. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не изменяя направления, попадают в объектив, чем и достигается наилучшее освещение мельчайших объектов. Для этого обычно пользуются кедровым маслом, показатель преломления которого (1,52) почти равен показателю преломления стекла.

Окуляры также обозначают по тому увеличению, которые они дают, например: X6, X7, X10, X12, X15.

Общее увеличение микроскопа равняется произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Таким образом, например, комбинация иммерсионного объектива с показателем увеличения X90 и окуляром X10 дает увеличение объекта в 900 раз и т. д. Микроскопы, употребляемые в повседневной работе, дают увеличение порядка 700—900.

Современные микроскопы имеют ряд усовершенствований для улучшения изображения и расширения границы видимости и дают увеличение порядка 3000.

Бинокулярный микроскоп — это обычный световой микроскоп, но его колонка имеет насадку с двумя тубусами и с двумя окулярами. При наблюдении объекта обоими глазами одновременно достигается большая резкость глубины, пластичность изображения, меньше утомляется зрение.

3.2. Фазовоконтрастная микроскопия

Фазовоконтрастная микроскопия применяется для изучения неокрашенных препаратов живых объектов, размножения микроорганизмов и т. д. Исследование таких объектов может проводиться и в затемненном поле зрения (при суженной диафрагме и

опущенном конденсоре) и в темном поле. Однако оба метода не дают возможности рассмотреть детали изучаемого препарата. Метод фазовоконтрастной микроскопии позволяет в прозрачном при обычной микроскопии препарате изучить внутреннее строение микроорганизма.

При прохождении пучка света через окрашенный препарат происходит изменение интенсивности света, т. е. меняется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения легко улавливаются человеческим глазом. Тот же пучок света, проходя через прозрачный неокрашенный препарат, не теряет своей интенсивности, а меняется только скорость прохождения света через объект, т. е. изменяется фаза колебания света. Такие фазовые колебания глаз не воспринимает. С помощью фазовоконтрастного устройства и происходит превращение фазовых невидимых изменений в амплитудные контрастные видимые. Основным условием фазовоконтрастной микроскопии является максимальная освещенность препарата. Фазовоконтрастное приспособление состоит из специального фазового конденсора, содержащего кольцевую диафрагму, и набора объективов, в которые вставлены фазовые пластинки в форме кольца. Конденсор и объективы устанавливаются на обычном микроскопе. Пучок света, проходя через кольцевую щель диафрагмы и объект, попадает в кольцо фазовой пластинки объектива и глаз наблюдателя.

Метод фазовых контрастов может быть положительным (на светлом фоне темное изображение объекта) или отрицательным (на темном фоне светлое изображение). Лучшие результаты наблюдаются при положительном фазовом контрасте.

3.3. Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых объектов и красителей светиться при освещении их ультрафиолетовыми лучами, синими или другими коротковолновыми лучами света. Люминесцентная микроскопия проводится с обычным микроскопом, снабженным источником ультрафиолетовых лучей и набором светофильтров, выделяющих коротковолновую часть спектра. Большая часть объектов не обладает собственной люминесценцией, поэтому при люминесцентной микроскопии пользуются обработкой объекта красителями, способными флюоресцировать. Такие красители получили название флюорохромов. К ним относятся акридиновый желтый, акридиновый оранжевый, пиронин и др. Используется при изучении внутриклеточных структур микроорганизмов.

3.4. Ультрафиолетовая микроскопия

Линзы изготавливают из кварца, так как для коротковолнового ультрафиолета стекло непрозрачно. Изображение приходится фотографировать, так как глаз ультрафиолетовые лучи не воспринимает.

3.5. Микроскопия в темном поле

Микроскоп с темным полем зрения отличается от обычного микроскопа способом освещения препарата: применяется яркое боковое освещение, вследствие чего получается изображение светящегося объекта на темном фоне. При этом косые лучи не попадают в объектив и, следовательно, в глаз наблюдателя, в силу чего поле зрения оказывается совершенно неосвещенным (темное поле зрения). В глаз наблюдателя попадают только лучи, натолкнувшиеся на своем пути на исследуемый объект и отраженные от него. Боковое освещение в микроскопе можно получить, используя кон-

денсор или объектив с затемненным центром или, более просто, вкладывая между линзами конденсора кружок черной бумаги с оставлением незначительной периферической части линз. Удобно пользоваться этим методом для наблюдения подвижности микробов в живом состоянии.

3.6. Электронная микроскопия

Если величина изучаемого объекта меньше 0,2 мкм, то изучение его морфологии возможно только с помощью электронного микроскопа, в котором вместо световых лучей используется поток электронов, дающего увеличение в 100-500 тысяч и более раз. С помощью наиболее совершенных электронных микроскопов удается рассмотреть белковые молекулы. Пучок электронов (вместо света) проходит через ряд электромагнитных линз. Изображение проецируется на флуоресцирующий экран. Весь путь пучка должен находиться в вакууме, т.к. воздух препятствует движению электронов. Объект должен быть высушен. Исследуют очень тонкие срезы не более 100 нм, т.к. электроны обладают низкой проникающей способностью.

По расположению линз и ходу лучей электронный микроскоп очень похож на проекционный светооптический микроскоп. В электронном микроскопе вместо световых лучей используется поток электронов. Источником электронов является электронная пушка (электроннолучевая трубка с катодом, состоящим из раскаленной нити, и анодом-цилиндром). Вылетевшие из нити электроны разгоняются высоким электрическим напряжением, пучок электронов попадает в конденсорную электромагнитную линзу, которая сводит их на рассматриваемый предмет, лежащий на тонкой пленке коллодия. После этого лучи попадают на объективную электромагнитную линзу, собирающую расходящиеся лучи и дающую первое (промежуточное) увеличение предмета.

Поток электронов через это отверстие попадает на проекционную электромагнитную линзу, снабженную апертурной диафрагмой. Второе увеличенное изображение, даваемое проекционной линзой, принимается на флуоресцирующий экран или на фотографическую пластинку. Можно прибегнуть также к последующему оптическому увеличению. С помощью электронной микроскопии удалось обнаружить многие важные особенности и детали морфологии микроскопических организмов — бактерий, вирусов, бактериофага и др.

3.7. Сканирующая микроскопия

Сканирующая микроскопия (от англ. скан – поле зрения) позволяет получать трехмерное, объемное изображение. Объект покрывают тонким слоем тяжелого металла, объект сканируется узким пучком электронов, наподобие того как делается в телевизионной трубке. Электроны, испускаемые той точкой объекта, на которую падает сканирующий пучок, собираются коллектором, и с помощью усилителя создается изображение на экране электронно-лучевой трубки. Контраст обусловлен тем, что количество испущенных образцом вторичных электронов пропорционально углу между электронным пучком и поверхностью объекта; это и позволяет выявить пространственную структуру последнего.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Световая микроскопия и фазово-контрастная микроскопия.
- 2) Люминесцентная и ультрафиолетовая микроскопия.
- 3) Отличие хемостата от турбистата.
- 4) Микроскопия в темном поле.
- 5) Сканирующая микроскопия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Гусев, М.В.** Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. **Лысак, В.В.** Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
3. **Карпунина, Л.В.** Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям для студентов специальности “Биоэкология”/ Л.В. Карпунина, Е.С. Мухачева. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова. – 2005. – 100 с.
4. Методы общей бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 130 с.
5. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 222 с.
6. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие ”/ А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.

Дополнительная

1. Микробиология / А.В. Воробьев [и др.]. – М.: Медицина, 2003. – 336 с. – ISBN 5-225-04411-5
2. **Шлегель, Г.** Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 568 с.

Лекция 4

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

4.1. Лабораторные животные и экспериментальная инфекция

Методы исследования, связанные с применением животных, называются биологическими, или экспериментальными, а используемые для этой цели животные - экспериментальными, или лабораторными. Наиболее широко в микробиологических лабораториях используют кроликов, морских свинок, белых мышей и крыс. Лабораторные животные являются донорами, у которых систематически берут кровь для получения сыворотки, плазмы, эритроцитов, лейкоцитов, необходимых при постановке многих серологических реакций и для приготовления кровяных питательных сред. Лабораторные животные служат также для диагностики некоторых инфекционных заболеваний, моделирования экспериментальных острых и хронических инфекционных процессов, установления вирулентности и токсигенности изучаемых штаммов микробов, определения активности приготовленных вакцин и исследования их на безвредность.

4.2. Содержание лабораторных животных и уход за ними

Помещение для содержания лабораторных животных, используемых в экспериментальных целях, называется виварием (от лат. *vivas* — живой). В структуру вивария входят:

- 1) отделение для карантинирования и адаптации вновь поступивших животных;
- 2) экспериментально-биологическая клиника для содержания животных, находящихся в опыте;
- 3) изоляторы для подозрительных на инфекционные заболевания и заведомо больных животных, уничтожение которых по условиям эксперимента нежелательно;
- 4) экспериментальное помещение (или манипуляционная), в котором осуществляются взвешивание, термометрия, заражение, вакцинация животных, взятие у них крови и некоторые другие процедуры.

Оборудование экспериментального помещения определяется в каждом конкретном случае задачами и условиями проводимых научных исследований.

Карантинное отделение, отделение для подопытных и изоляторы для инфицированных животных размещаются в помещениях, строго изолированных одно от другого и от всех остальных помещений вивария. Кроме основных перечисленных выше структурных единиц, в составе вивария должны находиться: а) кормокухня - из двух смежных помещений для переработки и изготовления кормов с самостоятельными выходами в коридор из каждого помещения, кладовая со специально оборудованными ларями (металлическими или обитыми внутри жстью) и холодильниками для хранения запаса кормов, б) дезинфекционно-моечное отделение из 2 комнат, объединенных переходным автоклавом или сухожаровой камерой. Работа дезинфекционно-моечного отделения определяется состоянием материала, поступающего на обработку. Инфицированный материал, например клетки, подстилки, кормушки, вначале дезинфицируют, а затем подвергают механической чистке и мойке. Материал, не представляющий опасности для заражения, вначале подлежит механической очистке, а затем (при необходимости) стерилизации. Моечное помещение в правильно организованном виварии имеет мусоропровод для удаления нечистот и грузоподъемник для доставки в виварий материала и оборудования. Рядом с дезинфекционно-моечным отделением размещаются склад чис-

того (запасного) инвентаря с клетками, поилками, кормушками и т. п., бытовые помещения и санитарный блок (душевая и туалет) для обслуживающего персонала.

В соответствии с существующими санитарными правилами виварий размещается в отдельно расположенном здании или на верхнем этаже лабораторного корпуса. При размещении вивария в лабораторном корпусе он должен быть полностью изолирован от всех других помещений. Помещение для содержания лабораторных животных должно быть теплым, светлым и сухим с центральным отоплением, естественным и искусственным освещением, принудительной приточно-вытяжной вентиляцией, подводкой горячей и холодной воды. Полы в виварии делают из водонепроницаемого материала, без плитусов, с уклоном к отверстиям или желобам, присоединенным к канализации. Стенки покрывают глазурованной плиткой, потолки и двери окрашивают масляной краской.

4.3. Способы заражения лабораторных животных

В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутривенным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшинным, интравенным, пероральным или интраназальным. При перечисленных способах, за исключением перорального и интраназального, заражение осуществляется с помощью шприца.

Взвесь микробной культуры, эмульсию из зараженных органов или кровь больного осторожно набирают в шприц, после чего конец иглы закрывают кусочком ваты, смоченным 5% раствором хлорамина, 5% раствором карболовой кислоты или спиртом. Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Загрязненную вату бросают в банку с дезинфицирующим раствором.

Внутрикожный способ заражения. При этом способе применяют тонкие (№ 18-20) острые иглы с небольшим скосом. Кожу в месте введения материала растягивают I и II пальцами левой руки, правой рукой вводят иглу под очень острым углом, почти касаясь кожи. Конец иглы должен быть виден через эпидермис: при введении материала эпидермис приподнимается в виде четко ограниченного бугорка, кожа над ним становится прозрачной и пористой, вследствие чего ее сравнивают иногда с лимонной корочкой. Материал вводят в объеме до 0,1 мл обычно в кожу спины или живота.

Подкожный способ заражения. Кожу в месте введения материала берут у ее основания, приподнимают I и II пальцами левой руки. Иглу шприца вкалывают снизу образовавшейся складки. Проколов кожу и пройдя вглубь на несколько миллиметров, иглу отклоняют вправо или влево и затем медленно вводят материал, содержащийся в шприце. Изменять направление иглы под кожей рекомендуется для того, чтобы введенное вещество не выступало через прокол кожи наружу. Затем складку кожи опускают, на место укола накладывают ватный тампон, смоченный спиртом или спиртовым раствором, а иглу быстро вынимают. Наиболее удобными местами для подкожного введения материала у кроликов и морских свинок являются область спины и боковые поверхности несколько ниже подмышечных впадин, у крыс и мышей - область спины, крестца и затылка. Количество жидкости, вводимой подкожно, не должно превышать 30 мл для кроликов, 15 мл - для морских свинок, 10 мл - для крыс и 1 мл - для мышей.

Внутримышечный способ заражения. Выбирают участок тела с наиболее развитым мышечным слоем. У кроликов, морских свинок, крыс и мышей таким местом является наружная верхняя треть бедра задней лапы. Захватывают I и II пальцами левой руки толстую мышечную складку и вводят иглу почти под прямым углом в глубь мышц.

Объем жидкости, допустимый для внутримышечного введения, составляет для кроликов 8 мл, для морских свинок - 5 мл, для крыс - 3 мл, для мышей - 0,5 мл.

Внутрибрюшинный способ заражения. Помощник держит животное вниз головой. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что в значительной мере уменьшает возможность его повреждения в момент прокола. У животных (за исключением мышей) в нижней трети живота, несколько отступя от средней линии, делают скальпелем или остроконечными ножницами надсечку кожи длиной 2-3 мм и через нее вводят притупленную иглу, держа шприц перпендикулярно к брюшной стенке. Преодолевая сопротивление, очень осторожно, бурящими движениями иглу продвигают вглубь. Чувство «провала», исчезновение ощущения сопротивления на пути говорят о проникновении иглы в брюшную полость. После этого иглу переводят в вертикальное положение и вводят содержащийся в шприце материал в полость брюшины. Внутрибрюшинно можно вводить до 30 мл жидкости кроликам, до 10 мл - морским свинкам, до 5 мл - крысам, до 2 мл - мышам.

Внутривенное заражение крыс и мышей. Крыс и мышей заражают в боковую вену хвоста. Непосредственно перед введением материала хвост животного, чтобы вызвать гиперемия сосудов, погружают в сосуд с водой, подогретой до 50 °С, смазывают ксилолом или толуолом. После того как сосуды заметно набухают, корень хвоста сдавливают пальцами. Для введения материала лучше всего пользоваться туберкулиновыми иглами, очень тонкими и короткими, с косым срезом. При введении иглы в вену шприц держат под острым углом, почти параллельно оси хвоста. Иглу повертывают отверстием наружу. Корень хвоста освобождают от сдавливания. Как и в предыдущем случае, нахождение иглы в вене определяют по легкости введения материала и отсутствию заметного уплотнения в месте, где находится игла. Взрослым белым крысам допускается вводить до 6 мл жидкости, мышам - до 0,5 мл.

Заражение через пищеварительный тракт. Заразить животное через рот можно двумя способами. Материал, предназначенный для заражения, примешивают к корму или питью животного. Такой способ является наиболее простым и естественным, однако в лабораторной практике применение его ограничено, поскольку количество материала, попадающее в организм заражаемого животного, не подлежит точному учету. Поэтому значительно чаще материал, предназначенный для заражения, вводят животному шприцем, игла которого имеет незначительный изгиб и утолщение на конце в виде оливы. Наличие изгиба допускает введение иглы в пищевод животного. Диаметр иглы для мышей должен быть не более 1 мм, для крыс - 1-1,5 мм, длина - соответственно 35-45 и 70-75 мм.

4.4. Определение вирулентности микробов

Вирулентность - биологическое свойство микроба, характеризующее степень его патогенности в момент исследования. В отличие от патогенности вирулентность является не видовым, а индивидуальным признаком микроба, который может усиливаться или ослабляться вплоть до полного исчезновения под влиянием различных факторов внешней среды. Для характеристики вирулентности пользуются количественными показателями, определяющими способность исследуемой микробной культуры вызывать гибель искусственно зараженных ею подопытных животных. Изучение вирулентности бывает сопряжено с рядом трудностей, так как она определяется не только комплексом культурно-морфологических, токсигенных и биологических свойств микроба, но и резистентностью микроорганизма, подверженной большим колебаниям в связи с видом,

возрастом животных, режимом их питания, температурой внешней среды, а также способом заражения, принятым в опыте. Поэтому при установлении вирулентности микроба очень важно вести исследование, точно соблюдая стандартность всех условий опыта. Для определения вирулентности микробных культур чаще всего используют белых мышей. В том случае, когда белые мыши невосприимчивы к исследуемому возбудителю заболевания, пользуются другими видами животных: крысами, морскими свинками или кроликами. Для определения вирулентности применяют молодую культуру микроба, так как старые культуры содержат большое количество мертвых клеток. Культуру микроба для заражения выращивают на мясо-пептонном агаре или другой плотной питательной среде, так как бульон, представляя собой сложный белковый субстрат, небезразличен для животного организма и может извращать результаты опыта. Исследуемую культуру микроба, выращенную на скошенном мясо-пептонном агаре, смывают изотоническим раствором хлорида натрия и стандартизируют по оптическому стандарту так, чтобы в 1 мл этого раствора содержалось определенное количество микробных тел. В зависимости от вида культуры, патогенности ее для животных, взятых в опыт, а также от цели и задач исследования количество микробных тел, содержащееся в 1 мл взвеси, может колебаться от единиц до миллиардов. В тех случаях, когда по каким-либо причинам получить агаровую культуру невозможно, пользуются суточной бульонной культурой.

Для определения D_{1m} из бульонной культуры готовят ряд последовательных, десятикратных разведений: 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000, 1 : 100 000 и т. д. Исследуемую взвесь бактерий вводят различными способами: внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, интраназально - в зависимости от целей и задач исследования. Отстандартизованную взвесь микробов в изотоническом растворе хлорида натрия, а также разведения бульонной культуры готовят с таким расчетом, чтобы различные дозы микроба, используемые в опыте, содержались в одинаковых объемах жидкости. Каждую дозу культуры вводят одновременно нескольким животным. При определении минимальной смертельной дозы учитывают и отмечают в протоколе опыта следующие данные:

- 5) количество микробов, введенных в организм животного;
- 6) способ их введения;
- 7) масса тела зараженного животного;
- 8) сроки гибели после заражения.

Степень вирулентности чаще всего характеризуют тремя следующими показателями:

1) Минимальная смертельная доза D_{1m} (Dosis letalis minima), т. е. наименьшая доза микробов, которая при определенном способе заражения, в определенных условиях опыта вызывает гибель около 95% подопытных животных.

2) Наименьшая безусловно смертельная доза D_{cl} (Dosis certe letalis) - наименьшая доза микробов, являющаяся смертельной для всех 100% животных, взятых в опыт.

