

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

И. И. КОНЦЕВАЯ

**ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ:
ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ**

Практическое руководство

для студентов
специальности 6-05-0511-01 «Биология»

Гомель
ГГУ им. Ф. Скорины
2025

УДК 575:602.6(076)
ББК 28.041.4я73
К64

Рецензенты:

кандидат биологических наук Н. В. Чуешова,
кандидат химических наук Н. И. Дроздова

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
учреждения образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»

Концевая, И. И.

К64 Основы клеточной инженерии: питательные среды :
практическое руководство / И. И. Концевая ; Гомельский гос. ун-т
им. Ф. Скорины. – Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2025. – 41 с.
ISBN 978-985-32-0066-9

Издание ставит своей целью оптимизировать учебно-познавательную деятельность студентов по усвоению материала темы разделов «Получение трансгенных растительных организмов», «Перспективы создания и использования трансгенных животных». Студенты подробно знакомятся с теоретическими основами при подборе состава питательных сред для культивирования клеток микроорганизмов, растений, животных. Практическое руководство может быть использовано как на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Основы клеточной инженерии», так и для самостоятельной подготовки.

Адресовано студентам специальности 6-05-0511-01 «Биология».

УДК 575:602.6(076)
ББК 28.041.4я73

ISBN 978-985-32-0066-9

© Концевая И. И., 2025
© Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины», 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1 Питательные среды для культивирования клеток бактерий: состав, назначение, приготовление.....	5
1.1 Понятие «культивирование бактерий».....	5
1.2 Определение понятия «питательная среда», требования к ее составу.....	6
1.3 Классификация питательных сред.....	7
1.4 Приготовление питательных сред.....	10
1.5 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике.....	11
2 Питательные среды для культивирования клеток растений.....	15
2.1 Способы культивирования культуры тканей растений.....	15
2.2 Питательные среды, требования, подходы в приготовлении.....	15
2.3 Влияние фитогормонов на направление морфогенеза в культуре клеток растений.....	22
3 Питательные среды для клеток животных.....	27
3.1 Введение в культуру клеток животных.....	27
3.2 Основные требования к питательной среде.....	28
3.3 Типы сред для клеточных культур.....	32
Литература.....	41

ВВЕДЕНИЕ

Учебный предмет «Основы клеточной инженерии» является одним из фундаментальных биологических дисциплин. Знание основ клеточной инженерии необходимо высококвалифицированному специалисту-биологу для формирования мировоззрения об огромной роли и значимости современных методов работы с клетками прокариот и эукариот. Особую значимость для биологов имеет представление о питательных средах, которые являются основой микробиологической работы, и их качество нередко определяет результаты всего исследования.

Для лабораторной работы студентам предлагаются темы разделов «Получение трансгенных растительных организмов», «Перспективы создания и использования трансгенных животных»: «Питательные среды для культивирования клеток бактерий: состав, назначение, приготовление», «Питательные среды для культивирования клеток растений», «Питательные среды для клеток животных».

Представленный материал способствует расширению и углублению теоретических знаний у студентов. Материалы теоретической части сопровождаются примерами.

Материал каждой темы начинается с плана, включает подробное изложение теоретической части и контрольные вопросы, которые можно использовать для текущего контроля усвоения знаний студентами, а также для самоконтроля.

Изложение материала построено в соответствии с программой курса.

Студенты подробно знакомятся с понятием «питательная среда», требованиями к ее составу, основными подходами в классификации питательных сред, наиболее применяемыми питательными средами в микробиологической практике. Студенты, отработавшие материалы, приобретают достаточную теоретическую подготовку и навыки, необходимые в практической работе и при выполнении экспериментальных исследований.

Целью практического руководства является оказание помощи студентам в овладении теоретическими основами при подборе состава питательных сред и выработке практических навыков работы с питательными средами. Материал пособия делает процесс обучения более эффективным и способствует повышению его качества. Издание может быть использовано на лабораторных занятиях по соответствующим темам курса «Основы клеточной инженерии».

1 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ: СОСТАВ, НАЗНАЧЕНИЕ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ

- 1.1 Понятие «культивирование бактерий».
- 1.2 Определение понятия «питательная среда», требования к её составу.
- 1.3 Классификация питательных сред.
- 1.4 Приготовление питательных сред.
- 1.5 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике.

1.1 Понятие «культивирование бактерий»

Культивирование микроорганизмов является одним из основных методов микробиологии. От умения культивировать микроорганизмы в лабораторных условиях в значительной степени зависят успехи их изучения и практического применения.

Культивирование основано на знании метаболизма микроорганизмов и понимании значения физико-химических условий среды, необходимой для их жизнедеятельности.

Для выращивания микроорганизмов в искусственных условиях *in vitro* необходимы особые субстраты – питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их еще называют «средами для культивирования», и их качество нередко определяет результаты всего исследования. Среда должна создавать оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов.

Каждый организм предъявляет свои требования к питанию в зависимости от среды обитания. Поэтому для выращивания всех организмов в лабораторных условиях не может быть использована одна и та же рецептура культуральной среды.

Культивирование микроорганизмов необходимо для диагностики инфекционных заболеваний, получения антигенов, генетических исследований, идентификации видов микробов, для выделения чистых культур, хранения культурного фонда, изучения биохимических и физиологических реакций и т. д.

1.2 Определение понятия «питательная среда», требования к ее составу

Питательная среда – смесь веществ в жидком, полутвердом или твердом состоянии, в которую входят различные соединения сложного или простого состава, природные и (или) синтетические, которые применяются для размножения, идентификации или сохранения жизнеспособности микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.

Количество используемых составов питательных сред (с учетом модификаций) по различным источникам превысило 5 000 прописей. Но число ингредиентов, являющихся их неотъемлемыми компонентами, относительно невелико, а их композиции создаются на определенных общих принципах. Все большее развитие получают многокомпонентные синтетические среды, содержащие стандартные компоненты, что позволяет контролировать качество питательных сред.

Потребности микроорганизмов в питательных веществах чрезвычайно разнообразны и определяются особенностями их метаболизма.

