

Дербуш Светлана Николаевна, Ивлева Лариса Павловна

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Адрес статьи: www.gramota.net/materials/1/2011/4/23.html

Статья опубликована в авторской редакции и отражает точку зрения автора(ов) по рассматриваемому вопросу.

Источник

Альманах современной науки и образования

Тамбов: Грамота, 2011. № 4 (47). С. 98-100. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: www.gramota.net/editions/1.html

Содержание данного номера журнала: www.gramota.net/materials/1/2011/4/

© Издательство "Грамота"

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: www.gramota.net

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: almanac@gramota.net

этилена в клетках, что ведет к угнетению процесса ризогенеза. Из новообразованных клеток обычно развивается эмбриоидогенный каллус или множественные проростки. Эмбриоидогенный каллус анабазиса имел кустообразную или глобулярную форму, плотную консистенцию и ярко зеленый цвет. Оптимальное соотношение фитогормонов ауксинов и цитокинов в питательной среде М-С способствовало формированию морфогенной каллусной массы, которая в течение 3-4-х недель обладала способностью образовывать органоидные структуры. Биомасса каллусов анабазиса, была больше, и уровень накопления анабазина выше. Предложенный состав питательной среды М-С с оптимальным балансом фитогормонов, является наиболее перспективным для получения морфогенной культуры клеток анабазиса.

Таким образом, анализируя полученные данные можно сделать следующие выводы, что индукция накопления биомассы возможна при правильном подборе концентраций и соотношений фитогормонов в питательной среде М-С. В результате эксперимента была выявлена оптимальная концентрация ИУК 1,75 мг/л и кинитин 2,15 мг/л (РИ=67,8±1,2), отвечающая поставленной цели первого этапа культивирования. Первый этап культивирования являлся предварительным для получения необходимого количества клеточной массы. Второй этап культивирования необходим для индукции синтеза алкалоида анабазин, для этого фитогормон кинитин заменили БАП. Таким образом, для второго этапа культивирования, была рекомендована питательная среда М-С с фитогормональным фоном ИУК 1,0 мг/л и БАП 0,1 мг/л.

Обращено внимание на то, что каллусы анабазиса на первом этапе культивирования изменялись от неорганизованного размножения к вторичной дифференцировке с образованием морфогенных структур. Морфологические изменения в каллусной массе анабазиса имели ярко выраженные характеристики: цвет зеленый, консистенция плотная, форма глобулярная.

Полученный клеточный материал анабазиса на втором этапе культивирования, сушился, экстрагировался и подвергался химическому анализу методом БХ. Результат химического анализа показал, что на втором этапе культивирования кроме алкалоида анабазин в каллусах анабазиса синтезируется и другие алкалоиды. Среднее количество алкалоида анабазин 0,8 мг на 100 гр. сухой массы каллусов.

Анализируя полученные результаты необходимо отметить, во-первых, для получения каллусной массы анабазиса необходимо, чтобы экспланты были детерминированы в соответствии с задачами культивирования. Во-вторых, для реализации эмбриоидогенного пути развития растительной клетки анабазиса необходимо наличие оптимального фитогормонального баланса в питательной среде М-С. Для получения эмбриоидогенного первичного каллуса анабазиса, важно использовать питательную среду М-С и замена гормона 2,4-Д на ИУК. Установлено, что на первом этапе культивирования при высоких концентрациях фитогормонов ауксин/цитокин (более 4,0 мг/л) в питательной среде М-С, в каллусной массе анабазиса наблюдался ризогенез. При низких концентрациях фитогормонов ауксин/цитокин (менее 0,5 мг/л) в питательной среде М-С, в каллусной массе анабазиса наблюдался гомогенез.

Таким образом, на первом этапе культивирования анабазиса, для получения первичного эмбриоидогенного каллуса рекомендуется использовать концентрацию фитогормонов в питательной среде М-С ИУК 1,75 мг/л и кинитин 2,15 мг/л (РИ=67,8±1,2%). На втором этапе культивирования анабазиса, для биосинтеза алкалоида анабазин в условиях *in vitro* рекомендуется использовать концентрацию фитогормонов в питательной среде М-С ИУК 1,0 мг/л и БАП 0,1 мг/л (алкалоид анабазин 0,8 мг на 100 гр. сухой массы каллусов).

Список литературы

1. Андреева А. П., Аманов С. Б., Ли К. Г., Адекенов С. М. Культура каллусной ткани *Artemisia glabella* Kar. et Kir. продуцента сесквитерпенового лактона арглабин // Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организация фарм. деятельности: международ. конф. Томск, 2000. С. 14.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.
3. Бутенко Р. Г. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре *in vitro* // Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск, 1974. С. 66-83.
4. Носов А. М. Культура клеток высших растений: от теории к практике // Биология в школе. 2004. № 5. С. 4-8.