3) Средняя смертельная доза микробов LD₅₀ (Dosis letalis 50%) - доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных.

Показатель LD₅₀ позволяет получить более достоверные результаты и потому он чаще других используется в практике экспериментальных исследований.

4.5. Определение токсигенности микробов

В патологии человека большую роль играют токсигенные микроорганизмы, к которым относятся палочки ботулизма толбняка, газовой анаэробной инфекции, дифтерии а также некоторые штаммы бактерий дизентерии Григорьева - Шига, стафилокока и стрептококка. Экзотоксины, вырабатываемые различными представителями этой группы микробов, обладают резко выраженной токсичностью, высокой избирательностью действия с поражением отдельных органов и тканей и способностью при парентеральном введении в организм вызывать образование антител - антитоксинов, способных нейтрализовать соответствующие им экзотоксины. Продуцируемые в процессе жизнедеятельности микроба экзотоксины легко диффундируют из клетки в окружающую их питательную среду. Бульонную культуру микроба выдерживают в термостате в течение 2 -3 нед для накопления в ней токсина, затем фильтруют через бактериальный фильтр. Получаемый при этом прозрачный фильтрат содержит неразведенный токсин. Токсигенность микробов определяют по тому же принципу, что и вирулентность. Единицами измерения токсигенности, как и вирулентности, являются минимальная смертельная доза (D_{1m}) и средняя смертельная доза (LD₅₀).

Для определения D_{1m} и LD₅₀ фильтрат бульонной культуры разводят стерильным изотоническим раствором хлорида натрия в сотни, тысячи и миллионы раз. Каждую дозу токсина испытывают одновременно на 6-10 животных. Для постановки проб подбирают животных, наиболее чувствительных к исследуемому токсину. Например, дифтерийный токсин титруют на морских свинках, столбнячный токсин - на мышах. При учете полученных результатов в протоколе опыта отмечают дозу введенного токсина, способ его введения, массу тела животного и время наступления его гибели после введения токсина.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Какие методы называют биологическими.
- 2) Содержание лабораторных животных и уход за ними.
- 3) Способы заражения животных.
- 4) Определение вирулентности микробов.
- 5) Определение токсигенности микробов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1
2. Методы общей бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 130 с.
3. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 222 с.
4. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие / А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.

Дополнительная

1. **Антонов, Б.И.** Лабораторные исследования в ветеринарии. Химико-токсикологические методы / Б.И. Антонов, В.И. Федотова, Н.А. Сухая. – М.: Агропромиздат. – 1989. – 320 с.
2. **Лабинская, А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.

Лекция 5

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1. Хроматография

Распределительная хроматография – разделение за счет различной растворимости разделяемых компонентов в 2 жидких фазах (вода-органическое вещество, которое не смешивается с водой) – хроматография на бумаге, для разделения аминокислот. ТХ – подложка(орг., неорг., окись алюминия, пластик и т.д.).

Колоночная хроматография. Михаил Цвет в 1910 использовал глину в колонке (его работа “Хроматография”). В 1956 г. Смитнс – распределение краски в крахмальном геле. Он установил фактор фильтрации и зависимость м.м. от пористости носителя. Важна геометрия молекулы. В геле есть плотный компонент – строма – строго упорядоченная трехмерная структура и жидкий компонент, который заполняет все поры (вода, буфер). Малая молекула в воде перемещается одинаково во все стороны (3-н Энштейна). Большие молекулы – взаимодействуют со стромой геля. Малые молекулы легко проходят – это “ситевой эффект” геля. Средние молекулы взаимодействуют с гелем – ионные взаимодействия, водородные, гидрофобные, Ван-Дер-Вальсовы силы. Крупные молекулы задерживаются в геле, не проходят через гель. Впервые это описал Перенс.

Гель-фильтрация (обычная хроматография) – метод основан на различиях в гидродинамических размерах разделяемых веществ “ситевой эффект”. Происходит распределение вещества между жидкой и твердой фазами геля. Мелкие мол. быстро проходят, средние – задерживались в ячейках геля, крупные – задерживались. Осуществляется с помощью гелей – молекулярных сит с определенным диаметром пор. Наиболее распространенными носителями для гель-хроматографии белков являются сефадексы, сефакрилы, сефароза, биогели А и Р. Подложка используется как молекулярное сито. Распределение происходит по молекулярным весам.

Сефадекс- продукт взаимодействия определенных фракций декстрана с эпихлоргидрином. Декстран – полимер ангидроглюкозы, продуцируемый различными шт. *Leconostoc mesenteroides* на средах с сахарозой. Номера типов сефадексов имеют отношение к значению емкости по воде этих гелей. Например, G-10 имеет значение емкости по воде равное 1 (1мл/г сухого геля).

Биогели – сшитый полиакриламид.

Сефароза (агароза). Агароза –линейный полисахарид построенный из Д-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Выделяют агарозу из агара – полисахарида красных морских водорослей.

Toyopearl (выпускает японская фирма) содержит ОН группировки (ионогенные группировки). Обладает малой зависимостью от рН, высокой химической устойчивостью, не используется микроорганизмами, выдерживает высокую температуру, не изменяет своих характеристик практически во всех органических растворителях, не связывается с углеводами.

Аффинная хроматография – при этом методе сорбция осуществляется за счет биоспецифического взаимодействия между молекулами, закрепленными на матрице (т.е связанными в неподвижной фазе) и комплементарными к ним молекулами, подлежащими очистке или фракционированию. Биоспецифическое взаимодействие отличается исключительной избирательностью и очень высокой степенью родства ме-

жду партнерами. Основана на биологическом сродстве белков к носителю. К носителю пришивают лиганд к “нашему” белку.

Ионообменная хроматография (ИХ) – в основе разделения лежат реакции ионного обмена между разделяемыми соединениями и сорбентами – ионитами, имеющими в своем составе ионизируемые группы. Возможность фракционирования компонентов смеси белков обусловлена различием в значениях их суммарных зарядов. При ИХ смесь белков сорбируется в результате электростатического взаимодействия разноименно заряженных ионов, а затем вытесняется веществами, уменьшающими их сорбцию на ионообменнике. Понижение сорбции осуществляют, изменяя либо ионную силу раствора, либо его рН путем создания ступенчатой или градиентной элюции. Ранее все ионообменники называли смолами. Смолы – это полимеры, имеющие ячейки в которых торчат или катиониты или аниониты, происходит сорбция на этой смоле.

Аниониты: DEAE, аминоэтил.

Катиониты: сульфопропил, КМ-целлюлоза, Дауэкс –50.

Наиболее распространенными ионообменниками для разделения белков являются ионообменники на основе целлюлозы и сефадекса.

Недостаток – неспецифическая сорбция.

- Na⁺ 1+ 2+
- Na⁺
- Na⁺

1 вещество будет вытеснять Na, а 2 вещество выйдет из колонки. 1 затем выбивают ионной силой.

Адсорбционная (ионная, Ван-Дер-Вальсовы силы, водородные, гидрофобные связи) – выявлено три формы Са-фосфатного геля. Са выступает как катион, Р – как анион. Са связывает все кислотные группировки, а Р – основные. Носители: окись алюминия, целит, силикаты магния, уголь и т.д. Основана на специфической адсорбции. Носители: неполярные – уголь, полярные – окись алюминия, гидроксиапатит. Последовательная элюция, повышение концентрации.

Высокоэффективная хроматография.

HPLC – How Proteins Like to be Chromatography (как белки хочется разделить)- высокоскоростная под давлением жидкостная хроматография, пришла с Запада, а исторически метод разработан в России. Цвет (Тарту) разгонял краску под давлением

FPLC – (Fast Protein Liquid Chromatography) (фаст – быстрая) – прогрессивная система высокоэффективной хроматографии, разработана и производимая сначала фирмой Pharmacia Fine Chemicals. Колонка из материала – титан, боросиликатное стекло и тефлон. Гранулы: Monobeads Тм (монобитс) размер пор более 500° А, устойчивость в диапазоне рН 2-12. Можно осуществлять ионообменную хроматографию, гидрофобную, аффинную, гель-фильтрацию и т. д.

Выпускают три типа колонок: Mono Q ТМ- анионообменник, Mono S ТМ – катионообменник ихроматофокусировка. Основой FPLC является ионообменная хроматография на сильном анионообменнике Mono Q ТМ (4 аниона) и катионообменнике Mono S ТМ. Носитель фенил –Superose HR 5/5.

Гранулы должны быть жесткими, идентичными по размерам ~ 10 мк, частицы малого и одинакового размера, высокой пористости, чтобы дать давление. Носители на основе силикагелей, обладающие инертной поверхностью.

5.2. Электрофорез

Впервые электрофоретические исследования были проведены в 1809-1811 гг. проф МГУ (голланд. происхождения) Ф. Рейш (Reus).

Электрофорезис – электро - заряд, форезис – движение. Электрофорез это перемещение заряженных частиц под действием электрического поля.

Классический электрофорез с подвижной границей (прибор) был предложен А. Тизелиусом в 1933 г. (электрофорез в растворе) представляет метод выделения отдельных компонентов смеси и анализа чистоты полученных препаратов, а также метод анализа сложных многокомпонентных систем макромолекул, основанный на различии их скорости миграции в электромагнитном поле. Скорость перемещения заряженных частиц прямо пропорциональна силе тока, заряду и обратно пропорциональна вязкости среды и размеру частиц.

Проведение препаративного электрофореза сопряжено со значительными техническими трудностями, поэтому используется нечасто. В аналитическом же варианте электрофорез – один из наиболее широко применяемых методов исследования.

В 1964 г. Орнштейн предложил использовать синтетическую гелевую среду – поперечносшитый полиакриламид, ПААГ (продукт сополимеризации акриламида и сшивающего агента N'-метиленбисакриламида в присутствии катализаторов). Достоинства ПААГ: термостабильность, прозрачность, механическую прочность, сравнительную химическую инертность. Высокая разрешающая способность ПААГ объясняется также эффектом “молекулярного сита”, осуществляемого благодаря контролю размера пор. Возможность применения в одном блоке гелей различной концентрации и состава позволяет еще больше увеличить разрешающую способность этой поддерживающей среды.

Малая конц. акриламида (крупнопористый концентрирующий гель), высокая конц. акриламида (мелкопористый концентрирующий гель).

Первоначально электрофорез в ПААГ назывался диск-электрофорезом. Это название отражало две основные особенности метода: применение прерванных буферных систем (от англ. discontinuous) и концентрирование образцов в гелевых трубках в виде дисков.

1 вариант – бумажный электрофорез (в качестве подложки используют целлюлозу для аминокислот и пептидов),

2 вариант- тонкослойный электрофорез (также целлюлоза, для аминокислот и пептидов),

3 вариант, когда подложка обладает сетевидным эффектом (агароза, ПААГ).

Если белок остается на старте, значит он очень большой (ПААГ большой конц. т.е. очень мелкопористый).

Электрофорез в нативных условиях, т.е. в растворе он сохраняет свои нативные свойства.

Электрофорез в денатурирующих условиях (8М мочевины или додецилсульфат натрия (SDS) садится на белок, чем более гидрофобный белок, тем больше садится SDS, тем больший (-) заряд приобретает белок. В присутствии SDS все белки приобретают (-) заряд и разделение идет не по нативной форме, а по м.м., чем больше м.м. тем медленнее идет белок (эта зависимость линейная). В присутствии SDS полипептидные цепи делятся по размерам. Вносим белки разной м.м., измеряем расстояние, которое он пробежал, строят калибровку (логарифмический график зависимости

электрофоретической подвижности от молекулярной массы) и определяют м.м. “нашего” белка. Имеется “кит-набор” – набор белков с различными м.м.

Для окрашивания – бромфеноловый синий (при щелочных рН и с SDS, т.к. в этих условиях он (-) и метиленовый зеленый (при кислых рН). Без покраски, если белок обработать ФИТЦ и после фореа под УФ видны полосы.

Мах ПААГ – 20-22 % (для разделения маленьких белков).

Агароза – для разделения больших белков.

В нативных условиях 200 000, в денатурирующих с SDS 60 000, значит это тример.

Изоэлектрофокусировка (Свенцем, 1962) – разделение белков в градиенте рН 8,0

3,0. Каждый белок имеет рi и остановится на своем месте. Амфолины используют для создания градиента рН (это смесь полиаминов-поликарбонновых аминокислот).

Двумерный фореа (O Farrell, 1975) –меняем направление и если белки не отличались, при других рН будут отличаться); применение – для идентификации белков различных штаммов).

Вопросы для самоконтроля

- 1) Хроматография. Виды хроматографий.
- 2) Электрофореа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Димитриев, А.Д.** Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие ”/ А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.
3. **Филлипович, Ю.Б.** Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

Дополнительная

1. **Бреслер, С.Е.** Молекулярная биология / С.Е. Бреслер. – М.: Наука. – 1973. – 580 с.
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология / Б.Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 585 с.
3. **Игнатов, В.В.** Методическое пособие по химии белка к большому практикуму по биохимии / В.В. Игнатов, С.К. Ступникова, Л.Н. Яблокова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1969. – 36 с.
4. **Кнорре, Д.Г.** Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7

5. **Лабинская, А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 397 с.
6. **Ленинджер, А.** Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 960 с.
7. **Мельников, Г.В.** Методическое пособие к малому практикуму по биохимии / Г.В. Мельников, С.К. Ступникова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1978. – 40 с.
8. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т.Т. Березова. – М.: Медицина, 1976. – 296 с.

Лекция 6

ИММУНИТЕТ И МЕТОДЫ ЕГО ИЗУЧЕНИЯ

6.1. Иммуниет. Виды иммуниетета

Под термином «иммуниет» (от лат. *immunitas* — избавление от дани) подразумевают систему наследственно полученных и индивидуально приобретенных защитных анатомофизиологических признаков, которые обеспечивают постоянство внутренней среды макроорганизма, определяют невосприимчивость его к действию патогенных микробов и их токсинов. Иммуниет может быть **врожденным и приобретенным**.

Врожденный иммуниет, являясь преимущественно' видовым признаком, развивался в процессе длительной эволюции взаимоотношений макроорганизма и «патогенного микроба». В результате в организме животного и человека формировались тканевые и гуморальные защитные приспособления, обуславливающие состояние невосприимчивости к некоторым инфекционным заболеваниям, передающимся по наследству.

Примером видового иммуниетета может служить невосприимчивость человека к куриной холере, животных - к дизентерии, птиц - к сибирской язве, лягушек - к столбняку. Напряженность видового иммуниетета настолько высока, что заражение естественно резистентных экспериментальных животных заведомо смертельными дозами вирулентных микробов не нарушает присущего им иммуниетета и не вызывает заболевания.

Приобретенный иммуниет по характеру происхождения делится на естественный и искусственный, а по механизму своего действия - на активный и пассивный.

При активных формах естественно и искусственно приобретенного иммуниетета организм сам вырабатывает антитела - защитные вещества белковой природы, действие которых направлено против микробов и продуктов их жизнедеятельности. Современной наукой установлено, что антитела вырабатываются лимфоидной системой, клетки которой сконцентрированы в лимфоидных органах (селезенка, лимфатические узлы, вилочковая железа) и рассеяны в подкожной клетчатке и подслизистых слоях пищеварительного, дыхательного тракта и мочеполовой системы.

Естественно приобретенный активный иммуниет возникает в результате перенесенного инфекционного заболевания или повторных инфицирований организма, не сопровождающихся клинически выраженными симптомами болезни.

Искусственно приобретенный активный иммуниет создается в результате вакцинации, когда в ответ на введение живых ослабленных или убитых микробов, а также продуктов их жизнедеятельности в организме животных или человека образуются антитела, аналогичные тем, которые возникают при естественно приобретенном активном иммуниете.

Приобретенный активный (естественный или искусственный) иммуниет не передается по наследству и для многих инфекционных заболеваний, не будучи пожизненным, утрачивается с годами.

При пассивном иммуниете в организм вводятся готовые антитела. Естественно приобретенный пассивный иммуниет к некоторым инфекционным заболеваниям имеют новорожденные, приобретая антитела в период внутриутробного развития через плаценту и после рождения — через молоко матери.

Искусственный пассивный иммуниет воспроизводится посредством введения в организм животных и человека иммунных сывороток, содержащих антитела. Защитное

действие искусственно приобретенного пассивного иммунитета начинается в ближайшие часы после введения иммунной сыворотки и прекращается через 2—3 нед вследствие разрушения введенных в организм антител.

Для активных и пассивных форм естественного и искусственного иммунитета характерна высокая специфичность, обусловленная тем, что защитные антитела, формирующиеся в процессе иммуногенеза или введенные в организм с иммунной сывороткой, реагируют только с теми бактериями и продуктами жизнедеятельности тех микробов, против которых они вырабатывались.

Наряду со специфическими механизмами иммунитета в комплексе защитных реакций организма большая роль принадлежит факторам естественной невосприимчивости, которые, не обладая какой-либо иммунологической специфичностью, обеспечивают защиту организма при встрече его с различными видами патогенных и непатогенных микробов. Неспецифическая защита организма осуществляется с участием клеточных систем в виде фагоцитоза и местной воспалительной реакции, препятствующих распространению микробов в организме, а также гуморальных факторов, в частности лизоцима и комплемента, которые в совокупности обуславливают бактериостатическое и бактериолитическое действие сыворотки.

6.2. Серологические методы, применяемые для изучения факторов гуморального иммунитета

Во всех иммунологических реакциях основным компонентом является антиген - вещество белковой природы, обладающее двумя свойствами: способностью вызывать иммунологический процесс в организме и соединяться с антителами в серологических реакциях. Микробная клетка представляет собой сложный антигенный комплекс. С телом ее связан соматический (от лат. soma - тело) антиген, обозначаемый буквой «О». У подвижных микробов обнаружен жгутиковый антиген «Н». Микроорганизмы, находящиеся в капсульной форме, имеют капсульный антиген. Разные виды микробов имеют различные видовые антигены, специфические для каждого вида, и типовые антигены, обуславливающие существование различных серологических типов внутри вида. Родственные между собой виды микробов могут иметь общие, или групповые, антигены. Они обнаружены у представителей бактерий кишечной группы: бактерий брюшного тифа, паратифа А, В и др. При введении в организм животного каждый антиген стимулирует образование особых белковых веществ - антител, относящихся гамма - глобулиновой фракции сыворотки. Отличительной особенностью антител является их способность образовывать специфические соединения с соответствующими антигенами. Антитело можно обнаружить *in vitro*. Для этого к сыворотке крови, содержащей антитела, прибавляют бактерии, вызвавшие их образование, или белок микробов, полученный посредством разрушения бактериальных тел. Внешним проявлением реакции взаимодействия антигена с антителом в пробирке может быть агглютинация, т. е. образование видимых хлопьев вследствие окучивания и склеивания целых микробных клеток; преципитация - осаждение видимого осадка, состоящего из вступивших друг с другом в соединение белков - антигена и антител; бактериолиз - растворение микробных тел и др.