В широком смысле слова *питательная среда должна соответствовать следующим требованиям:*

Во-первых, питательная среда должна включать доступный для клетки *источник энергии*. Для одних организмов (фототрофов) таким источником служит свет, для других – органический (хемоорганотрофы) или неорганический (хемолитотрофы) субстрат.

Во-вторых, среда должна содержать все необходимые *компоненты для биосинтетических процессов* в клетке. Причем синтетические способности микроорганизмов могут варьировать от использования углекислого газа в качестве единственного источника углерода (автотрофы) до потребности в более восстановленных соединениях углерода – кислотах, спиртах, углеводах и др. (гетеротрофы).

В узком смысле слова *любая искусственная питательная среда должна соответствовать следующим требованиям:* содержать все необходимые для роста питательные вещества в легко усвояемой форме; иметь оптимальную влажность (так как транспорт питательных веществ к клеткам определяется законами диффузии и осмоса), вязкость, рН (для большинства бактерий оптимальна среда с рН, равной 7,2–7,4); быть изотоничной, сбалансированной с высокой буферной емкостью (чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН), иметь соответствующий окислительно-восстановительный потенциал; быть стерильной, быть по возможности унифицированной (содержать постоянные количества отдельных ингредиентов) и, по возможности, прозрачной (чтобы следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами).

Для роста автотрофных бактерий потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов типа CO₂, органических кислот и др.; 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компонентов или для их синтеза в реакциях, требующих затрат энергии. Так, *Escherichia coli* способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются *факторами роста*. Источником ростовых веществ чаще являются дрожжевые экстракты или дрожжевые автолизаты.

1.3 Классификация питательных сред

Выбор питательной среды зависит в значительной степени от целей эксперимента, а существующая классификация питательных сред учитывает характеристику их следующих особенностей.

1. **По составу** питательные среды делятся на *натуральные* и *синтетические*, с химически определенным и неопределенным составом.

Питательная среда с химически определенным составом: состоит только из ингредиентов с четко определенным химическим составом с известной молекулярной структурой и степенью чистоты.

Питательная среда с химически неопределенным составом: состоит полностью или частично из природных веществ, переработанных или нет, химический состав которых определен не полностью.

Натуральными называют среды, которые состоят из продуктов растительного или животного происхождения, имеющих *неопределенный химический состав*. Примерами питательных сред такого типа являются среды, представляющие собой смесь продуктов распада белков (казеина, мышц млекопитающих), образующихся при их гидролизе. Кислотный (HCl) гидролиз белков используется для приготовления полных гидролизатов. Действие ферментов типа трипсина приводит к неполному гидролизу белков, в результате чего образуются *пептоны*. Как правило, на пептонных питательных средах микроорганизмы растут лучше, чем на питательных средах, приготовленных из полных гидролизатов.

К питательным средам неопределенного состава можно отнести и среды, полученные на основе растительного сырья: картофельный агар,

томатный агар, отвары злаков, дрожжей, пивное сусло, настои сена и соломы и др. К числу сред неопределенного состава относят и среды *полусинтетические*. В такую среду вносят известные соединения как явно необходимые; а также добавляют небольшое количество дрожжевого экстракта (или другого природного продукта) для обеспечения потребностей роста. *Основное назначение* таких питательных сред – выделение, культивирование, получение биомассы и хранение культур микроорганизмов.

Синтетические среды – это среды определенного состава, представленные чистыми химическими соединениями, взятыми в точно указанных концентрациях и соотношениях отдельных элементов. Например, для выращивания грибов и дрожжей применяют синтетическую среду Чапека. Обязательными компонентами таких сред являются неорганические соединения (соли) и углерод- и азотсодержащие вещества (глюкоза и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Часто к таким средам добавляют буферные растворы и хелатирующие соединения. *Основное назначение* таких питательных сред – изучение особенностей физиологии и метаболизма микроорганизмов, выделение генетических рекомбинантов и т. д.

2. По назначению среды разделяют на *основные, специальные, элективные, дифференциально-диагностические, комбинированные, консервирующие транспортные*.

К *основным* относятся среды, применяемые для выращивания многих бактерий. Например, это триптические гидролизаты рыбных продуктов или казеина, из которых готовят жидкую среду – питательный бульон и плотную – питательный агар. К ним относят и мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), которые применяют для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, и солодовый агар (СА) – применяют для культивирования дрожжей и микромицетов. Такие среды служат основой для приготовления более сложных питательных сред.

Специальные питательные среды позволяют культивировать микроорганизмы, не размножающиеся на обычных питательных средах. Например, для культивирования стрептококка к средам прибавляют сахар, для пневмококков – сыворотку крови. К специальным средам относятся *среды обогащения*. Примерами являются шоколадный агар, кровяной агар. Эти среды готовятся путем добавления в основную среду дополнительных веществ, таких, например, как кровь, сыворотка или яичный желток. Данные факторы роста стимулируют рост микроорганизмов.

Элективные питательные среды используют для культивирования определенного вида микробов или целой физиологической группы микроорганизмов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов. Среда становится

элективными при добавлении к ним определенных антибиотиков, солей, изменении рН. Например, среда Эшби является селективной для рода *Azotobacter*, в среде Виноградского развиваются только нитрифицирующие бактерии.

Жидкие элективные среды называют *средами накопления* (или *обогащительными средами*), когда их применяют на первом этапе выделения чистой культуры бактерий при получении накопительной культуры. Обогащительные среды подавляют рост комменсальных видов микроорганизмов (тех, которые живут в тесной ассоциации друг с другом) в клиническом образце. Они также применяются для выделения фекальных и почвенных микроорганизмов. Примером такой среды служит пептонная вода с рН, равном 8, когда размножается только холерный вибрион.

Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих компоненты питательной среды.

В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемой бактерии.

К таким средам относятся среды Эндо, Левина, Плоскирева, среды Гисса, которые широко используются для идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Они позволяют дифференцировать патогенные микроорганизмы от кишечной палочки.

Комбинированные питательные среды сочетают в себе элективную среду и дифференциальную среду. Примером таких сред является среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые для выделения патогенных кишечных бактерий с ингибированием роста *E. coli*.