УДК 628.16.09

Светлана Николаевна Дербуш, Лариса Павловна Ивлева
Карагандинский государственный технический университет

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ[©]

Корни биотехнологии уходят в далёкое прошлое, они связаны с хлебопечением, виноделием и другими способами приготовления пищи, освоенными человеком на протяжении многих столетий. Древнейшим биотехнологическим процессом было брожение с участием микроорганизмов. В пользу этого свидетельствует

описание процесса приготовления пива, обнаруженное в 1981 г. при раскопках Вавилона на дощечке, которая датируется примерно 6-м тысячелетием до н.э. Известно, что шумеры изготавливали до 2 десятков видов пива [3].

Наукой биотехнология стала только со времен Л. Пастера, и долгое время ферментация была практически единственным производственным процессом, а микробиология - её фундаментальной основой. Биохимические методы вошли в практику много позже [2].

В основе биохимической методологии лежит фракционирование, анализ, изучение структуры и свойств отдельных компонентов живого вещества. Поэтому биохимические методы - это универсальные методы для использования их в биологических, медицинских и биотехнологических исследованиях. Имеется целый ряд биохимических методик разделения и очистки, таких как высушивание, хроматография, экстракция растворителем и дистилляция, которые являются неотъемлемой частью биотехнологических исследований.

Так, например, производство вакцин - сложный биотехнологический процесс, который требует извлечения из выращенной микробной массы протективных антигенов или антигенных комплексов, очистки и концентрирования антигенов, введения в препараты адьювантов. Выделение и очистка антигенов с помощью традиционных методов (экстракции трихлоруксусной кислотой, кислотного или щелочного гидролиза, ферментативного гидролиза, высаливания нейтральными солями, осаждения спиртом или ацетоном) сочетаются с применением современных методов (скоростного ультрацентрифугирования, мембранной ультрафильтрации, хроматографического разделения, аффинной хроматографии, в т.ч. на моноклональных антителах). С помощью этих приемов удается получать антигены высокой степени очистки и концентрирования [3].

Можно сказать, что любую вакцину готовят при помощи вирусологических, биохимических и молекулярно-биологических методов, которые в своей совокупности обеспечивают положительный эффект в виде получения вакцины с высокими медико-биологическими показателями. Вирус выращивают в культурах куриных фибробластов. Прибегают к заражению клеток небольшими дозами вируса и раннему сбору вирусосодержащей культурной жидкости. В этих условиях вирусосодержащий материал мало загрязняется клеточным детритом, что облегчает концентрацию и очистку вируса. Вирус инактивируют формалином (0,005% 72 ч) и прогреванием (32°C). Это увеличивает его устойчивость в процессе последующей концентрации и очистки. Концентрацию и очистку проводят при помощи дифференциального, а также зонального ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [1].

Рассмотрим более подробно технологию получения субъединичной противовирусной вакцины. В технологии производства субъединичных вакцинных препаратов вначале необходимо наработать путем ферментации биомассу микроорганизмов, чтобы иметь в достаточном объеме микробные антигены для производства вакцин в промышленных масштабах.

Субъединичные вакцины, содержащие только поверхностные антигены вируса гриппа, обладают высокой иммуногенностью и слабой реактогенностью. Это вакцины третьего поколения, в которых достигается максимальная очистка антигенов от токсичных примесей (в т.ч. липидов). Такая вакцина содержит гемагглютинин и нейраминидазу, и не содержит нуклеопротеидных белков. Именно поверхностные антигены значимы в развитии иммунитета против гриппа. Такие вакцины менее реактогенны, нежели расщепленные или цельновирионные. Примеры субъединичных вакцин - голландский «Инфлувак», немецкий «Агриппал», российский «Гриппол» и др.

Вначале определяют эпидемически актуальные подтипы вируса гриппа типа А, либо вирус типа В. Они клинически изолированы и недостаточно эффективно размножаются *in vitro*. Поэтому из этих вирусных частиц выделяются гены, ответственные за синтез гемагглютинина и нейраминидазы и встраиваются в геном лабораторного вакцинного штамма вируса гриппа, хорошо размножающегося на курином эмбрионе, т.е. получают рекомбинантный вакцинный штамм. В лабораторных условиях нарабатываются рекомбинантные вакцинные штаммы вируса путем заражения ими куриного эмбриона. Рекомбинантного вакцинного штамма (это подтипы вируса гриппа типа А, также тип В) должно быть достаточно для последующей инокуляции ими куриных эмбрионов в производственных масштабах. В производственных условиях десятки тысяч яиц заражаются раздельно каждым штаммом вируса гриппа (обычно используются два подтипа вируса гриппа А и штамм тип В). Инкубация при 33-35°C в течение 2-3 суток. За это время репродуцируется достаточное количество вирусов. При помощи ультрацентрифугирования выделяется вирусная масса и инактивируется обычно формальдегидом. Субъединицы гемагглютинин и нейраминидаза выделяются путем обработки вирусных частиц детергентом триметил-цетиламмоний бромидом и повторного ультрацентрифугирования и диализа. Гемагглютинин и нейраминидаза спонтанно соединяются в розетки и помещаются в буферный раствор, содержащий соли калия, натрия, кальция и магния и очень незначительные количества консерванта для предупреждения микробной контаминации. Такая процедура, состоящая из цепочки биохимических реакций, проводится с каждым из трех вакцинных штаммов - двух подтипов вируса типа А и типом вируса В. Эти штаммы комбинируются в одном шприце, в объеме 0,5 мл раствора [Там же].