Реакции взаимодействия антитела с антигеном получили название серологических от лат. Serum - сыворотка. Серологические реакции отличаются высокой специфичностью. Это позволяет использовать их при решении двоякого рода задач: 1) для обнаружения в сыворотке крови антител к тому или иному микробу с помощью извест-

ного специфического антигена (при серодиагностике заболевания); 2) для установления вида или типа выделенного микроба по его антигенной структуре с помощью диагностической сыворотки, содержащей известные специфические антитела.

6.3. Реакция агглютинации

Агглютинацией называется обнаруживаемое невооруженным глазом склеивание и выпадение в осадок микробных тел при взаимодействии их со специфическими антителами - агглютинаинами. Видимая фаза агглютинации наступает в присутствии раствора электролита. Агглютинины содержатся в сыворотке крови человека и животных, перенесших инфекцию или искусственно иммунизированных соответствующим видом микроба. Благодаря специфичности и простоте постановки реакция агглютинации получила широкое распространение в микробиологической практике для диагностики многих инфекционных заболеваний. Существуют различные модификации постановки реакции агглютинации. Из них наибольшее значение имеют:

- 1) Макроскопическая объемная агглютинация в пробирках (классический метод).
- 2) Ускоренная ориентировочная реакция агглютинации на предметном стекле.

Постановка развернутой реакции агглютинации объемным способом. Для постановки реакции агглютинации требуется: 1) сыворотка крови, подлежащая исследованию, в количестве 0,1- 0,2 мл; 2) изотонический раствор хлорида натрия; 3) корпускулярный антиген: взвесь живых или убитых бактерий (диагностикум).

Положительный результат реакции агглютинации характеризуется образованием на дне пробирки осадка с выраженным просветлением надосадочной жидкости. Остаток на дне пробирки, образовавшийся в результате склеивания микробных тел, называется а г г л ю т и н а т о м. По характеру агглютината различают мелкозернистую (О) и крупнохлопчатую (Н) агглютинацию. О-агглютинины, возникшие в организме под действием соматического О-антигена, обуславливают склеивание микробных тел с образованием компактного мелкозернистого осадка, оседающего на дно пробирки в виде кучки. Мелкозернистая агглютинация протекает медленно, учитывается после 2-часового пребывания в термостате и 18- 20-часового выдерживания пробирок при комнатной температуре. Н-агглютинины, появляющиеся в организме в ответ на введение жгутикового антигена, вызывают склеивание бактериальных клеток посредством их жгутиков с образованием крупных хлопьев, похожих на снежинки. Выпадая на дно пробирки, крупнохлопчатый агглютинат приобретает форму опрокинутого вниз зонтика. Крупнохлопчатая агглютинация наступает и заканчивается в течение 2 ч пребывания пробирок в термостате. Жгутиковые агглютинины, как правило, достигают более высокого титра, чем соматические. Крупнохлопчатый Н-агглютинат легко обнаруживается простым глазом. Для выявления мелкозернистого О-агглютината приходится пользоваться агглютиноскопом или вогнутым зеркалом.

Учет результатов реакции агглютинации начинают с просмотра контрольных пробирок. Реакция может считаться положительной лишь в том случае, если в пробирках с контролями жидкость остается совершенно однородной: в КА (контроль антигена) - слегка

мутной, в КС (контроль сыворотки) - прозрачной.

Для регистрации результатов реакции агглютинации пользуются четырехкrestной системой обозначения:

+ + + + полная агглютинация, при которой большой осадок на дне располагается кучкой или в форме открытого перевернутого зонтика; надосадочная жидкость в пробирке совершенно прозрачна;

+ + + почти полная агглютинация; осадок такой же, как в предыдущем случае; жидкость почти прозрачная;

+ + слабая агглютинация; небольшой осадок, жидкость непрозрачная; + «отмечают следы агглютинации: осадок едва заметен; жидкость непрозрачная;

отрицательная реакция: содержимое пробирок равномерно мутное, без осадка, по виду неотлично от содержимого пробирки КА.

Последнее разведение сыворотки, в котором наблюдается агглютинация, считают ее титром.

6.3. Реакция преципитации

Реакция преципитации относится к числу наиболее простых и ускоренных методов серологического анализа. В основе реакции лежит образование видимого осадка, состоящего из вступивших друг с другом в соединение антител и молекулярных антигенов (например, бактериальных белков или полисахаридов, образовавшихся при разрушении микробных тел). По своей сущности реакция преципитации аналогична реакции агглютинации. Основным различием между ними является то, что в первом случае применяется корпускулярный антиген, а во втором - антиген представляет собой коллоидное вещество белковой или полисахаридной природы. Другим существенным различием является то, что агглютинация представляет собой количественный метод исследования, с помощью которого устанавливают титр агглютининов, содержащихся в исследуемой сыворотке крови. Реакция преципитации - качественный метод исследования, при котором диагностическое значение имеет появление осадка в реагирующих жидкостях. Для обозначения антигенов, участвующих в реакции преципитации, принят термин «преципитиноген», для антител - «преципитин», для специфического осадка, образующегося в результате реакции - «преципитат». Преципитат, возникающий вследствие укрупнения коллоидных частиц антигена, может иметь вид кольца, формирующегося на границе антигена с иммунной сывороткой, или аморфного осадка, выпадающего на дно пробирки.

Реакцию преципитации используют для: 1) выявления специфических антител в исследуемой сыворотке на основе применения определенных антигенов; 2) обнаружения антигенов белковой или полисахаридной природы с использованием известной, специфической, преципитирующей сыворотки.

Для постановки реакции преципитации необходимы:

1) Сыворотки (в зависимости от задач опыта - исследуемые или иммунные - преципитирующие).

2) Антигены (также в зависимости от задач анализа - исследуемые или диагностические).

3) Изотонический раствор хлорида натрия рН 7,0- 7,2.

4) Пастеровские пипетки с тонко оттянутым капилляром.

5) Преципитационные пробирки (диаметром 2- 3 мм и высотой 2- 3 см для реакции кольцепреципитации, диаметром 4 мм и высотой 4- 6 см для реакции преципитации по типу флокуляции). В узких пробирках реакция преципитации наступает значительно скорее и проявляется более четко, чем в пробирках большого диаметра.

Антигены, применяемые для постановки реакции преципитации, представляя собой, как указано выше, коллоидные вещества в состоянии тонкой дисперсности, обязательно должны быть в растворимом состоянии. В качестве антигенов для реакции преципитации используют фильтраты бульонных культур, экстракты микробных тел, полученные различными способами, «полный» антиген Буавена, экстракты пораженных органов, спинномозговую жидкость, гной, мокроту и другие материалы, содержащие продукты распада возбудителей болезни. Способы приготовления антигена для постановки реакции преципитации даны в разделе частной микробиологии конкретно для каждого случая.

Преципитирующие сыворотки, приготовленные против различных видов микробов, реагируют с антигенами, полученными только от этих видов микробов. Однако наличие общих антигенов у родственных видов бактерий может обуславливать возникновение групповой реакции преципитации.

Участвующие в реакции ингредиенты должны быть совершенно прозрачны. Для этого их центрифугируют или фильтруют через бактериальный фильтр.

Реакцию преципитации можно ставить в виде смеси различных разведений антигена с антителом или в виде реакции кольцепреципитации с наслоением одного компонента на другой.

При постановке реакции преципитации в отличие от реакции агглютинации титр преципитирующих сывороток определяют по наибольшему разведению, антигена, при котором еще наблюдается образование преципитата. Это объясняется тем, что в реакции преципитации участвуют мицеллы (частицы) коллоидного раствора, величина которых во много раз меньше корпускулярных антигенов и которые для образования видимого преципитата требуют в 10 000 раз большего количества антител, чем бактериальные клетки, образующие агглютинат. Избыток антигена препятствует образованию и выпадению преципитата, вызывает задержку реакции преципитации, а иногда даже обуславливает ее отсутствие. Это явление получило название «зоны задержки».

Вопросы для самоконтроля

- 1) Иммуниет. Виды иммуниета.
- 2) Серологические методы.
- 3) Реакция агглютинации.
- 4) Реакция преципитации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1
2. **Карпунина, Л.В.** Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям для студентов специальности “Биоэкология”/ Л.В. Карпунина, Е.С. Мухачева. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова. – 2005. – 100 с.
3. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии. Для студентов специальности 270900 – “Технология мяса и мясопродуктов” / В.Ф. Оркин Л.В. [и др.]. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова, 2005. – 104 с.

4. Методы общей бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 130 с.
5. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 222 с.
6. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие”/ А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.

Дополнительная

1. **Лабинская А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.

Лекция 7

ИММУНИТЕТ И МЕТОДЫ ЕГО ИЗУЧЕНИЯ

(факторы естественной резистентности организма и гуморальные факторы естественной резистентности организма, методы их изучения)

7.1. Факторы естественной резистентности организма. Фагоцитоз

Явление фагоцитоза было открыто и изучено русским ученым И. И. Мечниковым. Он установил, что фагоцитоз (от греч. Phagos - пожирающий, cytos - клетки)—это врожденная реакция организма, проявляющаяся в способности клеток - фагоцитов - захватывать проникающие в тело животного инородные частицы с последующим их перевариванием. Отождествляя собой функцию внутриклеточного пищеварения, свойственную простейшим организмам, фагоцитоз филогенетически является наиболее древним защитным механизмом, общим для всех видов беспозвоночных и позвоночных животных. У человека и высших животных фагоцитарной способностью обладают клетки ретикулоэндотелиальной системы: лейкоциты крови и лимфы, фиксированные купферовские клетки печени, ретикулярные клетки селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, эндотелий кровеносных и лимфатических сосудов, гистициты рыхлой соединительной ткани. В борьбе с патогенными микробами большую роль играют лейкоциты. Судьба микроорганизмов, захваченных лейкоцитами, может иметь три исхода: 1) полное внутриклеточное переваривание микробов, приводящее к их исчезновению в лейкоците- завершённый фагоцитоз; 2) выталкивание микробов из лейкоцитов в окружающую среду; 3) активное размножение микробов внутри лейкоцитов —? незавершённый фагоцитоз. В последнем случае фагоцитоз приобретает отрицательное значение для организма, так как микробы, находящиеся внутри клеток, становятся менее доступными действию антител. Находясь в цитоплазме лейкоцитов, микробы не только остаются живыми, но и сохраняют способность к размножению. Явление незавершённого фагоцитоза имеет место при заболевании туберкулезом, бруцеллезом, туляремией, гонореей. При изучении процесса фагоцитоза было обнаружено, что разные виды микробов имеют различные защитные приспособления, которые повышают устойчивость их в отношении фагоцитов. К числу таких приспособлений относится образование капсул, препятствующих фагоцитозу бактерий чумы, пневмококков и некоторых типов стрептококка; продуцирование микробными клетками токсических веществ, поступающих в окружающую среду и вызывающих повреждение лейкоцитов (например, лейкоцидин, вырабатываемый некоторыми штаммами стафилококков). Установлено, что приобретение специфического активного иммунитета после перенесения инфекционного заболевания или вакцинации сопровождается повышением фагоцитарной активности лейкоцитов в отношении соответствующего возбудителя инфекции. Связано это с наличием в иммунной сыворотке специфических антител — о п с о н и н о в, которые, воздействуя на объект фагоцитоза, изменяют его, делая легкодоступным для поглощения и переваривания фагоцитами.

Для оценки фагоцитарной функции лейкоцитов служат три основных показателя: а) активность фагоцитоза (АФ) - процент активно фагоцитирующих клеток; б) интенсивность фагоцитоза (ИФ) - среднее число микроорганизмов, приходящихся на одну фагоцитировавшую клетку; в) завершенность фагоцитоза (ЗФ) - процент фагоцитов, полностью переваривших фагоцитированные микроорганизмы.

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов. Фагоцитарная активность лейкоцитов выражается процентом активных лейкоцитов (фагоцитов) к общему числу подсчитанных нейтрофильных лейкоцитов. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов осуществляется следующим образом. В стерильную центрифужную пробирку наливают 0,2 мл 2% раствора цитрата натрия, прибавляют 0,1 мл исследуемой крови, взятой из мякоти пальца, и 0,05 мл микробной взвеси, содержащей по оптическому стандарту мутности 25 млн. микробных тел (500 млн. микробных тел в 1 мл). В зависимости от задач и цели исследования для постановки опыта может быть использован любой вид живых или убитых микроорганизмов: кишечная палочка, стафилококк, стрептококк и т. д. Пробирку с приготовленной смесью осторожно встряхивают и помещают на 30 мин в термостат. По истечении указанного срока смесь центрифугируют при 2000 -3000 об/мин до расслоения жидкости на верхний соломенно-желтый прозрачный слой плазмы, нижний - слой эритроцитов и среднюю серебристую пленку между ними - слой лейкоцитов. Пастеровской пипеткой с тонко оттянутым капилляром отсасывают вначале верхний слой, затем очень осторожно снимают средний слой, делают из него 3 -5 мазков (по способу приготовления мазков крови) и окрашивают методом Романовского - Гимза. При микроскопии мазка подсчитывают число фагоцитировавших нейтрофильных лейкоцитов из общего числа подсчитанных лейкоцитов. Для получения достоверных результатов количество должно быть не менее 100. Полученный результат выражают в процентах.

7.2. Гуморальные факторы естественной резистентности организма

7.2.1. Комплемент

Комплемент (от лат. complementum - дополнение) представляет собой сложный комплекс белков сыворотки крови глобулиновой природы, обозначаемый символом С. В состав его входят 9 компонентов: С1, С2, С3, С4, С5, С6, С7, С8 и С9. Все компоненты различны по своему химическому составу, физическим и биологическим свойствам. Активным является весь комплемент в целом, но не отдельные его компоненты. Комплемент находится в крови человека, всех теплокровных и многих холоднокровных животных. Наиболее постоянное и высокое содержание комплемента выявлено в сыворотке крови морских свинок. Поэтому при постановке серологических реакций, основанных на участии комплемента, в качестве его используют смесь сывороток, полученных от 3- 4 морских свинок.

Основные функции комплемента сводятся к тому, что он способствует: 1) лизису sensibilizированных бактерий в присутствии бактериолизин; 2) лизису sensibilizированных эритроцитов; 3) опсонизации (подготовке) бактерий к фагоцитозу.

Сам по себе комплемент оказывает слабое антимикробное действие, но, вступая в контакт и адсорбируясь на поверхности специфических антител, усиливает их действие. В отсутствие комплемента активность некоторых антител полностью утрачивается. Поэтому содержание и уровень комплемента в крови можно использовать как тест, характеризующий состояние естественной резистентности макроорганизма: высокое содержание комплемента в крови считается благоприятным признаком; снижение уровня комплемента, наблюдаемое при некоторых патологических состояниях, является отрицательным прогностическим показателем.

При определении комплемента в сыворотке крови и постановке серологических реакций с участием комплемента необходимо учитывать большую лабильность комплемента в отношении многих физических и химических воздействий. Разрушение его

происходит при механическом встряхивании, под действием тепла, ультрафиолетовых лучей, кислот, щелочей, эфира, алкоголя. Для инактивации комплемента пользуются прогреванием сыворотки при температуре 56°C в течение 30 мин.

Консервирование комплемента. Для продолжительного сохранения биологических свойств комплемента рекомендуются *химические и физические способы* его консервирования. Лучший метод химического консервирования предложили С. И. Гинзбург и В. С. Калинин. Метод заключается в добавлении 0,5 г кристаллического сульфата натрия и 0,4 г х. ч. борной кислоты к 10 мл свежей консервируемой сыворотки. Добавляемые химические вещества предохраняют комплемент от микробного загрязнения и стабилизируют свойства комплемента, благодаря чему активность его сохраняется на протяжении нескольких месяцев. Физический способ консервирования сводится к замораживанию сывороток и хранению их при температуре от - 20° до -40 °С. При таком способе хранения сывороток активность комплемента не утрачивается в течение 1,5- 2 мес. Однако после оттаивания сыворотки необходимо немедленно использовать, так как при повторном замораживании активность комплемента резко снижается.

В настоящее время наибольшее практическое применение для консервирования комплемента нашел *метод лиофильного высушивания*. Сущность его заключается в быстром замораживании консервируемой сыворотки или другого биологического препарата с последующим высушиванием его в условиях глубокого вакуума. При этом вода из высушиваемого материала удаляется путем превращения льда непосредственно в пар, минуя жидкую фазу и не нарушая тем самым молекулярной структуры комплемента. Высушенное вещество имеет вид губчатой массы, которая может сохраняться без изменения в течение многих месяцев и при необходимости быстро и полностью растворяться, восстанавливая присущие исходному состоянию физические, химические и биологические свойства. Сухой комплемент, расфасованный в ампулы, является коммерческим препаратом, выпускаемым советской медицинской промышленностью. Перед употреблением ампулу надламывают и содержимое ее растворяют в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия, что соответствует нативной сыворотке.

7.2.2. Лизоцим

Лизоцим - фермент, широко распространенный в природе, обладающий свойством лизировать живые и мертвые клетки *Micrococcus lysodeikticus* и целый ряд других, в основном грамположительных, микроорганизмов. Присутствие лизоцима установлено у всех представителей животного мира и у значительной части растений. В организме человека лизоцим находится в слезной жидкости, слюне, секрете слизистых оболочек носа, желудочном и дуоденальном соке, грудном молоке, сыворотке крови, экстрактах, полученных из различных тканей и органов. Лизоцимы, выделенные из различных источников, различаются по своей ферментативной активности, химическому составу и физическим свойствам. Биологическое назначение лизоцима в животных и растительных организмах окончательно не установлено. Основываясь на антибактериальных свойствах лизоцима, большинство исследователей склонны рассматривать его как фактор неспецифического иммунитета. Эту точку зрения подтверждает высокое содержание лизоцима в слезной жидкости, секрете слизистых оболочек полости рта и верхних дыхательных путей, т. е. в тех органах, которые являются первым барьером на пути проникновения микроба в организм. По материалам экспериментальных исследований, кроме основного антибактериального действия, лизоцим стимулирует естественную

резистентность живого организма, что играет большую роль в исходе инфекционного процесса.

Наиболее точными способами определения лизоцима в сыворотке крови и других субстратах организма следует считать:

1) Метод турбидиметрического определения лизоцима, основанный на определении уменьшения степени мутности тест-микроба под действием лизоцима в определенный интервал времени. Постановка этого метода связана с использованием спектрофотометра, ФЭК или нефелометра.

2) Метод диффузии в агар, основанный на том, что раствор лизоцима, диффундируя из лунок, лизирует взвешенный в агаре тест-микроб, вследствие чего вокруг лунок с лизоцимом образуются прозрачные зоны, диаметр которых соответствует концентрации находящегося в них лизоцима.