Консервирующие транспортные среды предназначены для сохранения и поддержания жизнеспособности микроорганизмов без возможности существенного размножения в течение времени с момента отбора проб до момента обработки пробы в лаборатории. Применяются для первичной инокуляции и транспортировки патологического материала. Эти среды предупреждают отмирание патогенных микробов и подавляют рост сапрофитов. Примером таких сред являются: среда Стюарта, среда Пайка, глицериновая смесь, фосфатный буфер и др.

Консервирующая среда сохраняет и поддерживает жизнеспособность микроорганизмов в течение длительного времени. При долгосрочном хранении фиксирующая среда защищает микроорганизмы от вредных воздействий (яичная питательная среда Дорсе, меловой мясной бульон).

3. По консистенции среды могут быть *жидкими, полужидкими, твердыми, сыпучими*.

1.4 Приготовление питательных сред

Жидкая питательная среда состоит из водного раствора одного или нескольких компонентов (например, питательный бульон). Жидкие среды в пробирках, колбах или флаконах обычно называют термином «бульон».

Жидкие питательные среды получают при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов. По составу они могут быть как натуральными, так и синтетическими. МПБ является белковой основой всех сред.

Жидкие среды чаще применяют для изучения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Плотная питательная среда, полужидкая питательная среда: они содержат затвердевающие материалы в различных концентрациях. Плотную питательную среду, разлитую по чашкам Петри, обычно называют пластинчатый агар. Плотную питательную среду, разлитую по пробиркам или небольшим флаконам, которые держат в наклонном положении при застывании среды, часто называют *скошенный (косой) агар*. Если среда заполняет дно пробирки, образующийся слой называют столбиком.

Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции.

Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар, желатина, силикагель, каррагенан.

Наиболее распространенным из уплотнителей является *агар*. Он обладает рядом полезных свойств, в частности: 1) способен образовывать в воде гели; 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С; 3) не расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов; 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару; 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности.

Мясо-пептонный агар (МПА) получают путем добавления к МПБ бактериологического агара (1,5–3 %).

Желатина – белок, приготовленный из кожи и костей. В настоящее время используется для специальных целей, поскольку образуемый ею гель плавится при температурах около 25–30 °С. Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами многих микроорганизмов. Уплотняющая концентрация желатины – 17–20 %.

Силикагелем называют двуокись кремния (SiO₂). Среда на основе силикагеля (1,5–2 %) используют для получения культур автотрофных бактерий, так как при этом в среде отсутствуют органические вещества.

Каррагенан («растительная желатина») значительно дешевле агара, используется в концентрации 2 %, не разрушается большинством видов бактерий. Однако разливать приготовленные среды следует при высокой температуре – 55–60 °С.

Плотные среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, изучения морфологии колоний, диагностических целей, для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, хранения чистых культур в музеях, пересылки их на заводы и в ряде других случаев.

Полужидкие среды содержат гелеобразующее вещество в низкой (0,3–0,7 %) концентрации и имеют мягкую желеподобную консистенцию. Такие среды пригодны для хранения культур, изучения подвижности и хемотаксиса клеток, культивирования микроаэрофилов.

Сыпучие среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного сырья (чаще всего, растительного). Основное их назначение – использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса или рисовой водки), сельском хозяйстве (силосование кормов, выращивании грибов), для хранения посевного материала и т. д. К ним относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанные питательным раствором.

1.5 Наиболее используемые питательные среды в бактериологической практике

В бактериологической практике чаще всего используются сухие питательные среды, которые представляют собой порошки или гранулы с влажностью, не превышающей 10 % и легко растворимые в воде. Их получают в промышленных масштабах – это триптические гидролизаты дешевых непищевых продуктов (рыбные отходы, мясокостная мука) и питательный агар. Сухие среды могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке и приготовлении, имеют относительно стандартный состав.

Преимущества гранулированных сухих питательных сред перед порошковой формой: они безопаснее (при работе со средами выделяется меньше пыли; угроза аллергических реакций и вдыхания токсичных веществ почти исключена); точнее (не происходит разделения компонентов и комкования); сокращается время для суспендирования и растворения среды; надежнее (гомогенное распределение содержимого упаковки обеспечено и длительного хранения); имеют больший срок годности.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Определите понятие «питательная среда».
- 2 Какие требования предъявляют к составу питательных сред?
- 3 Охарактеризуйте понятие «факторы роста».
- 4 Перечислите основные подходы в классификации питательных сред. Поясните на примерах классификацию питательных сред.
- 5 Какие вещества используются для получения твердых сред? Укажите их концентрации. Какой из уплотнителей наиболее часто применяется на практике?
- 6 Охарактеризуйте наиболее распространенные питательные среды в бактериологической практике. Перечислите преимущества гранулированных форм сухих питательных сред перед порошковой формой.

Практическое занятие 1

Цель: Ознакомление с наиболее часто употребляемыми питательными средами, их составом, назначением, техникой приготовления.

Ход работы

1 Изучить составы ниже приведенных питательных сред, записать в рабочую тетрадь название сред и их компоненты. Охарактеризовать каждую из них согласно классификации: по составу (натуральная, полусинтетическая, синтетическая; определенного, неопределенного состава), назначению (основная, элективная, дифференциально-диагностическая), консистенции (жидкая, полужидкая, плотная) – перечисленные характеристики записать в скобках после прописи каждой среды. В составе тех питательных сред, где концентрация соединений указана в процентах (%), в скобках укажите количество в граммах (г).

Среда 1. Среда М 9 (основа для культивирования почвенных бактерий), г/л: Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4. pH – 7,2.

Среда 2. Среда Емцева В.Т., г/л: картофельный отвар – 500 мл, морковный отвар – 500 мл, глюкоза – 20, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5, NaCl , $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – следы, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 0,02 мл, CaCO_3 – 40, агар – 6.

Среда 3. Среда Бейеринка (для азотобактерий), г/л: вода водопроводная, маннит – 20, K_2HPO_4 – 0,2, CaCO_3 – 5, смесь микроэлементов по Федорову – 1 мл, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2.