Следовательно, при создании субъединичных вакцин клетки микроорганизмов лизируют, выделяют вакцинный антиген из клеточного детрита путем сорбции, фильтрации, хроматографии и др., что свидетельствует об обязательном и эффективном использовании биохимических методов в биотехнологии.

Таким образом, биохимические методы нашли свое широкое применение в различных отраслях биотехнологии и унифицированы соответственно последним достижениям науки.

Список литературы

1. **Алмагамбетов К. Х.** Медицинская биотехнология. Астана, 2009. С. 195-222.
2. **Беклемишев А. Б., Савич И. М.** Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин. Новосибирск: Наука, 1997. 210 с.
3. **Жиганова Л. П.** Генно-инженерные методы как новый биотехнологический подход в аграрном секторе США [Электронный ресурс]. URL: <http://www.Биотехнология-Наука.htm> (дата обращения: 20.11.2010).

УДК 519.6

Нина Ивановна Костюкова, Андрей Евгеньевич Кудинов
Институт вычислительной математики и математической геофизики СО РАН

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В МЕДИЦИНЕ[©]**Чего стоит опасаться**

Если действие снотворного испытывается на большом круге лиц, увеличение продолжительности сна для разных лиц оказывается различным. Чего можно достичь статистическими исследованиями - это прежде всего суждения о среднем увеличении продолжительности сна. Далее необходимо проверить, гарантируется ли статистически это увеличение. Этот вид исследований предполагает, наряду с использованием математической статистики, хорошую осведомленность в исследуемой области, потому что воздействие должно быть определено как функция наперед заданных причин. Это означает в нашем примере, что необходимо избегать всякого психологического влияния пациента. Ни врач, ни пациент не должны знать, является ли даваемое средство испытуемым снотворным или заведомо неэффективным средством (так называемым плацебо). Этот вид опытов называют «дважды слепыми опытами». В них особенно очевидны трудности нематематического характера при использовании статистических критериев.

Наряду с этим стоит опасаться следующего. Если мы исходим из определенной постановки задачи, то, собственно, подменяем проблему изучением поведения ряда признаков у некоторого объекта при определенных условиях; реальный признак подменяется наблюдением признака, наблюдение - символами протокола. В каждом приведенном пункте из цепочки подстановок может существовать ошибка (ошибка подстановки). Во многих и важнейших случаях подстановки близость задачи и признака и тем самым ценность заключения незначительны. Например, у тех, кто при исследовании плодовитости и бесплодия ориентируется на число детей, - непосредственно связанный с задачей признак должен будет учитывать еще и детскую смертность.

В последние десятилетия особенно распространилось понимание того, что и в клинической медицине статистика также может служить вспомогательным средством получения научных знаний. В этой области импонирующим результатом является открытие поражения эмбриона краснухой австралийским окулистом Греггом (*Gregg*), который путем чисто статистического анализа провел доказательство того, что должна существовать связь между известными, но ранее считавшимися наследственными повреждениями эмбриона и заболеванием краснухой матери в первые месяцы беременности.

В 1851 г. были зафиксированы курьезные выводы так называемых терапевтических опытов некоторых врачей, которые чаще всего строили их на анализе собственных ощущений и воспоминаний, а также признаков, извлеченных из описанных в литературе случаев, о так называемых исследованиях физиков, которые выводили среднюю температуру некоторых помещений из того, как часто они зябнут или потеют (*Martini*, 1953).

С тех пор прошло более 150 лет. Основные принципы медицинской статистики, в особенности клинико-терапевтических исследований, сегодня хорошо знакомы каждому врачу. Применение статистических и математических методов в биологии (и медицине) привело к биометрии; серьезное значение придается психометрии, социометрии, эконометрии и технометрии.

Обзор исходных материалов

Помимо ошибок округления при записях веса и сверх того фальсификации возраста, помимо субъективных ошибок оценивания и измерения персоналом лаборатории встречаются ошибки, которые совершаются умышленно вследствие заинтересованности опрашиваемого лица.

Большой процент стариков среди населения Болгарии якобы объясняется незнанием секрета их возраста и легкостью соединения действительных данных с завышенными. В странах, население которых преимущественно исповедует ислам, наблюдается значительное отклонение соотношения полов новорожденных от обычного. Там фиксируется заметное превышение числа мальчиков. Достаточно достоверное объяснение заключается в том, что в этих странах рождение девочки считается столь маловажным, что часто не регистрируется.

Надежность лабораторных методов

Известно, что результаты клинических и лабораторных исследований подвержены различного рода искажениям. Ошибки могут, например, появиться при получении и обработке материалов исследования. Так,