Определение активности лизоцима методом диффузии в агар, отличаясь относительно простой техникой постановки опыта, в то же время, при соблюдении стандартных условий, дает точные, хорошо воспроизводимые результаты, позволяющие рекомендовать его в практику.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Фагоцитоз.
- 2) Определение фагоцитарной активности лейкоцитов.
- 3) Комплемент. Консервирование комплемента.
- 4) Лизоцим. Способы определения лизоцима.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1
2. **Карпунина, Л.В.** Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям для студентов специальности “Биоэкология”/ Л.В. Карпунина, Е.С. Мухачева. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова. – 2005. – 100 с.
3. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии. Для студентов специальности 270900 – “Технология мяса и мясопродуктов” / В.Ф. Оркин Л.В. [и др.]. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова, 2005. – 104 с.
4. Методы общей бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 130 с.
5. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 222 с.
6. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие”/ А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.

Дополнительная

1. **Лабинская А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.

Лекция 8

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1. Иммуноэлектрофорез (ракетный)

Предназначен для определения концентрации Аг в растворе. На пластинку заливается раствор агарозы, содержащий сыворотку. После застывания на одном из краев пластины в геле вырезаются лунки, которые заполняются стандартными растворами Аг. В крайние лунки заливают исследуемый раствор. В ходе электрофореза Аг движется к аноду и реагирует с Ат, находящимся в агарозе. Подвижность Ат ограничивается проведением фореза, при рН 8,6, близком к изоэлектрической точке Ig. В итоге образуются зоны преципитации, напоминающие ракеты. По калибровочной кривой можно определить концентрацию Аг в исследуемом растворе.

8.2. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА, англ. – enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов.

Иммуноферментный метод также основан на учете реакции антиген-антитело, причем в качестве метки, позволяющей обнаружить иммунный комплекс, используют ферменты, например пероксидазу. В основе метода иммуноферментного анализа (ИФА) лежит принцип взаимодействия иммуносорбента – антигена возбудителя инфекции – с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген-антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку.

Иммуноглобулины, применяемые в таких тест-системах, так называемый конъюгат, могут быть получены на основе антивидовых антител (например кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека) или на основе антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов определенного класса (M, G, A).

В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система будет выявлять в исследуемом образце или специфические антитела независимо от их класса, или антитела лишь определенного класса (например, только иммуноглобулин G или только иммуноглобулин M).

Существует несколько методов постановки реакции, однако в настоящее время используется в основном следующая схема.

Вначале на стенках полистироловых пробирок сорбируют антитела против определенного антигена. В эту же пробирку вносят исследуемую сыворотку (или другой биологический субстрат). Если там содержатся искомые антигены, они взаимодействуют с антителами и вместе с ними фиксируются на стенках пробирки. После этого в пробирку вводят антитела к данному антигену, меченные ферментом, которые также присоединяются к образовавшемуся иммунному комплексу и остаются на стенках пробирки. Для обнаружения и количественной оценки этих комплексов в пробирку добавляют перекись водорода (H_2O_2) и хромогены. Фиксированный к стенке пробирки фермент (пероксидаза) разлагает H_2O_2 с выделением кислорода. Последний окисляет хромоген, который приобретает желтый цвет. Интенсивность окрашивания и, соответственно, количество искомого антигена оценивают спектрофотометрически или визуально.

Наиболее распространен твердофазный ИФА, при котором один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе. В качестве

твердого носителя используются микропанели из полистирола. При определении антигенов в лунки с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больных, антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом и смесь растворов субстрата для фермента и хромогена. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена. Твердофазный носитель можно сенсibilизировать не только антигеном, но и антителом. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомым антиген, добавляют иммунную сыворотку против антигена, меченную ферментом, а затем H_2O_2 смесь растворов субстрата для фермента и хромогена. ИФА применяют для диагностики заболеваний, вызванных вирусными и бактериальными возбудителями.

По такому принципу построена основная масса тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

Однако следует отметить, что иммуноферментный анализ может давать и ложные результаты. Ложноположительные могут возникнуть за счет ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счет антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приеме лекарственных препаратов; у новорожденных ложноположительные реакции могут возникать за счет образования в организме ребенка М-антител к иммуноглобулину G матери. Ложноотрицательные результаты реакции обусловлены конкуренцией между иммуноглобулинами М и G, а также техническими ошибками при постановке реакции.

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на:

- лизатные – в которых используется нативный антиген (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);
- рекомбинантные – в которых используются полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определенных белковых антигенов возбудителя;
- пептидные – использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностик в настоящее время — это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным.

Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог любого отдельного антигена.

Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые были бы высокоиммуногенными (т.е. в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам в достаточно большом количестве) и высокоспецифичными (т.е. характерными лишь для данного возбудителя и не дающими перекрестных реакций с антителами другой природы).

Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков. В идеальном случае возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности. На практике этого не всегда удается достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100 %.

Таким образом, за счет несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счет автоматизации учета результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) – в настоящее время этот метод является одним из основных в лабораторной диагностике.

Методика ИФА

Используются специальные 96-луночные (8 рядов по 12 лунок) планшеты из полистирола, с круглыми плоскодонными лунками вместимостью около 300 мкл.

Перед анализом планшету сенсибилизируют, нанося раствор антигена. Обычно это не целая структура возбудителя, а часть (наиболее характерная) белков его оболочки. Очень часто антигены для ИФА получают генно-инженерными технологиями, выращивая на трансгенных *E. coli*.

Растворимые антигены закрепляются на поверхности планшеты рядом специфических взаимодействий непосредственно из раствора. Для снижения помех участки не занятой антигеном поверхности «укрывают» нанесением раствора бычьего сывороточного альбумина. Несвязанный материал удаляют и планшету сушат. Сенсиблизованные планшеты можно хранить при – 18 °С не более 2 недель.

При выполнении анализа лунки заполняют исследуемым материалом (сыворотка крови), нанося его в разные лунки с дробным разбавлением (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 и т.д.), после чего выдерживают около 30 мин для связывания. Если в образцах имеются антитела, комплементарные нанесенному антигену, они образуют с ним прочные комплексы. Содержимое из лунок удаляют трехкратной промывкой буфером и несвязавшийся материал удаляется при промывке.

Далее лунки заполняются раствором конъюгата, представляющего собой связанные глутаровым альдегидом молекулы белка-фермента (чаще всего – пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза) и молекулы антител против антигена к возбудителю, полученные из сыворотки кролика (или другого организма) при введении в его кровь антител человека к искомому возбудителю. Дают время на прохождение реакции комплементарного связывания, после чего избыток раствора конъюгата удаляется и лунки промываются буфером. Молекулы конъюгата осаждаются на молекулах осадившихся на антигене антител из испытуемого образца. В довершение всего лунки заполняют раствором субстрата, превращение которого в окрашенный продукт осуществляется конъюгированным ферментом. Такое ферментативное превращение осуществляется примерно 60 мин, после чего реакция останавливается добавлением кислоты. Количество превращенного субстрата пропорционально концентрации конъюгата и, следовательно, концентрации антител против возбудителя в исследуемом образце. По плотности окраски в УФ-свете можно судить о концентрации антител в исследуемой сыворотке. В «холодных» контрольных лунках параллельно проводят реакцию для установления порога «шумов». Имеются также лунки, заполненные антителами из контрольного раствора для проверки специфичности реакции.

В качестве субстратов для конъюгатов с пероксидазой хрена применяется о-фенилендиамин в смеси с перекисью водорода, дающие после остановки реакции оранжево-коричневые растворы, измеряемые при 492 нм. Субстратом для щелочной фосфатазы является нитрофенилфосфат, превращающийся в *w*-нитрофенол, индицируемый при 405 нм.

ИФА повышает чувствительность анализа благодаря «усилению сигнала» на конъюгированном ферменте. На каждую молекулу исследуемого в сыворотке антитела «садится» по одной молекуле фермента, которая способна катализировать превращение десятков и сотен тысяч молекул субстрата. Однако и чувствительность ИФА имеет ограничения. В первые дни после заболевания число антител в крови может оказаться настолько малым, что ИФА часто дает так называемую «серонегативную реакцию».

Современные методы иммунологии позволяют обнаруживать в биологических средах ничтожно малые количества некоторых органических и неорганических веществ (гормонов, ферментов, витаминов, биологически активных веществ, антител к определенным тканям и органам, лекарств и т.п.), которые не выявляются классическими биохимическими и иммунологическими методами. Наиболее чувствительными являются радиоиммунный и иммуноферментный методы исследования.

8.3. Метод иммунодота с коллоидным золотом

Метод иммунодота один из современных методов в иммунологии, позволяет выявить комплекс Ag с Ат конъюгатом КЗ с протеином А, способным специфически связываться с иммуноглобулинами. Данный метод позволяет выявить минимальные концентрации двух компонентов участвующих в реакции.

1. 1мкл лектина ,
2. фиксация 60° С (15 мин),
3. PBS-АТ (15 мин),
4. подсушить на воздухе,
5. инкубация с Ig (4 часа),
6. три раза отмыть с PBS-Т,
7. инкубация с золотом.

8.4. Иммуноблоттинг (Н. Towbin, 1979)

Western Blotting - перенос белка на НЦ.

Southern Blotting - перенос фрагментов белка НЦ.

Northern Blotting – перенос РНК на диазоцеллюлозу.

Western Blotting – электроблоттинг, электроперенос, метод позволяющий количественно перенести разделенные электрофорезом в ПААГ белковые полосы на мембрану (нитроцеллюлозу) для их дальнейшего анализа ИФМ или иными методами.

Метод предложен Burnett W, N в 1981 г. После проведения ЭФ в нативных и денатурирующих условиях, гель зажатый в специальный держатель вместе с приложенной к нему мембраной, помещают в прибор для электропереноса, где он располагается между двумя плоскими электродами. Под действием электрического поля белковые зоны мигрируют к аноду (случай с SDS-ПААГ) и, встречая на своем пути мембрану (обычно НЦ) адсорбируются на ее поверхности. Адсорбированные белки доступны для различных зондов, чаще всего для которых встречаются антитела.

(+) электрод
прокладка (поролон)
мембрана
гель
прокладка
(-) электрод.

Если ИФА, то далее, инкубируют в растворе соответствующих Ат (предварительно блокируют неспецифические места связывания), затем инкубируют в растворе “вторичного реагента” (это либо антивидовые антитела, например Ig барана против Ig кролика, либо более общий иммунологический реагент –стафилококковый белок А, взаимодействующий с большинством подклассов Ig). Вторичный реагент несет на себе ферментативную (в случае ELISA), или радиоактивную метку, которая позволяет визуализировать взаимодействие Ат с Аг.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Иммуноэлектрофорез.
- 2) Иммуноферментный анализ.
- 3) Схема ИФА.
- 4) Виды тест-систем.
- 5) Методика проведения ИФА.
- 6) Преимущества ИФА.
- 7) Метод иммунодота. Иммуноблоттинг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Димитриев, А.Д.** Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Руководство по микробиологии и иммунологии / Н.М. Колычев и др.; гл. ред. В.Н. Кисленко. – Новосибирск: Арта, 2010. – 256 с., ил. ISBN 978-5-902700-19-7.
3. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие”/ А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.
4. **Филлипович, Ю.Б.** Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

Дополнительная

1. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).
2. Блинов, В.А. Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.– 92 с.
3. **Бреслер, С.Е.** Молекулярная биология / С.Е. Бреслер. – М.: Наука. – 1973. – 580 с.
4. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология / Б.Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 585 с.
5. **Игнатов, В.В.** Методическое пособие по химии белка к большому практикуму по биохимии / В.В. Игнатов, С.К. Ступникова, Л.Н. Яблокова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1969. – 36 с.

6. **Кнорре, Д.Г.** Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
7. **Лабинская, А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 397 с.
8. **Ленинджер, А.** Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 960 с.
9. **Мельников, Г.В.** Методическое пособие к малому практикуму по биохимии / Г.В. Мельников, С.К. Ступникова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1978. – 40 с.
10. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т.Т. Березова. – М.: Медицина, 1976. – 296 с.

Лекция 9

МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК И ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

9.1. Иммобилизация клеток и ферментов

Совершенно новые пути в развитии биотехнологии (БТ) связаны с осуществлением биохимических процессов с иммобилизованными на разных носителях клетками микроорганизмов. Слово иммобилизация от лат. *immobilis*- неподвижный. Надо заметить, что начиная с 60 годов XX в. внимание исследователей было обращено на изучение возможности иммобилизации ферментов (ИФ), а уже впоследствии, через 10 лет появились первые публикации, касающиеся иммобилизации клеток (ИК). Первое промышленное применение ИК для получения аспарагиновой кислоты было осуществлено в 1974 г. в Японии.

ИК в сравнении со свободными клетками и ИФ делают их более экономичными биокатализаторами, во-первых, отсутствуют затраты на выделение и очистку ферментов, во-вторых, снижаются затраты на выделение и очистку продуктов реакции. ИК обладают более высокой активностью и стабильностью, осуществляется возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов. Кроме того, ИК способны к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Для иммобилизации могут быть использованы клетки в различном состоянии: живые и поврежденные в различной степени. Одностадийные реакции могут осуществлять и живые и поврежденные клетки. Полиферментные многостадийные реакции проводят с применением живых клеток, которые длительное время могут регенерировать АТФ и такие коферменты как НАД и НАДФ. Проблема использования ферментативной активности закрепленных клеток не нова. Более 160 лет тому назад быстрый способ получения уксуса был основан на применении микроорганизмов, адсорбированных на древесной стружке.

В настоящее время существуют различные методы иммобилизации микроорганизмов и весьма расширились области их применения.

9.2. Методы иммобилизации клеток микроорганизмов

Методы ИК микроорганизмов можно условно разделить на три типа: химические, физические и механические.

Химический метод основан на образовании ковалентных связей с активированным носителем. Ковалентное привязывание клетки к носителю используется пока не часто. Это объясняется токсичностью используемых реагентов. Тем не менее методы ковалентного связывания, разработанные рядом авторов, позволяют сохранить жизнеспособность клеток, т.к. в этих методах исключен непосредственный контакт с токсичными реагентами. Часто для таких целей используют посредники, например, глицин, аланин, как это было сделано Turkova et al. (1979) для ковалентного привязывания дрожжевых клеток к оксиметакрилатному гелю для проведения различных реакций трансформации, в том числе для клеток с α -галактозидазной и β -оксистероиддегидрогеназной активностями. Присутствие таких посредников освобождало клетку микроорганизма от непосредственного контакта с токсичным реагентом и

тем способствовало сохранению активности. Эти методы довольно трудоемки, но преимущество ковалентного связывания состоит в минимальном взаимодействии клетки и носителя, что обуславливает наибольшую доступность для низкомолекулярных субстратов.

К физическим методам относятся адсорбция и агрегация. В качестве адсорбентов могут быть использованы различные органические и неорганические носители: различные полимеры, стекло, керамика, глина и др. Особое внимание привлекают в последнее время крупнопористые носители (имеющие поверхность более $0,01\text{ м}^2$ / носителя). Такие носители имеют контролируемый размер пор (от 50 до 2500 Å) превышающий размер микроорганизмов в 5-6 раз, а спор грибов в 16 раз. Вследствие этого микроорганизмы адсорбируются не только на наружной, но, гл. образом, на внутренней стороне пор, что в свою очередь приводит к повышению активности единицы носителя. Сравнительные эксперименты с культурами *S. cerevisiae* и *Penicillium chrysogenum*, было показано, что крупнопористые носители адсорбируют больше биомассы, чем активированный силон и непористое бромсиликатное стекло (Пат. Великобритании, 1979). К достоинствам крупнопористых носителей можно отнести то, что на размеры пор не влияет температура, рН, природа растворителя. Материал носителя прочный, действию бактерий не подвергается. Недостаток пористого носителя (стекла), ограничивающий его широкое применение в промышленности – его дороговизна. Пористая керамика мало уступает по своим свойствам пористому стеклу, она дешевле и более устойчива в щелочных средах. На ней также как и на пористом стекле иммобилизованы многие ферменты: глюкооксидаза, аминоацелаза, протеаза, глюкоамилаза, пепсин, трипсин, лактаза, которые нашли применение в пищевой промышленности, в медицине (Япония, 1982). Имеются сведения о прикреплении дрожжевых клеток при сбраживании пивного сусла к керамическим кольцам (Колпакчи и др., 1976). При этом было замечено, что присутствие носителя приводит к увеличению количества клеток в ферментере и биомассы на крупнопористых носителях.

Иммобилизацию клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна иногда относят к механическим методам, хотя чаще всего этот метод основан на химических и физических взаимодействиях. Включение основано на неспецифическом осаждении (коллаген, агар, полистирол, каррагинан), ионном образовании геля (Al и Са-альгинаты), полимеризации (полиакриламид, фоточувствительные полимеры). ИК в гели, мембраны, волокна имеет наибольшее применение как в лабораторной, так и в промышленной практике. Клетки, включенные в ПААГ, Са-альгинатный и каррагинановый гели, могут сохранять свою жизнеспособность и в присутствии питательной среды, размножаться в приповерхностных слоях гелей. Этот прием позволяет в значительной мере стабилизировать ферментативную активность ИК и повысить активность иммобилизованной системы в целом. Например, 3-кетостероиддегидрогеназная активность *Arthrobacter globiformis* в ПААГ после инкубации повышается почти в 6 раз, столь высокий уровень активности снижается для первоначального лишь после 200 последовательных трансформаций гидрокортизона в преднизолон (Кощеенко и др., 1981).

9.3. Применение иммобилизованных клеток

Биокаталитическая активность целых ИК в настоящее время может быть использована в самых различных областях науки и техники. Существуют по меньшей мере три большие области в которых могут найти применение ИК микроорганизмов, а именно: 1) при производстве аминокислот, антибиотиков и др. веществ, 2) производство лекар-

ственных средств и 3) охрана окружающей среды (обработка сточных вод, гидролиз городских, промышленных и с/х стоков, содержащих целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Помимо того, что эти процессы имеют социальное значение, они выгодны с экономической точки зрения, т.к. при этом утилизируется энергия в форме метана.

Наибольшее количество исследований по ИК микроорганизмов проведено японскими исследователями. Особые успехи достигнуты ими в области синтеза аминокислот, различных органических кислот и антибиотиков. Технологически освоено получение аспарагиновой и урокановой кислот, аланина и цитруллина, разработаны промышленно доступные методы получения таких важных для медицины и пищевой промышленности аминокислот как тирозин, триптофан и др. (Япония, 1979, 1980). Метод получения аспарагиновой кислоты, разработанный в МГУ, не менее эффективный, чем предложенный японскими исследователями (1978, 1982). Клетки *E.coli*, включенные в ПААГ, с успехом использованы для непрерывного получения аспарагиновой кислоты, период полужизни катализатора – 110 суток. С целью получения оптически чистых аминокислот ИК применяют для разделения рацематов аминокислот.

Большой интерес представляет полный синтез аминокислот. Живые клетки *Brevibacterium flavum*, введенные в коллаген осуществляли синтез глутаминовой кислоты в непрерывных условиях на колонке в течение 10 дней с незначительным снижением активности (Constantimides et al., 1981). Было осуществлено получение L-изолейцина путем ИК *Serratia marcescens* (Chibata, 1979).