Среда 4. Среда Эшби, г/л: маннит – 20, K_2HPO_4 – 0,2, CaCO_3 – 5, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, агар – 20.

Среда 5. Для тионовых бактерий, г/л: дистиллированная вода, Na_2SO_3 – 5, NaHCO_3 – 1, K_2HPO_4 – 0,2 г, NH_4Cl – 0,1, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1.

Среда 6. Крахмально-аммиачный агар (КАА) (для актиномицетов), г/л: дистиллированная вода, крахмал растворимый – 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 1, NaCl – 1, CaCO_3 – 3, агар – 20.

Среда 7. Среда Чапека (для микромицетов), г/л: дистиллированная вода, сахароза – 20, NaNO_3 – 2, K_2HPO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, KCl – 0,5, CaCO_3 – 3, агар – 20.

Среда 8. Среда Фреда (для выделения клубеньковых бактерий), г/л: дистиллированная вода, маннит – 10, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,2, NaCl – 0,1, CaCO_3 – 3, дрожжевая вода – 100 мл, агар – 15.

Среда 9. Бобовый агар (для выделения клубеньковых бактерий), г/л: бобовый отвар – 1000 мл, сахароза – 2, K_2HPO_4 – 1, MgSO_4 – 0,3, агар – 15.

Среда 10. Капустный агар с мелом, г/л: капустный бульон – 900 мл, дрожжевой экстракт – 100 мл, пептон – 10, глюкоза – 20, ацетат натрия – 3,35, MnSO_4 – 0,025, агар – 15.

Среда 11. Пептонный агар, г/л: пептон – 5, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,5, NaCl – следы, вода водопроводная, агар – 15.

Среда 12. Для выделения культур *Clostridium*, г/л: KH_2PO_4 – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,5, NaCl – 0,5, вода водопроводная, глюкоза – 20, пептон – 5, CaCO_3 – 10. pH – 7.

Среда 13. Мясопептонный бульон (для культивирования широкого круга микроорганизмов), г/л: мясная вода, NaCl – 0,5 %.

Среда 14. Для выделения культур актиномицетов, г/л: крахмал растворимый – 20, KNO_3 – 1, K_2HPO_4 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, NaCl – 0,5, FeSO_4 – следы, вода водопроводная. pH 7,2–7,3.

Среда 15. Для выделения микроорганизмов, растворяющих фосфаты кальция, г/л: глюкоза – 10, аспарагин – 1, K_2SO_4 – 0,2, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, дрожжевой экстракт – 0,02, агар – 15, вода водопроводная, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,33, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,38.

Среда 16. Для выделения культур микобактерий, г/л: NH_4Cl – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0,2, CaCO_3 – 0,2, вода водопроводная.

Среда 17. Для выделения культур лактобацилл, г/л: гидролизат казеина – 10, мясной экстракт – 10, дрожжевой экстракт – 5, глюкоза – 20, ацетат натрия – 5, цитрат аммония – 2, K_2HPO_4 – 2, MgSO_4 – 0,2, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, вода дистиллированная.

Среда 18. г/л: пептон ферментативный – 2, NaCl – 2, K_2HPO_4 – 0,3, агар – 0,5 %. pH – 7,2.

Среда 19. Среда Гисса: в дистиллированную воду добавляют 1 % пептона, 0,5 % NaCl , 1 % K_2HPO_4 и индикатор (например, Андрее 1 % или бромкрезоловый пурпурный 1,6 % в количестве 0,01 мл на 100 мл среды Гисса). pH – 7,2. Среду уплотняют добавлением 0,5 % агара.

Среда 20. среда Кларка: к 80 мл дистиллированной воды добавляют по 0,5 г пептона, глюкозы и K_2HPO_4 , подогревают и фильтруют.

Среда 21. При идентификации представителей семейства *Enterobacteriaceae*, %: пептон – 2, глюкоза – 0,1, лактоза – 1, сахароза – 1, железо(II)-аммоний сульфат – 0,02, NaCl – 0,5, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (тиосульфат) – 0,03, феноловый красный – 0,0025, агар – 1,5.

Среда 22. г/л: пептон – 5, мясной экстракт – 5, бромкрезоловый пурпурный 1,6 % раствора – 0,625 мл, крезоловый красный 0,2 % раствора – 2,5 мл, глюкоза – 0,5 г, пиридоксаль – 0,5. pH среды – 6.

Среда 23. Среда, г/л: дрожжевой экстракт – 3, фенилаланин – 2, Na_2HPO_4 – 1, NaCl – 5, агар – 12.

Среда 24. г/л: глюкоза – 20, K_2HPO_4 – 1, MgSO_4 – 0,5, NaCl – 0,5, KNO_3 – 1, агар – 15. pH – 7,1–7,2.

Среда 25. среда Эшби, г/л: маннит – 20, K_2HPO_4 – 0,2, MgSO_4 – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, CaCO_3 – 5, агара – 15. pH 7,1–7,2.

Среда 26. Среда Кинга А (для образования пиоцианина), %: бактопептон – 2 %, глицерин – 1 %, K_2SO_4 (безв.) – 1 %, MgCl_2 – 0,14 %, агар – 1,5 %, вода дистиллированная. pH – 7,2.

Среда 27. Среда Кинга В (для образования флюоресцеина), %: пептон – 2 %, глицерин – 1 %, K_2HPO_4 (безв.) – 0,15 %, MgSO_4 – 0,15 %, агар – 1,5 %, вода дистиллированная. pH – 7,2.

Среда 28. Среда Нахимовской (%): сахароза или маннит – 2, K_2PO_4 – 0,02, MgSO_4 – 0,02, NaCl – 0,02, K_2SO_4 – 0,01, CaCO_3 – 0,5, агар – 2, пептон ферментативный – 0,2, вода дистиллированная. pH – 7,2.

Среда 29. Среда Петренко (%): пептон ферментативный – 2, глицерин – 2, K_2SO_4 – 2, MgCl_2 – 0,7, агар – 2, вода дистиллированная. pH – 7.

Среда 30. (г/л): Na_2HPO_4 – 24, KH_2PO_4 – 12, NaCl – 2, NH_4Cl – 4, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5. pH – 7,2.

2 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

2.1 Способы культивирования культуры тканей растений.

2.2 Питательные среды, требования, подходы в приготовлении.

2.3 Влияние фитогормонов на направление морфогенеза в культуре клеток растений.

2.1 Способы культивирования культуры тканей растений

Культуру тканей растений выращивают двумя способами:

1) поверхностным – на различных гелеобразующих или иной природы подложках;

2) в жидкой питательной среде.

В свою очередь, известны два способа культивирования тканей в жидкой питательной среде:

1) накопительное;

2) непрерывное.

2.2 Питательные среды, требования, подходы в приготовлении

Одним из важнейших факторов, определяющих рост и морфогенез растительных тканей в культуре (а тем самым создания эффективной биотехнологической системы), является **состав питательной среды**. Основные потребности культивируемых клеток в питательных веществах растительных клеток очень похожи на потребности целых растений.

2.2.1 Компоненты среды

Среды для культивирования растительных тканей и клеток обычно состоят из некоторых или всех следующих компонентов: макро- и микроэлементы, источники железа, витамины, аминокислоты или другие азотные добавки, сахара, другие неопределенные органические добавки, затвердевающие агенты или поддерживающие системы, регуляторы роста.

Начиная работать с новым объектом, исследователи модифицируют состав стандартных (основных) сред, особенно набор и концентрацию органических компонентов и фитогормонов.

В настоящее время наибольшее распространение получили следующие питательные среды: среда Уайта, среда Мурасиге и Скуга (среда MS), среда Гамборга и Эвелеге (B5), среда Шенка и Хильдсбрандта (среда SH), среда Нича (среда N6), среда Lloyd and McCown (среда WPM). Среда MS, SH, B-5 отличаются высоким содержанием макроэлементов, чем классические составы растительных сред Кнопа или Уайта.

Среды на основе MS обычно используются для культивирования растительных тканей и доказали свою эффективность для стимуляции роста как однодольных, так и двудольных растений. С момента первоначальной рецептуры 1962 года было разработано множество модификаций среды MS. Несмотря на то, что среда MS изначально была разработана для каллусогенеза табака, при правильной оптимизации базальные соли MS будут поддерживать инициацию и рост каллуса (каллусная ткань – один из видов клеточной дифференцировки, возникает путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток органов растения), рост клеточных суспензий, соматический эмбриогенез и регенерацию побегов многих видов растений.

2.2.2 Макроэлементы

Макроэлементы – это шесть основных элементов: азот (N), фосфор (P), калий (K), кальций (Ca), магний (Mg) и сера (S), необходимые для роста клеток и тканей растений. Оптимальная концентрация каждого питательного вещества для роста существенно различается у разных видов.

Растительные клетки могут расти только на нитратной форме азота, но лучшие результаты достигаются, если среда содержит как нитратный, так и аммонийный азот. Когда нитратные и аммонийные источники азота используются совместно в культуральной среде, ионы аммония будут использоваться быстрее и раньше нитрат-ионов.

Калий необходим для роста клеток большинства видов растений. Большинство сред содержат K в виде нитратной или хлоридной солей в концентрации 20–30 мкМ. Оптимальные концентрации P, Mg, S и Ca находятся в пределах 1–3 мкМ при соблюдении всех остальных требований, необходимых для роста клеток.

2.2.3 Микроэлементы

К основным микроэлементам относятся железо (Fe), марганец (Mn), цинк (Zn), бор (B), медь (Cu) и молибден (Mo). Хелатные формы железа и цинка обычно используются для приготовления культуральных сред.

Кобальт (Co) и йод (I) также могут быть добавлены в некоторые среды, однако строгие требования к росту клеток для этих элементов не установлены. Натрий (Na) и хлор (Cl) также используются в некоторых средах, но не являются необходимыми для роста клеток. Медь и кобальт обычно добавляют в культуральные среды в концентрации 0,1 мкМ, Fe и Mo – 1 мкМ, I – 5 мкМ, Zn – 5–30 мкМ, Mn – 20–90 мкМ, B – 25–100 мкМ.

2.2.4 Источник углерода и энергии

Углеводы должны поступать в культуральную среду, поскольку выделено мало линий растительных клеток, которые полностью автотрофны.

В качестве источника углерода при выращивании гетеротрофных культур (калусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20–60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза – наиболее предпочтительный углевод), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и другие). Полисахариды в питательных средах практически не используются.

2.2.5 Витамины

Витамины необходимы растениям в качестве катализаторов различных метаболических процессов. Когда клетки и ткани растений выращиваются *in vitro*, некоторые витамины могут стать лимитирующими факторами для роста клеток. Витамины, наиболее часто используемые в средах для выращивания клеток и тканей, включают тиамин (B₁), никотиновую кислоту, пиридоксин (B₆) и мезоинозит.

Тиамин – это единственный витамин, который необходим всем клеткам для роста. Обычно тиамин используется в концентрациях от 0,1 до 10,0 мг/л. Никотиновая кислота и пиридоксин часто добавляются в культуральные среды, но они не являются необходимыми для роста клеток многих видов. Никотиновая кислота обычно используется в концентрациях 0,1–5,0 мг/л; пиридоксин – в концентрации 0,1–10,0 мг/л.

Мезоинозит входит в состав многих растворов витаминов. Мезоинозит обычно используется в средах для культивирования клеток и тканей растений в концентрациях 50–5 000 мг/л.

Другие витамины, такие как биотин, фолиевая кислота, аскорбиновая кислота, пантотеновая кислота, витамин E (токоферол), рибофлавин и витамин B₁₀ включены в состав некоторых сред для культивирования клеток. Эти витамины обычно добавляют в среду культивирования в случаях, когда необходимо выращивать клетки при низкой плотности популяции.

2.2.6 Аминокислоты или другие азотные добавки

Хотя культивируемые клетки способны синтезировать все необходимые аминокислоты, добавление некоторых из них может быть использовано для дополнительной стимуляции клеток, в частности, для создания культур протопластов.