Многие органические кислоты можно получать при биосинтезе или проводя трансформацию с помощью ИК. Лучшие результаты пока получены при проведении микробиологической трансформации и при получении яблочной кислоты. С 1974 г. фирма “Танабэ Сейяко” (Япония) приступила к промышленному выпуску яблочной кислоты с использованием включенных в ПААГ клеток *Brevibacterium ammoniagenes*. В 1978 г. ПААГ был заменен каррагинаном, что позволило в 2,3 раза повысить эффективность ИК, а замена культуры бревибактерий этого штамма более активным штаммом увеличила в 5 раз эффективность биокатализатора по сравнению с исходным. Стало возможным с помощью однократно приготовленных гранул с клетками в непрерывных условиях получать до 100 т яблочной кислоты (Samejima et al., 1980).

Большие успехи были достигнуты в области получения полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов: превращение 7-аминодеацетоксицефалоспориновой кислоты и фенилглицина в цефалексин и пенициллина в 6-АПК освоено в промышленном масштабе (Samejima et al., 1980, Zhang, 1982). Промышленные и пилотные установки с ИК, трансформирующими антибиотики, работают в Японии, СССР, Китае и некоторых др. странах. Биосинтез пенициллина, бацитрацина, кандицидина, эритромицина ИК пока не имеет промышленного значения, но эти исследования являются весьма перспективными.

Одна из первых работ, посвященных ИК, проведенная в 1970 г. касалась процесса гидроксирования стероида кортексолона. В настоящее время все основные энзиматические процессы, используемые в стероидной химии, осуществлены с помощью ИК: 1,2-дегидрирование, 11 α - 11 β –гидроксирование, стереоспецифическое 17 β - восстановление, 20 α – 20 β –восстановление, дезацетилирование, трансформация стероидов и некоторые другие. В ИБФМ АН СССР в 1972 г. были начаты исследования возможности использования живых ИК микроорганизмов для трансформации стероидов и было показано, что сохранение клеток в жизнеспособном состоянии после иммобилизации и в ходе длительных трансформаций обуславливает их высокую активность и стабильность

без применения экзогенных кофакторов. Сравнение 10 различных способов трансформации для клеток *Arthrobacter globiformis* в непрерывных и периодических условиях показало, что лучшими методами являются включение в ПААГ и крупнопористые носители. Период полужизни 3-кетостероиддегидро-геназной активности клеток в ПААГ равен 5 месяцев (1 месяц – 200 трансформаций) при сохранении 95% превращения гидрокортизона в преднизолон. Метод получения преднизолона и ИК считается промышленно доступным (Кощеенко и др., 1981, 1983; Samejima et al., 1980).

Другими не менее важными проблемами, которые решаются с применением ИК, являются процессы изомеризации глюкозы во фруктозу и процессы получения глюкозы из крахмала и крахмалсодержащих продуктов или продуктов переработки целлюлозы. Несмотря на большие успехи в использовании ИФ-глюкоизомеразы, во многих случаях используют ИК с глюкоизомеразной активностью в промышленном масштабе. Это связано, гл. образом, с большой стабильностью ИК и с дороговизной методов ИФ. По данным Чибата (1979) активность клеток в каррагинане, сшитом глутаровым альдегидом, весьма стабильна, период полужизни составляет 289 дней (37 °С).

Включение в ПААГ клетки использовали также для получения рибозы, фруктозы, сорбозы. Из соответствующих спиртов осуществлена трансформация сорбита в сорбозу, сорбозы в сорбозон и далее в 2-кетогулоновую к-ту, легко превращаемую в аскорбиновую к-ту химическим путем. Множество различных реакций осуществляемых с помощью ИК свидетельствуют об эффективности их использования как биокатализаторов пролонгированного действия. Об этом свидетельствуют многочисленные публикации (обзоры). Одно из главных преимуществ ИК – способность функционировать как полиферментная система. Именно эта способность ИК позволила осуществить синтез ряда коферментов и процессы, требующие участия АТФ: синтез НАД, НАДФ, CoA, ЦДФ-холина, глутатиона, пантотеновой к-ты и др. (Кощеенко, 1981; Berger, 1981). Примером удивительной способности микроорганизмов является способность к синтезу этанола из глюкозы в высокой концентрации (Berger, 1981; Samejima, 1980) или из глюкозосодержащих субстратов. Например, клетки растущих в каррагинане дрожжей *S. cerevisiae* способны выдерживать в течение 2 месяцев концентрацию спирта до 25 % при постепенном повышении содержания глюкозы от 10 до 25 % (Wada et al., 1981). Еще относительно недавно казался невероятным синтез белков с помощью ИК, а сейчас уже описан синтез α -амилазы, β -лактамазы, β -инулазы и протеазы (Кощеенко, 1981). Пока это пионерские работы, тем не менее получены обнадеживающие результаты. Так, период полужизни продуцирующей протеазу *Streptomyces fradiae* составляет 30 суток. Работы советских и американских исследователей свидетельствуют о попытке создать стабильно действующую систему с азотфиксирующей активностью. Иммунизация азотфиксирующих микроорганизмов – это еще одно из интереснейших направлений современной биотехнологии, требующих особого рассмотрения.

Ферментативная активность ИК используется в последние годы и при очистке сточных вод. Следует отметить, что активные илы всегда содержали адсорбированные клетки. Применение добавочных стадий при очистке с помощью ИК может дать больший эффект т.к. позволяет направленно обезвредить особенно токсичные соединения, например фенол, бензол, гексаметилендиамин. Возможна деградация и неприродных веществ, таких как циклический димер аминокaproновой к-ты, содержащейся в сточных водах с нейлоновых фабрик. Создана пилотная установка со смесью адсорбированных микроорганизмов, используемых для денитрификации сточных вод (Berger, 1981). Большой экономический эффект получен при извлечении тяжелых металлов из

сточных вод. Такие установки уже действуют в США и Венгрии (Hollo et al., 1980). Показана возможность применения целых клеток *Alcaligenes eutrophus*, иммобилизованных в альгинатный или каррагинановый гели, для очистки сточных вод от трития. 10 г клеток (сырая биомасса) эквивалентны 1 г платинового катализатора. Для очистки сточных вод применяют пилотные установки (30 °С). Они предназначены для очистки сточных вод содержащих высокие концентрации минеральных масел и ПАВ (до 5 г/л) и может быть использована на металлообрабатывающих предприятиях для утилизации отработанных моющих растворов и смазочно-охлаждающих жидкостей (СОЖ). В основе технологии – ассоциации специализированных микроорганизмов–деструкторов, иммобилизованных на волокнистом носителе и помещенных в компактную передвижную установку.

Ферментативная активность ИК используется для обработки не только сточных вод, но и органических отходов. Реакторы с адсорбированными клетками в анаэробных условиях действовали более двух лет. Получаемый при этом газ содержал 90 % метана и менее 5 % CO₂ (Klibanov, 1982).

Переработка больших масс жидкого навоза анаэробным способом приобретает большое значение в современной биотехнологии. Ферментацию проводят на термофильном режиме (55 °С) с использованием активного ила (в качестве закваски). Исследования проводятся в метантенках. Утилизация навоза этим способом позволяет получать биогаз, органо-минеральные удобрения, кормовые белковые добавки. Получаемый биогаз используется в технологии процесса сбраживания, в теплицах для прямого сжигания в дневное время с целью обогащения атмосферы CO₂. Избыточный биогаз сжигается в котельной, из дымовых газов извлекается CO₂ для выращивания микроводорослей, хранения силоса, корнеплодов, овощей, получения жидкой углекислоты и сухого льда.

Приведенные выше данные свидетельствуют о перспективности развития одного из направлений биотехнологии, связанного с изучением и применением ИК микроорганизмов. Развитие этого направления безусловно связано с наличием высокоактивных штаммов-продуцентов, т.е. с достижением микробиологии, биохимии, генетики, органической химии, химии полимеров, методов рДНК. Достигнуты немалые успехи в изучении ИК, ряд процессов внедрен или внедряется в промышленность. Многие процессы ждут своего технологического решения. Будущее во многом будет определяться расшифровкой причин высокой стабильности живых и неживых иммобилизованных клеточных систем и созданием новых живых иммобилизованных катализаторов пролонгированного действия.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Что такое иммобилизация.
- 2) Иммобилизация клеток и ферментов микроорганизмов.
- 3) Методы иммобилизации клеток и ферментов микроорганизмов.
- 4) Применение иммобилизованных клеток и ферментов микроорганизмов в народном хозяйстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Гусев, М.В.** Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
2. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1
3. **Карпунина, Л.В.** Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Общая биология и микробиология». Часть 2. Микробиология / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014. – 62 с.
4. **Лысак, В.В.** Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
5. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие / А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.

Дополнительная

1. **Шлегель, Г.** Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 568 с.

Лекция 10

ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

10.1. Технологии рекомбинантных ДНК. Схема клонирования ДНК

Технология рекомбинантных ДНК (тхрДНК), её также называют молекулярным клонированием или геной инженерией - это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. Никакого единого, универсального набора методик здесь не существует, но чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК (рДНК) проводят по следующей схеме.

А. Из организма, донора нужных генов, экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают её ферментному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонлирующий вектор- встроена ДНК»).

В. Эту конструкцию вводят в клетку -хозяина (реципиент), где она реплицируется и передается потомкам. Этот процесс называется трансформацией.

С. Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рДНК (трансформированные клетки). Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Предпосылками к созданию тхрДНК послужили многие открытия в области молекулярной биологии, энзимологии нуклеиновых кислот и молекулярной генетики бактерий, вирусов и внехромосомных элементов бактерий (плазмид). Конструирование рекомбинантных молекул осуществляется с помощью ряда ферментов. Это прежде всего ферменты рестрикции (рестрицирующие эндонуклеазы, рестриктазы), которые узнают и расщепляют специфические нуклеотидные последовательности в двухцепочечной молекуле ДНК.

10.2. Рестриктазы

В 1953 г. было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. coli*, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В в клетки штамма С), не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на фрагменты ДНК-специфическими ферментами - рестриктазами. К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз. В генетической инженерии наиболее широко используются около 200.

Рестриктазы представляют собой особый класс эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называются *сайтами рестрикции*. Каждая из рестриктаз узнает свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри последовательности сайта рестрикции, либо в непосредственной близости от него. Таким образом, при действии конкретной рестриктазы одна и та же последовательность ДНК будет всегда образовывать одинаковый набор фрагментов. Обозначение рестриктаз складывается из начальных букв латинского названия вида бактерий, из которого был выделен фермент, и дополнительного обозначения, так как из бактерий одного вида может быть выделено несколько различных рестриктаз: *Escherichia coli*— *EcoR I*, *EcoR V*, *Haemophilus Influenzas* - *Hinf I*, *Sreptomycetes albus* - *Sal I*, *Thermus aquaticus*— *Taq I*.

Рестриктазы делятся на несколько типов по характеру расщепления нуклеотидной последовательности. Рестриктазы I типа узнают сайт рестрикции, но расщепляют последовательность ДНК на произвольном расстоянии (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) от сайта узнавания. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач. Рестриктазы III типа похожи на рестриктазы I типа, они гидролизуют ДНК на расстоянии 20-35 н. п. от сайтов узнавания и также довольно редко используются практических целей.

Ферменты, используемые для получения рекомбинантных молекул, - рестриктазы II типа. Основной характеристикой таких рестриктаз является то, что у них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа узнает определенную последовательность на ДНК и гидролизует ее внутри последовательности сайта рестрикции. Сайты рестрикции рестриктаз II типа представлены симметричными при повороте на 180° последовательностями — *палиндромами*:

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5' сайт рестрикции рестриктазы *EcoR I*

5' TAGA 3'

3' ATCT 5' сайт рестрикции рестриктазы *Taq I*

Рестриктазы II типа делятся на несколько классов в зависимости от размера сайта рестрикции и длины получаемых фрагментов ДНК:

1) мелкощепящие - сайт рестрикции которых представлен четырьмя нуклеотидными парами;

2) среднещепящие - сайт рестрикции - 6- 8 н. п.;

3) крупнощепящие - сайт рестрикции-10-14 н. п.

Рестриктазы II типа можно отнести к двум группам по тому, как они расщепляют последовательность ДНК. Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности, а другие - со сдвигом, с образованием «ступеньки». В первом случае образуются так называемые «тупые» концы, а во втором - «липкие», т. е. фрагменты имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки.

Образование при расщеплении рестриктазами фрагментов с «липкими» концами:

5' G[^]AATTC 3' 5' C i CGG 3'

EcoR I 3' CTTAA G 5' *HpaII* 3' GGC T C 5'

Образование при расщеплении рестриктазами фрагментов с «тупыми» концами:

TA[^]GA 3' 5' GTTAAAC 3'

Taq I 3' AT t CT 5' *Hinc I* 3' CAA TTG 5'

Фрагменты ДНК, имеющие одинаковые «липкие» концы, могут соединяться друг с другом с помощью ДНК-лигазы, при этом сайт рестрикции восстанавливается. Фрагменты, имеющие «тупые» концы, могут быть соединены вне зависимости от того, какой рестриктазой они были образованы. Фрагменты с «липкими» концами более удобны для создания рекомбинантных ДНК, так как ДНК-лигаза обеспечивает беспрепятственное соединение фрагментов.

Ферментативная активность рестриктаз измеряется в *единицах активности*. Это такое количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза за один час 1 мкг ДНК фага λ, при оптимальных условиях. Оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы

являются индивидуальными и зависят от pH, ионной силы, присутствия определенных ионов, температуры проведения реакции. Рестриктазы являются основными ферментами, используемыми в генетической инженерии.

10.3. Плазмидные векторы

Клетки бактерий содержат хромосомную ДНК. Однако помимо хромосом бактерии содержат большое число небольших (1-25 т. н. п.) кольцевых молекул ДНК. Такие кольцевые молекулы называют *плазмидами*. Некоторые плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам, представленные большим числом копий. Высокая копийность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, биохимически нейтрализующих антибиотики, что и обеспечивает устойчивость бактериальной клетки к последним. Бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды только одного типа. Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки, так и плазмиды. Некоторые плазмиды могут размножаться до тех пор, пока их число не достигнет 10-200 копий на клетку. Другие типы плазмид реплицируются с той же скоростью, что и бактериальная хромосома. Такие плазмиды содержатся в клетке в количестве одной или нескольких копий. Естественно, для целей клонирования используют векторы на основе плазмид первого типа.

Впервые плазида в качестве вектора была использована в 1973 г. в лаборатории П. Берга. Эксперименты проводились с небольшой (~ 9 т. н. п.) плазмидой *E. coli* pSC101, несущей ген устойчивости к антибиотику тетрациклину. Она содержала только один сайт рестрикции для EcoR I.

Под действием рестриктазы кольцевая плазида превращалась в линейную молекулу с «липкими» концами. Такую ДНК плазмиды pSC 101 смешивали с EcoRI-фрагментом чужеродной для кишечной палочки ДНК (ДНК золотистого стафилококка). С помощью ДНК-лигазы фрагмент чужеродной ДНК и плазмиды pSC101 соединяли в единую рекомбинатную молекулу. Затем такую рекомбинантную плазмиду добавляли к компетентным клеткам *E. coli*, плазида входила внутрь бактериальной клетки. Клетки с рекомбинантной плазмидой отбирались на селективной среде с тетрациклином. Этот исторический опыт положил начало генетической инженерии. Стало ясно, что можно будет проводить дальнейшие эксперименты с встраиванием различных фрагментов чужеродных про- и эукариотических ДНК и получать клетки с новыми свойствами.

В настоящее время на основе природных векторов сконструированы более удобные в использовании векторы. Наибольшее распространение приобрели векторы типа pUC и их производные (pBluescript, pGEM), которые используются как для клонирования, так и для экспрессии. Векторы pUC небольшие (~ 2,7 т. н. п.), мультикопийные плазмиды, содержат последовательность точки начала репликации (*ori*-сайт), что позволяет им независимо реплицироваться в бактериальной клетке. Для облегчения клонирования в векторе pUC имеется искусственно синтезированная последовательность *полилинкера*, представляющая собой уникальные сайты рестрикции для наиболее часто использующихся рестриктаз. Полилинкер встроен в ген *lacZ*, который является удобным маркером на присутствие в векторе чужеродной ДНК. Ген *lacZ* кодирует белок β -галактозидазу, способный расщеплять субстрат X-gal (производное β -галактозида). При этом цвет бактериальных клеток меняется с белого на ярко-голубой. Небольшая

последовательность полилинкра(100-120 н. п.) не влияет на синтез белка β-галактозидазы. При клонировании фрагмент чужеродной ДНК встраивается в полилинкер рUC-вектора, что нарушает экспрессию гена lacZ, клетки, содержащие вектор со вставкой ДНК, не будут расщеплять субстрат X-gal, и колонии таких бактериальных клеток останутся белыми, в отличие от голубых колоний клеток, несущих пустую векторную плазмиду без вставки. Наличие такой бело-голубой селекции рUC-векторов и их производных значительно облегчает процесс клонирования, так как встраивание чужеродной ДНК в векторную плазмиду Довольно редкое событие - только одна из 10—30 полученных после лигирования молекул будет рекомбинантной, т. е. нести в своем составе чужеродный фрагмент, и использование бело-голубой селекции позволяет определить только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную ДНК.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Технология рекомбинантных ДНК.
- 2) Схема клонирования ДНК.
- 3) Рестрицирующие эндонуклеазы.
- 4) Плазмидные векторы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Великов, В.А.** Практикум по молекулярной биологии. Методы биоинженерии: Учебное пособие для студентов биологического факультета, обучающихся по специальности 011600 “Биология” / В.А. Великов, П.Е. Кузнецов. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 2006. – 80 с. – ISBN 5-292-03591-2
2. **Великов, В.А.** Практикум по молекулярной биологии. Методы исследования белков: Учебное пособие для студентов биологического факультета, обучающихся по специальности 020201 “Биология” / В.А. Великов, В.В. Игнатов. – Саратов: Изд. центр “Наука”, 2007. – 60 с. – ISBN 978-5-91272-319-3
3. **Димитриев, А.Д.** Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. **Филлипович, Ю.Б.** Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

Дополнительная

1. **Бреслер, С.Е.** Молекулярная биология / С.Е. Бреслер. – М.: Наука. – 1973. – 580 с.
2. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология / Б.Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 585 с.
3. **Кнорре, Д.Г.** Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7

4. **Ленинджер, А.** Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 960 с.
5. **Шлегель, Г.** Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 568 с.

Лекция 11 АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ. (рН-метрия и ионометрия)

11.1. рН-среды и буферные растворы

Одной из важнейших задач при получении продуктов с использованием микроорганизмов является создание условий их культивирования.

Организмы и клетки, как правило, весьма устойчивы даже к значительным изменениям рН окружающей среды. Внутриклеточные процессы, наоборот, обладают высокой чувствительностью к рН и протекают в среде, рН которой строго регулируется (правда, некоторые колебания рН могут наблюдаться и внутри клетки, например у поверхности мембраны). Большинство внутриклеточных процессов протекает при нейтральных значениях рН, когда их скорость максимальна. Гидролазы лизосом, однако, обладают максимальной активностью при рН 5,0.