Наиболее распространенными источниками органического азота, используемыми в культуральных средах, являются смеси аминокислот (например, в гидролизате казеина) L-глутамина, L-аспарагина и аденина. Гидролизат казеина используется в концентрации от 0,05 до 0,1 %.

Тирозин был использован для стимуляции морфогенеза в клеточных культурах, но его следует применять только в агаровой среде. Добавление в культуральную среду аденинсульфата может стимулировать рост клеток и значительно усилить образование побегов.

2.2.7 Неопределенные органические добавки

Добавление в культуральную среду разнообразных органических экстрактов часто приводит к благоприятной реакции тканей. В число протестированных добавок входят гидролизаты белка (0,02–0,1 %), кокосовое молоко (5–20 %), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (0,1–1 %), поскольку они содержат цитокинины), дрожжевые экстракты (0,1–0,2 %), солодовые экстракты (5–10 %), измельченный банан, апельсиновый, березовый и томатный соки (5–20 %). Однако, неопределенные органические добавки следует использовать только в крайнем случае.

Иногда в питательную среду добавляют поливинилирролидон (5–10 г/л), различные антиоксиданты: аскорбиновую кислоту (1 мг/л), восстановленный глутатион (4–5 мг/л), дитиотрейтол (1–3 мг/л).

Благоприятный эффект может оказать добавление в культуральную среду активированного угля (АУ). Эффект от применения активированного угля объясняется одним из трех факторов: абсорбцией ингибирующих соединений (например, фенольных), поглощением регуляторов роста из культуральной среды или потемнением среды.

2.2.8 Затвердевающие агенты или вспомогательные системы

Агар – наиболее часто используемый желирующий агент при приготовлении полутвердых сред для культивирования растительных тканей.

Твердость агарового геля зависит от концентрации и марки агара, используемого в культуральной среде, а также от рН. Концентрация агара составляет 0,5–1,0 %.

Реже в качестве подложки для культуры тканей растений испытывают и другие гелеобразующие вещества: силикагели, биогели, полиакриламидные гели, пенополиуретан и др.

Альтернативные методы поддержки включают использование перфорированного целлофана, мостиков из фильтровальной бумаги, пенополиуретана и полиэфирного флиса. Зависит от вида растения, где лучше всего экспланты (эксплант – фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса; эксплантами могут быть: листья или их фрагменты, однопочечные сегменты побегов, верхушки побегов, сегменты междоузлий, пыльники и т. д.) растут: на агаре или на других поддерживающих агентах.

2.2.9 Регуляторы роста

В культуре растительных тканей важны четыре широких класса регуляторов роста: ауксины, цитокинины, гиббереллины и абсцизовая кислота.

Ауксины, протестированные на культуре растительных клеток, обычно используются в концентрации от 0,01 до 10,0 мг/л. К широко используемым в средах ауксином относятся: β -индолил-3-уксусная кислота (ИУК), индолил-3-масляная кислота (ИМК), 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д) и нафтилуксусная кислота (НУК).

Ауксины обычно включают в культуральную среду для клеточной дедифференцировки, тем самым стимулируя образование каллуса, деление и рост клеток, для инициации побегов, особенно корней, а также для стимуляции роста культур из верхушек побегов.

В качестве цитокининов искусственные питательные среды могут содержать 6-бензиламинопурин или 6-бензиладенин (БАП, БА), 6- γ - γ -диметиламинопурин (2iP), 6-фурфуриламинопурин (кинетин) и 2-метил-4-(7H-пурин-6-иламино)бут-2-ен-1-ол (зеатин) в концентрациях 0,001–10 мг/л, тидиазурон (TDZ) – в концентрациях 0,0005–1,0 мг/л. Зеатин и 2iP считаются цитокининами природного происхождения, а БАП и кинетин – синтетическими цитокининами. БАП и зеатин более активны по сравнению с кинетином в индукции органогенеза. Тидиазурон, не являясь цитокинином, обладает высокой цитокининовой активностью.

Цитокинины могут индуцировать деление клеток, стимулировать пролиферацию пазушных и придаточных побегов, регулировать дифференцировку, ингибировать корнеобразование, активировать синтез РНК и стимулировать активность белков и ферментов.

Гиббереллины (ГК₃) и абсцизовая кислота (АК) – два регулятора роста, которые не являются обязательными, но в некоторых случаях они стимулируют рост изолированной ткани. Как правило, ГК₃ добавляют в культуральные среды для стимулирования роста клеточных культур низкой плотности, для усиления роста каллуса и для удлинения карликовых или отстающих в росте проростков. Абсцизовая кислота обычно добавляется в культуральную среду для ингибирования или стимуляции роста каллуса, для усиления пролиферации побегов или почек и для ингибирования пролиферации почек.

2.2.10 Антибиотики

Антибиотики (карбенициллин, цефотаксим, канамицин, аугментин, рифампицин, тетрациклин и др.) оказались полезными в борьбе с микробным загрязнением культур растительных тканей. Тем не менее, антибиотики не могут заменить соответствующие асептические методы. Как правило, микроорганизмы, присутствующие внутри растений, должны быть уничтожены с помощью культуры меристемы. В побеговых культурах древесных растений комбинации нескольких антибиотиков более эффективны, чем любой из них, применяемый по отдельности. Многие антибиотики токсичны для определенных видов растений или тканей, поэтому выбранный антибиотик должен быть протестирован для данного применения и желаемой концентрации перед широкомасштабным использованием. При микроклональном размножении не рекомендуется рутинное (постоянное) применение антибиотиков в составе питательных сред.

2.2.11 Стоковые растворы

Различные фирмы производят готовые питательные среды для культивирования клеток и тканей растений. Такие среды удобно использовать в промышленных лабораториях. Однако в научных исследовательских лабораториях часто приходится готовить среды из отдельных компонентов и соединений.

Стоковый (маточный) раствор – заранее приготовленный концентрированный раствор, который разбавляется для нормального применения и используется многократно.

Использование стоковых растворов позволяет сократить количество повторяющихся операций при приготовлении среды и, следовательно, вероятность человеческой или экспериментальной ошибки. Кроме того, некоторые компоненты в стоковых растворах более стабильны и могут храниться дольше, чем более разбавленные растворы.

Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем сливают и доводят до нужного объема бидистиллированной водой, при этом перемешивая. В смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена, а в макросоли – раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка). В конце работы следует промаркировать колбу с указанием названия раствора, даты приготовления и срока годности.

Маточные растворы макроэлементов могут быть приготовлены в 10-кратной концентрации рабочей среды; их можно хранить в течение нескольких недель в холодильнике при температуре +2–+4°C.

Маточные растворы микроэлементов обычно готовятся в 100–1 000-кратном объеме от конечной концентрации. Рекомендуется хранить запасы микроэлементов в холодильнике или морозильной камере до 1 года без заметного ухудшения качества. Маточный раствор хелата железа готовят и хранят отдельно от других солей в янтарной бутылке. Неправильное приготовление хелатного железа может привести к выпадению в осадок после автоклавирования фосфатов кальция и магния.

Концентрированные растворы витаминов готовят каждый отдельно путем растворения соответствующих навесок в дистиллированной воде. Они готовятся в 100–1 000-кратном объеме от конечной концентрации и хранятся в морозильной камере (–20 °С) до момента использования.

Фитогормоны, как правило, плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 10 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5–1 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5–1 н HCl или KOH (цитокнины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 10 мл объема бидистиллированной водой (1 мл содержит 1 мг гормона).

Маточные растворы ауксинов и цитокининов обычно готовятся в 100–1 000-кратных конечных концентрациях. Ауксины НУК и 2,4-Д, а также цитокинины считаются стабильными и могут храниться при температуре +4 °С в течение нескольких месяцев либо их хранят при –20 °С.

Некоторые препараты, например, ИУК, должны готовиться и храниться в янтарных бутылках для предотвращения фоторазложения.

Антибиотики хранят в холодильнике или в морозильной камере. На этикетках сосудов с антибиотиками обычно указывается активность (действующее вещество на количество порошка) продукта в мкг/мг или ЕД/мг порошка. Для большинства антибиотиков 1 ЕД равна 1 мкг.

Большинство антибиотиков являются термолабильными и должны быть стерилизованы мембранными фильтрами.

Хранение стоковых растворов. Для удобства многие лаборатории готовят исходные растворы и затем делят их на аликвоты (*аликвота* – это небольшое количество вещества в растворе точно известного объема), достаточные для приготовления от 1 до 10 л среды; эти аликвоты хранятся в небольших пробирках в морозильной камере. Такая процедура избавляет от неудобств, связанных с необходимостью размораживать большой объем замороженной массы при каждом приготовлении среды.

2.3 Влияние фитогормонов на направление морфогенеза в культуре клеток растений

Морфогенез in vitro у растений – сложный процесс формообразования, то есть заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей *in vitro*.

В основе большинства морфогенетических моделей растений *in vitro* лежит свойство *тотипотентности* растительных клеток. Под ним подразумевается способность растительной клетки при определённых условиях вторично дифференцироваться и под влиянием внешних условий выбрать тот или иной путь морфогенеза.

Несмотря на многолетнюю историю существования культуры клеток и тканей, многочисленные разработки методик по реализации различных морфогенетических путей не всегда приемлемы к конкретным объектам.

В культуре клеток растений существуют различные типы морфогенеза: соматический эмбриогенез и органогенез, который, в свою очередь, подразделяется на стеблевой, корневой и флоральный. При соматическом эмбриогенезе из каллусных клеток формируются биполярные зародышеподобные структуры, у которых развиваются стебелек и корешок. В случае стеблевого органогенеза образовавшийся побег пересаживают на среду с повышенным содержанием ауксинов. Если же морфогенез пошел по типу корневого органогенеза, то получить из корней побеги не удастся.

Индуктировать морфогенез в культуре каллусной ткани можно с помощью различных факторов: света, температуры, состава питательной среды, и в первую очередь – изменения соотношения фитогормонов.

Тип морфогенеза, происходящего в культуре растительной ткани, в значительной степени зависит от соотношения и концентрации ауксинов и цитокининов в среде. В 1955 г. Скуг и Миллер, при работе с культурой *in vitro* табака, предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна как *правило Скуга-Миллера*: соотношение ауксина и цитокинина определяет тип и степень органогенеза в культуре растительных клеток (рисунок 1).