В биологических системах постоянная величина рН поддерживается с помощью эффективных буферных систем, которые по своей химической природе таковы, что они препятствуют изменениям рН, возникающим в ходе метаболического образования кислот (например, молочной кислоты) и оснований (например, аммиака). Большинство буферных систем, содержащихся в клеточных жидкостях, включают фосфаты, бикарбонат, аминокислоты и белки.

Чувствительность биологических процессов к рН обусловлена целым рядом причин. Ионы водорода могут выступать в качестве катализатора ряда процессов. В некоторых белках небольшое изменение рН окружающей среды вызывает проявление биологической активности. На примере гемоглобина, основной функцией которого является перенос кислорода от легких к тканям, можно видеть, что при активном тканевом дыхании незначительное понижение рН в тканях в результате образования углекислоты и ионов водорода облегчает высвобождение кислорода. Процесс высвобождения кислорода сопровождается связыванием протонов гемоглобином, что увеличивает буферную емкость системы.

При изучении метаболических процессов *in vitro* возникает необходимость в применении «нефизиологических» буферных растворов: направленное изменение рН может значительно облегчить изучение таких типов молекул, как аминокислоты, белки и нуклеиновые кислоты с помощью электрофореза и ионообменной хроматографии.

11.2. Влияние рН на биологические процессы

Буферным называется такой раствор, который препятствует изменению концентрации ионов водорода при добавлении к нему кислоты или щелочи. Такие действие раствора называется *буферным*. Величину буферного действия характеризуют буферной емкостью.

Обычно пользуются буферными растворами, состоящими из смеси слабой кислоты или основания и соли этой кислоты, например смеси уксусной кислоты и ацетата натрия. Буферная емкость раствора, составленного из данной кислоты и сопряженного с ней основания, максимальна в том случае, когда их концентрации равны, т. е. $pH = pK_a$ кислоты. Буферная емкость зависит также от общей концентрации раствора и отношения соль-кислота: чем выше концентрация раствора, тем больше его буферная емкость.

Концентрация кислоты и соли в буферных растворах обычно бывает порядка 0,05—0,20 М, а достаточной буферной емкостью растворы обладают в области значений $pH = pK_{a} \pm 1$.

Буферы, применяемые для биологических исследований, должны удовлетворять ряду требований:

1. Обладать достаточной буферной емкостью в требуемом диапазоне значений pH.
2. Обладать высокой степенью чистоты.
3. Хорошо растворяться в воде и не проникать через биологические мембраны.
4. Обладать устойчивостью к действию ферментов и гидролизу.
6. Не оказывать токсического или ингибирующего действия.
7. Комплексы буфера с катионами должны быть растворимыми.
8. Не поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой областях спектра.

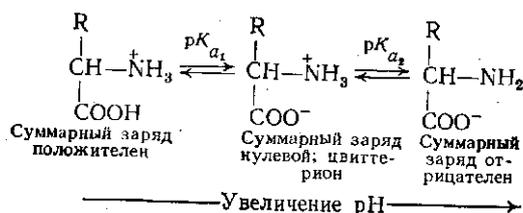
К сожалению, этим требованиям удовлетворяют далеко не все буферные растворы. Так, фосфаты обладают способностью осаждать поливалентные катионы и во многих системах выступают в качестве метаболитов или ингибиторов; трис-буфер иногда оказывает токсическое или ингибирующее действие. До недавнего времени насчитывалось всего несколько буферов, pH которых лежит в важной для биохимии области 6,0...8,0 и которые удовлетворяют перечисленным выше требованиям.

Наиболее важной группой физиологических буферов являются белки. Благодаря большому количеству содержащихся в боковых *цепях* аминокислот щелочных и слабокислых *групп* белки имеют очень высокую буферную емкость. Буферная емкость крови в основном определяется гемоглобином.

11.3. Ионометрия

Аминокислоты и белки – это наиболее важные в биологическом отношении соединения, поэтому необходимо знать, в какой степени изменение pH влияет на их физические свойства.

Степень ионизации аминокислот в водных растворах зависит от pH и определяется уравнением Гендерсона-Хассельбальха.



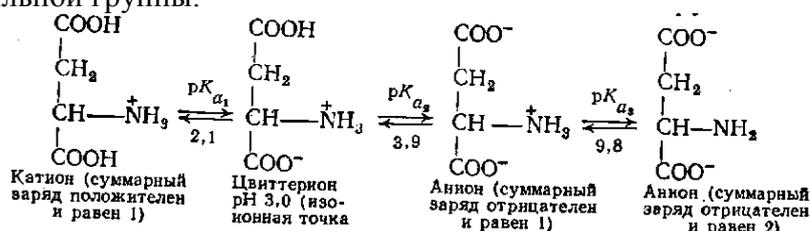
Таким образом, при низких значениях pH аминокислота находится в катионной форме, а при высоких – в анионной. При некотором промежуточном значении pH аминокислота оказывается незаряженной и называется *цвиттерионом*. Было установлено, что в кристаллическом состоянии или после растворения в чистой воде такие аминокислоты существуют главным образом в виде цвитт-терионов, что придает им свойства ионных соединений, а именно высокую точку плавления и кипения, хорошую растворимость в воде и плохую растворимость в таких органических растворителях, как эфир и хлороформ. Величина pH, при которой в водном растворе преобладает цвитт-терион, называется *изоионной точкой*: число отрицательных зарядов, образующихся на молекуле в результате отщепления протонов, равно числу положительных зарядов, образующихся благодаря присоединению протонов. Для аминокислот эта величина приблизительно соответствует *изоэлектрической точке* (pI) – молекула не несет суммарного заряда и таким образом оказывается электрофоретически неподвижной. Численное зна-

чение pH для этого случая зависит от того, насколько сильной является кислота, и определяется следующим уравнением:

$$pH = pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

Для глицина величины pK_{a1} и pK_{a2} равны 2,3 и 9,6 соответственно; следовательно, изоионная точка равна 6,0. При более низких значениях pH в растворе содержатся и цвиттерион, и катион, а соотношение между ними определяется уравнением Гендерсона - Хассельбальха; при более высоких pH наряду с цвиттерионом в растворе находится анион.

Для так называемых «кислых» аминокислот, например, аспарагиновой кислоты, ионизация носит несколько иной характер. Это обусловлено наличием у них второй карбоксильной группы.



В этом случае pH, при котором в водном растворе преобладает цвиттерион, определяется величинами pK_{a1} и pK_{a3} .

Для лизина который является «основной» аминокислотой изоионная точка определяется величинами pK_{a2} и pK_{a3} . Ионизация происходит следующим образом:



Вместо второй amino- или карбоксильной группы боковая цепь аминокислоты иногда содержит другую химическую группу, которая при определенном значении pH также ионизируется. К таким группам относятся фенольная (тирозин), гуанидиновая (аргинин), имидазольная (гистидин) и сульфгидрильная группа (цистеин). Ясно, что степень ионизации различных основных групп аминокислот при одном и том же pH будет различной. Более того, небольшие различия могут наблюдаться даже у одной и той же группы. Эти различия используют при электрофоретическом и ионообменном разделении смесей аминокислот, имеющих, например, в белковом гидролизате.

Ионизация молекул белка качественно напоминает ионизацию аминокислот, но в количественном отношении отличается от нее благодаря наличию большого числа способных к ионизации групп.

В отличие от аминокислот у белков изоионная точка обычно не совпадает с изоэлектрической. По определению изоионная точка – это такая величина pH, при которой молекула белка содержит равное число положительно и отрицательно заряженных групп, 1 образовавшихся в результате связывания основных групп с протонами и соответствующей диссоциации кислотных групп. Изоэлектрическая точка – это pH, при ко-

тором белок электрофоретически неподвижен. При ее определении белок растворяют в буферном растворе. В этом растворе всегда содержатся низкомолекулярные анионы и катионы, способные связываться с многочисленными заряженными группами белка. В таких условиях наблюдаемое в изоэлектрической точке равновесие зарядов частично обусловлено их компенсацией связавшимися с молекулой белка анионами и катионами.

Молекулы белка всегда изучают в буферных растворах; при этом важно установить изоэлектрическую точку, поскольку, например, именно при этом значении рН создаются наиболее благоприятные условия для взаимодействия между противоположно заряженными группами соседних молекул, что ведет к их последующей агрегации и быстрому осаждению.

Агрегацию, а следовательно, и осаждение белковых молекул можно вызвать добавлением к раствору белка солей, например сульфата аммония. Молекулы белка и неорганические ионы при гидратации конкурируют за молекулы воды, и по достижении определенной концентрации соли взаимодействия белок – белок начинают преобладать над взаимодействиями белок – вода, что приводит к агрегации, а затем и осаждению белка. Этот метод широко применяется на начальных стадиях очистки белков. Различия в изоэлектрической точке разных белковых молекул используются при разделении белков с помощью электрофореза.

Вопросы для самоконтроля

- 1) рН-среды и буферные растворы.
- 2) Влияние рН на биологические процессы.
- 3) Ионметрия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Васильев, В.П.** Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа / В.П. Васильев – М.: Дрофа, 2003. – 384 с. ISBN 5-71.

Дополнительная

1. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).

2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.- 92 с.

Лекция 12

СЛОЖНОЕ АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

12.1. Основные принципы: излучение, энергия и структура атомов

Спектроскопия на протяжении вот уже нескольких десятков лет используется химиками для структурных исследований и изучения химических превращений. Главное преимущество спектральных методов состоит в том, что вещество в процессе исследования не разрушается. Кроме того, методику исследований легко модифицировать и автоматизировать. Такие свойства спектроскопических методов делают их незаменимыми при исследовании биологических объектов.

Спектроскопические методы позволяют обнаруживать незначительные количества вещества даже в довольно сложных системах. Так, например, удается измерять количество восстановленных и окисленных дыхательных пигментов в целых митохондриях.

Свет, тепло и другие виды *электромагнитного излучения* представляют собой электромагнитные волны, распространяющиеся со скоростью $3 \cdot 10^8$ м•с⁻¹. Для понимания механизмов, лежащих в основе спектральных свойств молекул, воспользуемся представлением о квантовой природе электромагнитного излучения. Согласно квантовой механике, свет представляет собой поток частиц, называемых *квантами* или *фотонами*. Энергия каждого кванта определяется длиной волны излучения.

В *основном энергетическом состоянии* электроны в атоме занимают самые нижние энергетические уровни, располагаясь на них в соответствии с законами квантовой механики.

12.2. Типы спектров и их применение в биологии

Спектр представляет собой зависимость количества поглощенной или излученной системой энергии от длины волны или другого параметра, например волнового числа.

Молекулы взаимодействуют с излучением в широком диапазоне длин волн, поэтому их спектры лежат в разных областях. Для измерений в каждом спектральном диапазоне используется специальное оборудование. Одни типы спектров получить довольно легко, и соответствующие методы широко используются биохимиками в повседневной работе. Однако есть область спектроскопии, где применяется довольно сложное оборудование. Соответствующие методы используются лишь для детального исследования биологических макромолекул и других субклеточных структур.

Электронные спектры обусловлены переходом электронов наружных оболочек атомов с одного энергетического уровня на другой, и спектры занимают *видимую* и *ультрафиолетовую* области.

Обычно электронные переходы сопровождаются изменениями в колебательных и вращательных энергетических уровнях. Эта область спектроскопии широко применяется в биохимии. При переходе электронов в основное состояние происходит испускание света – флуоресценция.

Колебательно-вращательные спектры обусловлены изменением энергии колебательных подуровней. Такие переходы, как правило, происходят в *ближней инфракрасной области* и сопровождаются изменениями вращательных энергетических по-

дуровней. Этот вид спектроскопии обычно используется для изучения структуры биологических макромолекул в неводных средах.

Вращательные спектры располагаются в *далекой инфракрасной* и *микроволновой областях* и в биохимии используются редко.

Рамановские спектры (спектры комбинационного рассеяния света) обусловлены изменением колебательных и вращательных подуровней одновременно. Такие переходы происходят в близкой инфракрасной области, и рамановская спектроскопия дополняет информацию, полученную с помощью вращательных и колебательно-вращательных, спектров. В биохимии рамановская спектроскопия применяется редко.

Спектры электронного парамагнитного резонанса и ядерного магнитного резонанса обусловлены изменением направления спинов соответственно электронов и ядер в магнитном поле. Эти методы являются мощным инструментом при изучении структуры биологических макромолекул.

12.3. Основные законы поглощения света

При прохождении света через равномерно поглощающую среду его интенсивность I_0 уменьшается до величины I . Отношение интенсивностей прошедшего и падающего света I/I_0 называется *пропусканием T*. *Поглощение A* или *экстинкция E* – это величина, равная $\lg I/T = \lg I/I_0$. Некорректный термин «оптическая плотность» применять не следует.

Согласно закону *Ламберта-Бэра*, экстинкция пропорциональна концентрации поглощающего вещества и толщине образца, т. е.

$$E = \epsilon cd,$$

где ϵ – *коэффициент молярной экстинкции* поглощающего вещества при длине волны λ , c – молярная концентрация раствора, d – оптический путь, или толщина образца в см.

Пропускание обычно измеряется в процентах и меняется от 0 до 100%. Экстинкция – величина безразмерная и изменяется от 0 до ∞ .

Закон Ламберта-Бэра применим не для всех систем. Во-первых, при поглощении света образец может ионизоваться, а при высоких концентрациях – полимеризоваться. Иногда образец при облучении коагулирует, образуя мутную суспензию. Эти эффекты увеличивают или уменьшают экстинкцию.

Иногда используемый прибор чувствителен к рассеянному свету или же испускает свет в ограниченном диапазоне длин волн.

12.4. Спектрофотометрия в видимой и УФ-областях

Спектр поглощения, или, более корректно, *абсолютный спектр поглощения* вещества представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Такие спектры для красителей в видимой области (400...700 нм) имеют иногда несколько максимумов. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200...400 нм) и видимой областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле.

Для получения спектра поглощения необходимо измерить экстинкцию при различных длинах волн. Поглощение в видимой и ультрафиолетовой областях можно регистрировать глазом в первом случае или фотографированием в обоих случаях. Такие приборы называются соответственно *спектроскопами* и *спектрографами*. В *спектрофотометре* индикатором служит фотоэлемент, ток в котором пропорционален интенсив-

ности падающего на него света. На рис. 5.3,а приведена оптическая схема простого спектрофотометра, работающего в видимой области.

В современных приборах линзы, как правило, заменяют зеркалами. Преимущество зеркал перед линзами заключается в их дешевизне и меньшей потере света из-за хроматической аберрации. В качестве источников света в видимой области применяются лампы накаливания, а в ультрафиолетовой — водородные или дейтериевые лампы.

Монохроматоры. Монохроматор – это оптическая система, выделяющая из всего спектра источника света излучение определенной длины волны. Это обычно призмы, по-разному преломляющие свет разных длин волн, или дифракционные решетки. В видимой области используются обычные стеклянные призмы, но в ультрафиолетовой области они не годятся, поскольку стекло начинает поглощать уже при $\lambda < 400$ нм, поэтому призмы делают из кварца. На самом деле к образцу от монохроматора поступает не монохроматическое излучение, а свет в некотором диапазоне длин волн, называемом **спектральной шириной щели**. Ширина щели – важный параметр, поскольку она определяет тот диапазон длин волн, при которых на самом деле проводятся измерения. При анализе спектров используется понятие **ширина полосы** ($\Delta\lambda$) – диапазон длин волн, в котором интенсивность прошедшего света больше половины интенсивности при длине волны максимума пика. Эта величина зависит как от **ширины щели** S , так и от **обратной линейной дисперсии** материала призмы ($d\lambda/dS$). Величина $d\lambda/dS$, как видно из табл. 5.2, зависит от длины волны. Данные таблицы хорошо иллюстрируют также, насколько лучше в видимой области применять стеклянные призмы, чем кварцевые.

В качестве монохроматоров применяются также дифракционные решетки, которые представляют собой плоскопараллельную пластину с нанесенными на ней параллельными линиями – бороздками. Белый свет из-за дифракции на параллельных бороздках разлагается в непрерывный спектр. Обычно в монохроматорах сначала выделяют пучок света с определенным диапазоном длин волн с помощью призмы, а затем разлагают его еще раз решеткой. Так получают строго монохроматический свет. Основное достоинство дифракционных решеток в том, что можно увеличивать их разрешающую способность, поскольку она прямо пропорциональна плотности линий. Кроме того, во всем диапазоне длин волн дифракционные решетки имеют линейное разрешение, тогда как разрешение призматического монохроматора с увеличением длины волны уменьшается.

Кюветы. Исследуемое вещество растворяют в соответствующем растворе и помещают в оптически прозрачный сосуд для измерений – **кювету**. Обычно кюветодержатель имеет ячейки для четырех кювет. Если нет какого-нибудь известного стандартного вещества, для количественных измерений необходимо точно определить размеры кюветы. Для определения поглощения только исследуемого вещества используется кювета сравнения, идентичная кювете с образцом; в нее наливают только растворитель. Перед проведением измерений кюветы сравнивают. Поскольку стекло поглощает ультрафиолетовый свет, для проведения измерений в этой области спектра используют кварцевые кюветы. Для работы с летучими или химически активными веществами кюветы закрывают пробками.

Поскольку кювета, помещенная в спектрофотометр, становится составной частью его оптической системы, с ней нужно обращаться очень аккуратно. Царапины и грязь на стенках кюветы сильно рассеивают и поглощают свет, искажая результаты измерений. Об этом особенно надо помнить при работе в ультрафиолетовой области. Поскольку органические молекулы поглощают в ультрафиолетовой области, ни в коем случае нельзя касаться руками оптических стенок кюветы и вообще стараться по воз-

возможности меньше брать кюветы в руки. Раствор лучше заливать в кюветы, поставив их в предварительно вынутый из прибора кюветодержатель. Манипулируя с пипеткой, надо помнить, что кюветы довольно хрупки, особенно кварцевые, поэтому заполнять их нужно, не касаясь стенок пипеткой.

Содержимое кюветы должно быть гомогенным – это необходимое условие получения воспроизводимых данных. Нужно следить за тем, чтобы раствор не был мутным. Особенно мешают измерениям пузырьки воздуха, сильно увеличивающие рассеяние. Нельзя наливать в кювету очень холодный раствор, поскольку при этом на наружных стенках кюветы конденсируются пары воды воздуха, и стенки становятся непрозрачными.

Если кюветы загрязнены посторонними примесями их следует промыть дистиллированной водой и (или) растворителем, в котором растворено исследуемое вещество. Кюветы можно мыть мягкими серными детергентами, но стараться не пользоваться горячими концентрированными кислотами или щелочами, а также другими травящими агентами.

Как правило, для работы применяют кюветы с оптическим путем 1 см, заливая в них 2,5–3 см³ раствора. В такие кюветы входит 4...5 см³, но заполняют их полностью лишь в том случае, когда-то необходимо. Есть кюветы с оптическим путем 100, 20, 5, 2 и 1 мм. В последние – микрокюветы – входит мало вещества, 0,3...0,5 см³, и, конечно, в том случае, когда объем ограничен, эти кюветы очень удобны, например при работе с НАД·Н.

Чтобы спектрофотометр работал хорошо, стабильно и долго, его следует держать в чистой комнате, при постоянной влажности и температуре. Для работы при разных температурах используют специальные термостатированные кюветодержатели. При помощи спектрофотометров можно анализировать соединения после хроматографического разделения их на колонках. Для непрерывного анализа вытекающего из колонок раствора имеются специальные проточные кюветы. В последнем случае результаты измерений целесообразно непрерывно записывать на самописце регистрирующего спектрофотометра.

Фотоэлементы. Фотоэлементы преобразовывают световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется.

Обычные фотоэлементы наиболее чувствительны к свету с длиной волны $\lambda \sim 400$ нм и мало чувствительны к свету с длинами волн $\lambda > 550$ нм. Поэтому для работы в этой области необходимы специальные фотоэлементы, обладающие достаточной чувствительностью в данном спектральном диапазоне. Теоретическая точность таких фотоэлементов $1 \pm 0,003$ единиц поглощения, т. е. 0,3%.

Регистрирующие спектрофотометры. Такие приборы могут регистрировать как изменение поглощения вещества в зависимости от длины волны, так и изменение поглощения во времени при постоянной длине волны. Конечно, регистрирующие приборы очень удобны в работе, но надо помнить, что часто такие спектрофотометры имеют меньшую чувствительность, чем более дешевые однолучевые приборы, поскольку в них из-за автоматической регулировки щели возникают дополнительные шумы. Основная разница между одно- и двухлучевыми приборами состоит в том, что в последних исходный луч при помощи системы плоских зеркал направляется то в кювету сравнения, то в кювету с образцом. Разница в этих прошедших световых потоках, улавливаемых фотоумножителем, соответствует значению поглощения вещества. В хороших спектрофотометрах бумага самописца может двигаться с разной скоростью, поэтому

спектры можно растягивать по длинам волн. Изменение чувствительности самописца позволяет усиливать или ослаблять сигнал, поступающий от спектрофотометра, так что на всю его шкалу можно уместить значения экстинкции 0...0,1, 0...1, 1...2 или 2...2,1.

Есть спектрофотометры с автоматической сменой ячеек; на них можно последовательно измерять поглощение нескольких образцов через заданные промежутки времени.

Более сложные спектрофотометры. Иногда бывает необходимо исследовать соединения, поглощающие при длинах волн $\lambda < 200$ нм. В этой области начинает поглощать кислород воздуха, поэтому для измерений в *вакуумном ультрафиолете* из системы нужно откачать воздух. Кварц начинает поглощать ниже 190 нм, но эту трудность можно обойти, изготовив оптические детали из фтористого лития, который прозрачен до 110 нм.

Спектрофотометры, учитывающие отражение, – это приборы, улавливающие свет, рассеянный образцом во все стороны. Такие измерения проводят тогда, когда образец сильно рассеивает в области поглощения (например, суспензия бактерий). В этом случае поглощение находят после измерения всего рассеянного и прошедшего света, и истинное значение оптического пути неизвестно. Этот факт сильно усложняет обработку экспериментальных данных. В качестве сравнения применяется рассеивающая поверхность из окиси магния.

Многочувствительный регистрирующий спектрофотометр регистрирует изменение экстинкции одновременно при двух выбранных длинах волн.

Спектрофотометры для измерения поглощения микроскопических объектов имеют очень узкий монохроматический луч и используются в сочетании с микроскопом. На таком приборе можно, например, измерять экстинкцию различных областей клетки.

Качественный анализ. Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях применяются для идентификации соединений как в чистом виде, так и в составе биологических препаратов. Эта методика используется для определения химической структуры соединения и его превращения, однако для более точного анализа необходимы исследования поглощения в инфракрасной области.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Основные принципы: излучение, энергия и структура атомов.
- 2) Типы спектров и их применение в биологии.
- 3) Основные законы поглощения света.
- 4) Спектрофотометрия в видимой и УФ-областях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

2. **Жебентяев, А.И.** Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа / А.И. Жебентяев – М.: Инфра-М: Минск: Нов. знание, 2013. – 206 с. ISBN 978-5-16-006615-8.
3. **Инженерные основы биотехнологии: Учеб. пособие : учебное пособие / ред. : Д. Г. Победимский.** – М.: МГАТХТ, 2005. – 379 с.

4. Машины и аппараты пищевых производств: Кн. 1 / ред. В. А. Панфилов. – М.: КолосС, 2009. – 610 с. - ISBN 978-5-9532-0509-2

5. **Мудрецова-Висс, К.А.** Микробиология, санитария и гигиена / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина. – М.: ИД ФОРУМ: Инфра-М, 2010. – 400 с. ISBN 978-5-8199-0350-6.

Дополнительная

1. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).

2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.- 92 с.

3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 2. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004.- 86 с.

4. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 196 с. ISBN 5-7633-0783-7.

5. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Методические указания к лабораторным работам / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «РИК «Полиграфия Поволжья», 2004. – 84 с.

Лекция 13

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

13.1. История метода

К числу наиболее чувствительных и высокоспецифичных иммунологических методов обнаружения антигенов относится метод полимеразной цепной реакции, который позволяет обнаруживать в исследуемом материале присутствие нескольких молекул искомого антигена или единичных возбудителей.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Помимо простого увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется амплификацией) ПЦР позволяет осуществлять множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

История. В начале 1970-х гг. норвежскому ученому Къеллу Клеппе (Kjell Kleppe) из лаборатории нобелевского лауреата Хара Гобинды Хораны (Har Gobind Khorana) пришла в голову мысль, что можно амплифицировать ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК – синтетических праймеров. Однако в то время эта идея осталась не востребованной. Полимеразная цепная реакция была вновь открыта в 1983 г. Кери Маллисом (Kary Mullis). Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Через 7 лет после опубликования этой идеи, в 1993 г., Маллие получил за нее Нобелевскую премию.

Вначале при использовании метода после каждого цикла нагревания-охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента. В 1986 г. она была существенно улучшена. Было предложено использовать ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа Taq-полимеразой. Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность внесения ошибочного нуклеотида у нее достаточно высока, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5' экзонуклеазная активность). Полимеразы Pfu и Pwo, выделенные из архей, обладают таким механизмом, их использование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы (процессивность) ниже, чем у Taq. Сейчас применяют смеси Taq и Pfu, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования.

13.2. Проведение ПЦР

Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации) с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определенных условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это все равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований.

Компоненты реакции. Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов: *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и др.;
- буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора; содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пи-рофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию.

Праймеры. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами – короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18-30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двухцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка. После гибридизации матрицы с праймером (отжиг) последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы (см. ниже). Важнейшая характеристика праймеров – температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица. Она определяется как температура, при которой праймер присоединился к половине возможных сайтов связывания.

Если праймер короткий и T_m мала, то праймер может оказаться частично комплементарен другим участкам матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °C.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев: GC-состав ~ 40—60 %; близкие T_m праймеров (отличия не более чем на 5 °C); отсутствие

неспецифических вторичных структур – шпилек и ди-меров; желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Амплификатор. ПЦР проводят в амплификаторе – приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью горячего старта. Touchdown ПЦР (см. ниже) и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Ход реакции. Обычно при проведении ПЦР выполняется 20-35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий.

Денатурация. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94-96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 мин. чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2^{^5} мин для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой прием называется горячим стартом, он позволяет снизить количество неспецифических продуктов реакции.

Отжиг. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5 °С ниже их температуры плавления. Время стадии – 0,5-2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

Элонгация. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это – стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным 1 мин на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин.

Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) теоретически возрастает пропорционально 2^N , где N – число циклов реакции. На самом деле эффективность каждого цикла может быть меньше 100 %, поэтому в действительности $P \sim (1 + E)^n$, где P — количество продукта, E средняя эффективность цикла.

Число «длинных» копий ДНК тоже растет, но линейно, поэтому в продуктах реакции доминирует специфический фрагмент.

Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».

13.3. Разновидности ПЦР

- «Вложенная» ПЦР (Nested PCR) – применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

- «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR) – используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

- ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) – используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одно-цепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.

- Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR) – проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

- Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR) – используется для быстрого измерения количества определенной ДНК, кДНК или РНК в пробе. Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR) — в этом методе используют флуоресцентно меченные реагенты для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления.

- Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR) – с помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают. При определенной температуре система пройдет через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК.

Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле; PCR + + Colony, Polony) – акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

- ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR), ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR) – модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Используют две полимеразы, одна из которых – Taq-полимераза с высокой процессивностью (т.е. способная за один проход синтезировать хтинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5' эндонуклеазной активностью. Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой.

- ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR, RAPD-PCR) – используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, на-

пример разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (20-25 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удается добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов. Если нуклеотидная последовательность матрицы известна частично или неизвестна вовсе, можно использовать вырожденные праймеры, последовательность которых содержит вырожденные позиции, в которых могут располагаться любые основания. Например, последовательность праймера может быть такой: ...АТН..., где Н — А, Т или С.

13.4. Применение ПЦР

ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах.

Криминология. ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления — кровь, слюна, сперма, волосы и т.п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически — одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью гель-электрофореза. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (genetic fingerprint).

Установление отцовства. Хотя «генетические отпечатки пальцев» уникальны (за исключением случая однойцевых близнецов), родственные связи все же можно установить, сделав несколько таких отпечатков. Тот же метод можно применить, слегка модифицировав его, для установления эволюционного родства среди организмов.

Медицинская диагностика. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных, бактериальных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

Высокие показатели чувствительности и специфичности полимеразной цепной реакции (ПЦР) делают ее революционной в лабораторной диагностике. Показания к применению ПЦР такие же, как и у культурального метода. Следует учитывать, что при исследовании биопроб методом ПЦР сразу после курса антибактериального лечения в некоторых случаях можно получить «ложноположительные с клинической точки зрения» результаты, поскольку невозможно однозначно оценить жизнеспособность микробной клетки на основании выявления фрагмента ее генома, используя только молекулярно-биологические методы, поскольку амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.

Метод ПЦР особенно эффективен при выявлении трудно культивируемых, некультивируемых, требующих сложной питательной среды и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях.

Диагностические возможности ПЦР не ограничены способностью микроорганизма расти на искусственных средах или в культуре клеток. Поэтому основное преимуще-

щество ПЦР перед культуральными методами состоит не в высокой чувствительности ПЦР-метода (поскольку их чувствительность сопоставима), а в способности идентифицировать, определять свойства и работать с большим разнообразием микроорганизмов, которые не удается по тем или иным причинам размножить в лабораторных условиях.

Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

13.5. Ошибки при применении ПЦР

С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Это, прежде всего, ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб. Поскольку эти процедуры могут осуществляться вне ПЦР-лаборатории, большое внимание следует уделять обучению медицинского персонала, выполняющего забор проб, так как именно от него во многом зависит качество ПЦР-анализов. Случаи тотальной контаминации выявляются без труда по появлению линии «положительной» ДНК во всех пробах, включая отрицательный контроль. Реагенты, загрязненные «положительной» ДНК, подлежат ликвидации. Вторичная реакция ставится с новыми реагентами.

Вторую группу составляют ошибки, связанные с неверной диагностической стратегией врача, использующего ПЦР-диагностику. Недостатки ПЦР лежат не в сути метода, а в неправильном методическом подходе (алгоритме лабораторной диагностики) при обследовании пациента и неверной клинической интерпретации полученных результатов.

Следует обратить внимание на случаи несовпадения результатов ПЦР-анализа с результатами других исследований, например с результатами определения антител к возбудителю методом иммуноферментного анализа (ИФА). Возможна и обратная ситуация, когда при положительном результате ПЦР-анализа не выявляются специфические антитела. При хронических инфекциях, которые зачастую сопровождаются иммунодепрессией, такая картина бывает нередко.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Определение ПЦР, история разработки метода.
- 2) Виды ПЦР.
- 3) Преимущества ПЦР перед другими методами диагностики.
- 4) Ошибки при постановке ПЦР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. **Мудрецова-Висс, К.А.** Микробиология, санитария и гигиена / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина. – М.: ИД ФОРУМ : Инфра-М, 2010. – 400 с. ISBN 978-5-8199-0350-6.
2. Руководство по микробиологии и иммунологии / Н.М. Колычев [и др.]; гл. ред. В.Н. Кисленко. – Новосибирск: Арта, 2010. – 256 с. ISBN 978-5-902700-19-7.

Дополнительная

1. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.– 92 с.

Лекция 14

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

14.1. Принципы метода

Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в центробежном поле. Суспензию частиц, помещенную в пробирку, загружают в ротор, установленный на валу привода центрифуги. В центробежном поле частицы, имеющие разную плотность, форму или размеры, осаждаются с разной скоростью.

Скорость седиментации зависит от **центробежного ускорения** (G), прямо пропорционального угловой скорости ротора (ω , в рад·с⁻¹) и расстоянию между частицей и осью вращения (r , в см):

$$G = \omega^2 r .$$

а центробежное ускорение тогда будет равно

$$G = \frac{4\pi^2 (\text{об} \cdot \text{мин}^{-1})^2 r}{3600} .$$

Поскольку один оборот ротора составляет 2π радиан, угловую скорость ротора в оборотах в минуту (об·мин⁻¹) можно записать так:

$$\omega = \frac{2\pi \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}}{60} .$$

Центробежное ускорение обычно выражается в единицах g (гравитационная постоянная, равная 980 см·с⁻¹) и называется *относительное центробежное ускорение* (ОЦУ), т. е.

$$\text{ОЦУ} = \frac{4\pi^2 (\text{об} \cdot \text{мин}^{-1})^2 r}{3600 \cdot 980} ,$$

или

$$\text{ОЦУ} = 1,11 \cdot 10^{-5} (\text{об} \cdot \text{мин}^{-1})^2 r . \quad (2.1)$$

При перечислении условий разделения частиц указывают скорость вращения радиус ротора, а также время центрифугирования. Центробежное ускорение обычно выражают в единицах g , рассчитанных из среднего радиуса вращения ($r_{\text{средн}}$) столбика жидкости в центрифужной пробирке (т. е. расстояния от оси вращения середины столбика жидкости).

Скорость седиментации сферических частиц зависит не только от центробежного ускорения, но и от плотности и радиуса самих частиц и от вязкости среды суспендирования. Время, необходимое для осаждения сферической частицы в жидкой среде от мениска жидкости до дна центрифужной пробирки, обратно пропорционально скорости седиментации и определяется следующим уравнением:

$$t = \frac{9}{2} \frac{\eta}{2\omega^2 r_q^2 (\rho_q - \rho)} \ln \frac{r_d}{r_m}, \quad (2.2)$$

где t —время седиментации в секундах, η — вязкость среды, r_q —радиус частицы, ρ_q —плотность частицы, ρ — плотность среды, r_m — расстояние от оси вращения до мениска жидкости, r_d — расстояние от оси вращения до дна пробирки.

Как следует из уравнения (2.2), при заданной скорости вращения ротора время, необходимое для осаждения гомогенных сферических частиц, обратно пропорционально квадрату их радиусов и разности плотностей частиц и среды и прямо пропорционально вязкости среды. Поэтому смесь гетерогенных, приблизительно сферических частиц, различающихся по плотности и (или) размерам, можно разделить либо за счет разного времени осаждения их на дно пробирки при данном ускорении, либо за счет распределения седиментирующих частиц вдоль пробирки, устанавливающегося через определенный промежуток времени. При разделении веществ необходимо учитывать и такие важные факторы, как плотность и вязкость среды. Описанными методами можно разделять клеточные органеллы из гомогенатов тканей. Основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, хлоропласты, митохондрий, лизосомы (или другие микротельца), микросомы (фрагменты гладкой и шероховатой эндоплазматической сети) и, наконец, рибосомы. Осаждение несферических частиц не подчиняется уравнению (2.2), поэтому частицы одинаковой массы, но различной формы осаждаются при разных скоростях. Эта особенность используется при исследовании с помощью ультрацентрифугирования-конформации макромолекул.

Препаративное центрифугирование заключается в выделении **биологического материала** для использования как продукта биотехнологии (выделение, очистка компонентов, клеток и т.д.).

14.2. Препаративное центрифугирование

Дифференциальное центрифугирование.

Этот метод основан на различиях в скоростях седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью. Разделяемый материал, например гомогенат ткани, центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое выбирается так, чтобы на каждом этапе на дно пробирки осаждалась определенная фракция. В конце каждой стадии осадок отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают, чтобы в конечном итоге получить чистую осадочную фракцию. К сожалению, получить абсолютно чистый (гомогенный) осадок практически невозможно; чтобы понять, почему это происходит, обратимся к рассмотрению процесса, происходящего в центрифужной пробирке в начале каждой стадии центрифугирования.

Сначала все частицы гомогената распределены по объему центрифужной пробирки равномерно, поэтому получить чистые препараты осадков самых тяжелых частиц за один цикл центрифугирования невозможно: первый образовавшийся осадок содержит в основном самые тяжелые частицы, но, кроме этого, также некоторое количество всех исходных компонентов. Получить достаточно чистый препарат тяжелых частиц можно лишь при повторном (двух- трехкратном) суспендировании и центрифугировании исходного осадка. Дальнейшее центрифугирование супернатанта при последующем увеличении

центробежного ускорения приводит к седиментации частиц средних размеров и плотности, а затем и к осаждению самых мелких частиц, имеющих наименьшую плотность.

14.3. Аналитическое ультрацентрифугирование

В отличие от препаративного центрифугирования, целью которого является разделение веществ и их очистка, аналитическое ультрацентрифугирование применяется в основном для изучения седиментационных свойств биологических макромолекул и других структур. Поэтому в аналитическом центрифугировании применяют роторы и регистрирующие системы особой конструкции: они позволяют непрерывно наблюдать за седиментацией материала в центробежном поле.

Аналитическая ячейка, емкость которой, как правило, равна 1 см^3 , имеет секторальную форму. При правильной установке в роторе она, несмотря на то, что стоит вертикально, работает по тому же принципу, что и ротор с подвесными стаканами, создавая почти идеальные условия седиментации. На торцах аналитической ячейки имеются окошки с кварцевыми стеклами. Аналитические ультрацентрифуги снабжены оптическими системами, позволяющими наблюдать за седиментацией частиц в течение всего периода центрифугирования. Через заданные промежутки времени седиментирующий материал можно фотографировать. При фракционировании белков и ДНК за седиментацией наблюдают по поглощению в ультрафиолете, а в тех случаях, когда исследуемые растворы имеют разные коэффициенты преломления – с помощью шлирен-системы или интерференционной системы Рэлея. Два последних метода основаны на том, что при прохождении света через прозрачный раствор, состоящий из зон с различной плотностью, на границе зон происходит преломление света. При седиментации между зонами с тяжелыми и легкими частицами образуется граница, которая действует как преломляющая линза; при этом на фотопластинке, используемой в качестве детектора, появляется пик. В ходе седиментации происходит перемещение границы, а следовательно, и пика, по скорости передвижения которого можно судить о скорости седиментации материала. Интерферометрические системы отличаются большей чувствительностью, чем шлирен-системы. Аналитические ячейки бывают односекторные, которые применяются наиболее часто, и двухсекторные, которые используются для сравнительного изучения растворителя и растворенного вещества.

В биологии аналитическое ультрацентрифугирование применяется для определения молекулярных весов макромолекул, проверки чистоты получаемых образцов, а также для исследования конформационных изменений в макромолекулах. Все эти вопросы кратко освещены в следующем разделе.

14.4. Применение аналитического ультрацентрифугирования

Существует три основных метода определения молекулярных весов при помощи аналитического ультрацентрифугирования: определение скорости седиментации, метод седиментационного равновесия и метод приближения к седиментационному равновесию.

Определение молекулярного веса по скорости седиментации – это наиболее распространенный метод. Центрифугирование проводят при больших скоростях, так что частицы, вначале равномерно распределенные по всему объему, начинают упорядоченно перемещаться по радиусу от центра вращения. Между областью растворителя, уже

свободной от частиц, и той его частью, которая их содержит, образуется четкая граница раздела. Эта граница при центрифугировании перемещается, что дает возможность определять скорость седиментации частиц при помощи одного из вышеупомянутых методов, регистрируя это перемещение на фотопластинке.

Скорость седиментации определяется следующим соотношением:

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x},$$

где X – расстояние от оси вращения в см, t – время в с, ω — угловая скорость в рад·с⁻¹, s — коэффициент седиментации молекулы.

Метод седиментационного равновесия. Определение молекулярных весов этим методом проводится при сравнительно небольших скоростях вращения ротора, порядка 7000...8 000 об·мин⁻¹, чтобы молекулы с большим молекулярным весом не осаждались на дно. Ультрацентрифугирование проводят вплоть до достижения частицами равновесия, устанавливающегося под действием центробежных сил, с одной стороны, и диффузионных – с другой, т. е. до тех пор, пока частицы не перестанут перемещаться.

Метод приближения к седиментационному равновесию был разработан для того, чтобы избавиться от недостатков предыдущего метода, связанных с большими затратами времени, необходимого для установления равновесия. С помощью этого метода можно определять молекулярные веса, когда центрифугируемый раствор находится в состоянии приближения к равновесию. Вначале макромолекулы распределяются по всему объему аналитической ячейки равномерно; затем по мере центрифугирования молекулы оседают, и плотность раствора в области мениска постепенно уменьшается.

Оценка чистоты препаратов

Аналитическое ультрацентрифугирование широко применяется для оценки чистоты препаратов ДНК, вирусов и белков. Чистота препаратов несомненно очень важна в тех случаях, когда требуется точно определить молекулярный вес молекулы. В большинстве случаев о гомогенности препарата можно судить по характеру границы седиментации, используя метод определения скорости седиментации: гомогенный препарат обычно дает одну резко очерченную границу. Присутствующие в препарате примеси проявляются в виде дополнительного пика или плеча; они же обуславливают асимметрию основного пика.

Исследование конформационных изменений в макромолекулах

Еще одна область применения аналитического ультрацентрифугирования – исследование конформационных изменений макромолекул. Молекула ДНК, например, может быть одно- или двухцепочечной, линейной или кольцевой. Под действием различных соединений (таких, например, как органические растворители) или при повышенных температурах ДНК претерпевает ряд обратимых и необратимых конформационных изменений, которые можно установить по изменению скорости седиментации образца. Чем компактнее молекула, тем меньше ее коэффициент трения в растворе и наоборот: чем менее она компактна, тем больше коэффициент трения и, следовательно, тем медленнее будет она седиментировать. Таким образом, различия в скорости седиментации образца до и после различных воздействий на него позволяют обнаруживать конформационные изменения, происходящие в макромолекулах.

У аллостерических белков, таких, например, как аспартат-транскарбамоилаза, конформационные изменения возникают в результате связывания их с субстратом и (или) малыми лигандами (активаторами или ингибиторами). Диссоциацию белка на субъеди-

ницы (протомеры) можно вызывать, обработав его такими веществами, как мочеви́на или парахлормеркурибензоат. Все эти изменения легко можно проследить при помощи аналитического ультрацентрифугирования.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Принципы метода
- 2) Препаративное центрифугирование
- 3) Аналитическое ультрацентрифугирование
- 4) Применение аналитического ультрацентрифугирования

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Инженерные основы биотехнологии: Учеб. пособие : учебное пособие / ред. : Д. Г. Победимский. – М.: МГАТХТ, 2005. – 379 с.
2. Машины и аппараты пищевых производств: Кн. 1 / ред. В. А. Панфилов. – М.: КолосС, 2009. – 610 с. - ISBN 978-5-9532-0509-2

Дополнительная

1. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.- 92 с.
3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 2. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004.- 86 с.
4. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 196 с. ISBN 5-7633-0783-7.
5. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха [др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 469 с. – ISBN 5-06-004264-2

Лекция 15

СОВРЕМЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

15.1. Классификация биореакторов по конструктивным особенностям и организации перемешивания

Аппараты для аэробной глубинной ферментации наиболее сложны как конструктивно, так и с точки зрения их эксплуатации. Главная задача, возникающая при их конструировании, – обеспечение высокой интенсивности массо- и энергообмена клеток со средой. Массообмен определяется транспортом (переносом) кислорода и других биогенных элементов из среды в микробную клетку и отводом из нее продуктов обмена. Главным показателем массообменных характеристик ферментера служит коэффициентмассопередачи кислорода, так как кислород является основным лимитирующим фактором аэробных ферментационных процессов. Расход кислорода на образование 1 кг биомассы в зависимости от типа углеродсодержащего сырья и степени его восстановленности может составлять от 0,75 до 5,00 кг. Клетки способны утилизировать кислород только в растворенном виде, поэтому необходимо постоянно поддерживать его концентрацию в культуре на уровне, оптимальном для конкретного продуцента. При этом скорость поступления кислорода к клеткам должна превышать скорость его включения в клетки, и в околочлеточном пространстве не должно возникать так называемых «концентрационных ям». Кроме этого, концентрация клеток и растворенного субстрата должны быть равномерными по всему объему ферментера. Поэтому перемешивание является также одним из основных факторов, обеспечивающих требуемую гидродинамическую обстановку в аппарате. При интенсивном перемешивании пузырьки воздуха дробятся в аппарате и диспергируясь увеличивают площадь контакта фаз «среда-клетка». Однако чрезмерное перемешивание может вызвать механическое повреждение биологических объектов.

15.2. Очистка сточных вод в аэротенках

Биотенк – аэротенк с насадкой, изготавливаемой в виде кассет или блоков из жестких элементов или гибких рулонных материалов. Кассеты или блоки заполняют кольцами, кусками пеноматериалов (пемза, пеностекло, и т.п.), гофрированными листами или сетками из пластмассы или волокнистых материалов. Насадка позволяет увеличить концентрацию ила в биотенках. за счет закрепления микроорганизмов на ней. С увеличением концентрации ила возрастает пропускная способность биотенка, которая в обычных условиях лимитируется работой вторичных отстойников, не способных разделить иловые смеси при концентрации свыше 4...6 г/л. При использовании в качестве насадки насыпных и волокнистых материалов (например, в виде ершей) необходима их периодическая регенерация от чрезмерного накопления биомассы путем интенсивной аэрации.

Установки биотенков предназначены для очистки бытовых и близких к ним по составу производственных сточных вод объемом 25...3000 м³/сутки от органических веществ, взвешенных веществ, азота, фосфора и ряда других примесей с УФ-обеззараживанием очищенных стоков.

Установки биотенков работают по принципу биотенка-отстойника в режиме денитрификации и биологической детофосфотации с усреднением расхода стоков за счет специальной конструкции лотка осветленной воды. Предварительная механическая очистка сточных вод, уплотнение и стабилизация осадка совмещены в одной зоне из которой избыточный ил периодически откачивается эрлифтом.

Одним из наиболее распространенных биоокислителей для очистки производственных сточных вод является аэротенк. Небольшие предприятия пищевой промышленности часто используют в качестве биоокислителя очистную компактную биоустановку КУ-200 производительностью до 200 м³ в сутки с пневмоподачей сжатого воздуха. Установка состоит из трёх частей: аэротенка, где происходит деструкция органических загрязнений, отстойной части, где осветляется очищенный промсток и оседает активный ил, и стабилизатора избыточного активного ила.

Наличие биоконтактных элементов в биотенке позволяет снизить потребность в сжатом воздухе и, следовательно, электроэнергии втрое, а также значительно уменьшить период аэрации сточных вод в аэротенке.

Особенность биотенков нового типа позволяет рекомендовать их для очистки концентрированных по органическим загрязнениям промстоков различных пищевых производств и агропромышленных комплексов. Они могут быть использованы также для интенсификации работы существующих очистных сооружений.

В первой зоне происходит механическая очистка стоков от песка и грубодисперсных взвешенных веществ, анаэробная предочистка от органических веществ, а также уплотнение и сбраживание осадка в анаэробно-аэробном режиме. Первая зона оборудована эрлифтом избыточного ила.

Во второй зоне, оборудованной системой мелкопузырчатой аэрации и блоками плоскостной загрузки, протекают процессы аэробно-аноксидного окисления органических веществ, нитрификации, денитрификации и биологической дефосфотации. Вторая зона имеет несколько последовательно соединенных отделений.

В третьей зоне происходит отстаивание активного ила, который перекачивается в первую зону установки. Третья зона оборудована блоком тонкослойного отстаивания, одним или двумя эрлифтами активного ила и лотками осветленной воды.

15.3. Биофильтры

В этих сооружениях биоразлагаемые органические вещества жидких отходов сорбируются и окисляются в аэробных условиях популяций гетеротрофных факультативных бактерий, образующих биологическую пленку на поверхности насадки (загрузочного материала, субстрата). Для орошения насадки вода с загрязнениями периодически или непрерывно подается в верхнюю часть сооружения через неподвижные разбрызгиватели (спринклеры) или реактивные вращающиеся водораспределители. Активная часть биопленки распространяется на глубину 70...100 мкм. В слоях пленки, прилегающих к насадке, создаются анаэробные условия, образуются органические кислоты (и газы CH₄ и H₂S), величина pH снижается, происходит частичное отмирание клеток. Под воздействием гидравлической нагрузки такие части пленки отрываются от субстрата и выносятся с водой.

Пропускная способность биофильтра определяется площадью поверхности, занятой биопленкой, и возможностью свободного доступа кислорода воздуха к ней. Чем боль-

ше площадь поверхности биопленки (при одинаковой массе) и чем легче к ней доступ кислорода, тем выше пропускная способность биофильтра.

Важнейшая составная часть биофильтра — загрузочный материал. По типу загрузочного материала все биофильтры делят на две категории: с объемной и плоскостной загрузкой.

Анаэробные биофильтры. Эта новая разновидность биофильтров представляет собой закрытые резервуары с загрузкой, сквозь которую вода профильтровывается восходящим потоком, без доступа в нее кислорода воздуха. Анаэробные биофильтры по принципу работы занимают промежуточное положение между обычными биофильтрами и метантенками. Биопленка в них закреплена на материале загрузки; процессы окисления сопровождаются метанообразованием. Анаэробные биофильтры можно применять для очистки высококонцентрированных сточных вод, не содержащих взвешенных веществ или содержащих их в незначительном количестве.

Вопросы для самоконтроля

- 1) Классификация биореакторов по конструктивным особенностям и организации перемешивания.
- 2) Очистка сточных вод в аэротенках.
- 3) Биофильтры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Машины и аппараты пищевых производств: в 3 кн. Кн. 1 / ред. В. А. Панфилов. — М.: КолосС, 2009. — 610 с.: ил. - ISBN 978-5-9532-0509-2
2. **Жебентяев, А.И.** Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа / А.И. Жебентяев — М.: Инфра-М.: Минск: Нов. знание, 2013. — 206 с. ISBN 978-5-16-006615-8.
3. Инженерные основы биотехнологии: Учебное пособие: учебное пособие / ред. : Д. Г. Победимский. — М.: МГАТХТ, 2005. — 379 с.

Дополнительная

1. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков — М.: Колос, 2004. — 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).
2. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов — Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.- 92 с.
3. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. — Саратов, 2003. — 196 с. ISBN 5-7633-0783-7.
4. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 2. / В.А. Блинов — Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004.- 86 с.
5. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Методические указания к лабораторным работам / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. — Саратов: «РИК «Полиграфия Поволжья», 2004. — 84 с.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Основная

1. **Васильев, В.П.** Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа / В.П. Васильев – М.: Дрофа, 2003. – 384 с. ISBN 5-71.
2. **Великов, В.А.** Практикум по молекулярной биологии. Методы биоинженерии: Учебное пособие для студентов биологического факультета, обучающихся по специальности 011600 “Биология” / В.А. Великов, П.Е. Кузнецов. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 2006. – 80 с. – ISBN 5-292-03591-2
3. **Великов, В.А.** Практикум по молекулярной биологии. Методы исследования белков: Учебное пособие для студентов биологического факультета, обучающихся по специальности 020201 “Биология” / В.А. Великов, В.В. Игнатов. – Саратов: Изд. центр “Наука”, 2007. – 60 с. – ISBN 978-5-91272-319-3
4. **Гусев, М.В.** Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 978-5-7695-4989-2
5. **Димитриев, А.Д.** Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. **Емцев, В.Т.** Микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – 446 с. – ISBN 5-7107-7750-1
7. **Жебентяев, А.И.** Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа / А.И. Жебентяев – М.: Инфра-М.: Минск: Нов. знание, 2013. – 206 с. ISBN 978-5-16-006615-8.
8. Инженерные основы биотехнологии: Учеб. пособие : учебное пособие / ред. : Д. Г. Победимский. – М.: МГАТХТ, 2005. – 379 с.
9. **Карпунина, Л.В.** Микробиология. Руководство к лабораторным занятиям для студентов специальности “Биоэкология”/ Л.В. Карпунина, Е.С. Мухачева. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова. – 2005. – 100 с.
10. **Карпунина, Л.В.** Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Микробиология и иммунология» для студентов направления 111100.62 - "Зоотехния", профиль подготовки «Непродуктивное животноводство» / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2012. – 66 с.
11. **Карпунина, Л.В.** Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Общая биология и микробиология». Часть 2. Микробиология / Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова. – Саратов: Изд-во ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014. – 62 с.
12. **Лысак, В.В.** Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
13. Машины и аппараты пищевых производств: в 3 кн. Кн. 1 / ред. В. А. Панфилов. – М.: КолосС, 2009. – 610 с. - ISBN 978-5-9532-0509-2
14. Методические указания к лабораторным работам по микробиологии. Для студентов специальности 270900 – “Технология мяса и мясопродуктов” / В.Ф. Оркин Л.В. [и др.]. – Саратов: СГАУ им. Н.И. Вавилова, 2005. – 104 с.
15. Методы общей бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 130 с.
16. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск: УГСХА, 2007. – 222 с.

17. **Мудрецова-Висс, К.А.** Микробиология, санитария и гигиена / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина. – М.: ИД ФОРУМ : Инфра-М, 2010. – 400 с. ISBN 978-5-8199-0350-6.

18. Руководство для большого практикума по микробиологии: Учебное пособие для студентов биологического факультета / А.М. Петерсон [и др.]. – Саратов: Изд-во Саратовского университета. – 2008. – 68 с. – ISBN 978-5-292-03880-1

19. Руководство по микробиологии и иммунологии / Н.М. Колычев [и др.]; гл. ред. В.Н. Кисленко. – Новосибирск: Арта, 2010. – 256 с. ISBN 978-5-902700-19-7.

20. Современные методы микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие / А.В. Семенихина [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2007. – 68 с.

21. **Филлипович, Ю.Б.** Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

Дополнительная

1. **Антонов, Б.И.** Лабораторные исследования в ветеринарии. Химико-токсикологические методы / Б.И. Антонов, В.И. Федотова, Н.А. Сухая. – М.: Агропромиздат. – 1989. – 320 с.

2. **Бирюков, В.В.** Основы промышленной биотехнологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Бирюков – М.: Колос, 2004. – 296 с. ISBN 5-9532-0231-8 («КолосС»), ISBN 5-98109-008-1 (АНО «Химия»).

3. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2003.- 92 с.

4. **Блинов, В.А.** Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 196 с. ISBN 5-7633-0783-7.

5. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 2. / В.А. Блинов – Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2004.- 86 с.

6. **Блинов, В.А.** Общая биотехнология: Методические указания к лабораторным работам / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «РИК «Полиграфия Поволжья», 2004. – 84 с.

7. **Бреслер, С.Е.** Молекулярная биология / С.Е. Бреслер. – М.: Наука. – 1973. – 580 с.

8. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология / Б.Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 585 с.

9. **Игнатов, В.В.** Методическое пособие по химии белка к большому практикуму по биохимии / В.В. Игнатов, С.К. Ступникова, Л.Н. Яблокова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1969. – 36 с.

10. **Кнорре, Д.Г.** Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7

11. **Лабинская, А.С.** Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 397 с.

12. **Ленинджер, А.** Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 960 с.

13. **Мельников, Г.В.** Методическое пособие к малому практикуму по биохимии / Г.В. Мельников, С.К. Ступникова. – Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1978. – 40 с.

14. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / под ред. И.П. Кондрахина. – М.: Колос. – 2004. – 520 с. – ISBN 5-9532-0165-6
15. Микробиология / А.В. Воробьев [и др.]. – М.: Медицина, 2003. – 336 с. – ISBN 5-225-04411-5
16. **Митрука, Б.М.** Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине/ Б.М. Митрука. – М.: Медицина, 1978. – 601с.
17. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т.Т. Березова. – М.: Медицина, 1976. – 296 с.
18. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха,[и др.]. – М.: Высшая школа, 2003. – 469 с. – ISBN 5-06-004264-2
19. **Шлегель, Г.** Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 568 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Лекция 1. Микробиологическая лаборатория.....	3
Лекция 2. Культивирование микроорганизмов.....	8
Лекция 3. Методы микроскопических исследований.....	13
Лекция 4. Биологические методы.....	17
Лекция 5. Физико-химические методы исследований.....	23
Лекция 6. Иммуниет и методы его изучения. Серологические методы. Реакции агглютинац, преципитации.....	28
Лекция 7. Иммуниет и методы его изучения. Фагоцитоз. Гуморальные факторы и методы их изучения.....	34
Лекция 8. Иммунологические методы исследований.....	38
Лекция 9. Методы иммобилизации клеток и ферментов микроорга- низмов.....	44
Лекция 10. Технология рекомбинантных ДНК.....	50
Лекция 11. Аналитическое оборудование (рН-метрия, ионометрия).....	55
Лекция 12. Сложное аналитическое оборудование. Спектрофотометрия....	59
Лекция 13. Полимеразная цепная реакция.....	65
Лекция 14. Центрифугирование.....	72
Лекция 15. Современное оборудование различных биотехнологических производств.....	77
Библиографический список.....	81
Содержание.....	84