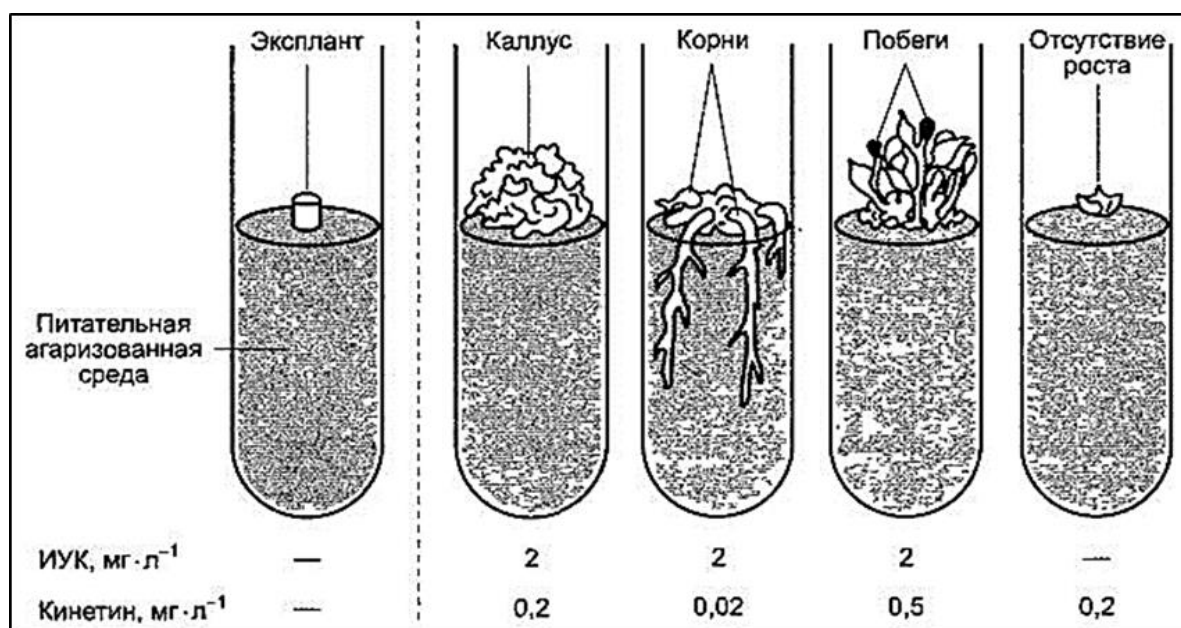


Рисунок 1 – Влияние различного соотношения ИУК и кинетина в питательной среде на направление морфогенеза в культуре *in vitro* табака

Если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется каллус; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно матовые, компактные, структурированные, имеют зеленые хлорофиллсодержащие участки, которые представляют собой зоны морфогенеза. Впоследствии там формируются побеги или растения-регенеранты. Рыхлые каллусы либо совсем не способны к органогенезу, либо формируют только корни. Появление корней свидетельствует о сдвиге гормонального баланса в сторону ауксинов, что препятствует образованию побегов.

Иногда для образования каллусной ткани *in vitro* и ее роста достаточно одного ауксина, который активизирует деление и растяжение клеток. Предполагается, что поступление ауксина в клетку способствует усилению секреции кислых гидролаз и полисахаридов, необходимых для дальнейшего роста клеточных стенок. Все это приводит к значительному ускорению темпов размножения клеток. В цикле выращивания каллусной ткани, клетки после ряда делений приступают к росту растяжением, дифференцируются как зрелая каллусная ткань и деградируют. Для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус

переносят на свежую питательную среду через 28–30 дней, то есть проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани (*субкультивирование* – процесс пересева культуры или ее части в другой культуральный флакон с заменой среды культивирования). Часто для успешного культивирования следует применять более низкие концентрации регуляторов роста, чем при получении каллуса.

В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов может быть снижено или они могут быть полностью исключены. На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим классам гормонов или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать гормоны.

Существует значительная вариабельность между родами, видами и даже сортами растений по типу и концентрации ауксинов и цитокининов, а также по соотношению этих групп фитогормонов, необходимых для индукции морфогенеза.

Вопросы для самоконтроля

1 Перечислите наиболее распространенные питательные среды для культивирования растений.

2 Приведите доказательства эффективного использования среды МС в качестве основной для культивирования *in vitro* тканей многих видов растений.

3 Какие основные компоненты входят в состав питательных сред, и какие функции они выполняют в культуре клеток и тканей растений *in vitro*?

4 Дайте определение понятию «эксплант».

5 Охарактеризуйте представителей следующих компонентов среды: макроэлементы, микроэлементы, источники углерода и энергии, витамины, аминокислоты, неопределенные органические добавки, желирующие агенты или иные вспомогательные системы, фитогормоны, антибиотики.

6 Определите понятие «стоковые растворы». Обоснуйте их применение в научных исследовательских лабораториях.

7 Опишите технологию приготовления стоковых растворов, их хранение.

8 Дайте определение правила Скуга-Миллера в отношении морфогенеза *in vitro* у растений. Поясните на примере его суть.

Практическое занятие 2

Цель: ознакомление с компонентами питательных сред для культивирования клеток растений, подходами в их приготовлении, влиянием фитогормонов на направление морфогенеза в культуре *in vitro*.

Ход работы

- 1 Дайте письменные ответы в тетради на вопросы для самоконтроля.
- 2 При приготовлении среды, напишите, в какой последовательности будете вносить макроэлементы в раствор (см. таблицу 1 или таблицу 2).
- 3 Запишите в тетрадь состав питательных сред (по выбору: таблица 1 или таблица 2).

Таблица 1 – Состав индукционной питательной среды для формирования *in vitro* морфогенного каллуса из зрелых зародышей пшеницы

Компоненты	мг/л	Компоненты	мг/л
NH ₄ NO ₃	1 650	Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	27,8
KNO ₃	1 900	Na ₂ ЭДТА x 2H ₂ O	37,3
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	Тиамин - HCl	0,5
MgSO ₂ x 7H ₂ O	370	Пиридоксин - HCl	0,5
KH ₂ PO ₄	170	Никотиновая кислота	0,5
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	Мезоинозит	100
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	Сахароза	30 000
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	Глицин	2,0
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	Кинетин	0,2
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	2,4-Д	2,0
H ₃ BO ₃	6,2	Агар	7 000

Таблица 2 – Состав питательной среды для регенерации *in vitro* растений пшеницы в морфогенном каллусе

Компоненты	мг/л	Компоненты	мг/л
NH ₄ NO ₃	1 650	Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	27,8
KNO ₃	1 900	Na ₂ ЭДТА x 2H ₂ O	37,3
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	Тиамин - HCl	0,5
MgSO ₂ x 7H ₂ O	370	Пиридоксин - HCl	0,5
KH ₂ PO ₄	170	Никотиновая кислота	0,5
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	Мезоинозит	100
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	Сахароза	30 000
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	Глицин	2,0
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	Кинетин	0,2
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	H ₃ BO ₃	6,2
Агар	7 000		

- 4 Представлен перечень химических соединений: NH₄NO₃, KNO₃, CuSO₄ x 5H₂O, Na₂MoO₄ x 2H₂O, CaCl₂ x 2H₂O, канамицин, ИУК, зеатин, MgSO₂ x 7H₂O, KH₂PO₄, глюкоза, глицин, цефотаксим, БАП, мезоинозит,

MnSO₄ x 4H₂O, тидиазурон, CoCl₂ x 6H₂O, 2,4-Д, ZnSO₄ x 7H₂O, пиридоксин-HCl, сахароза, тетрациклин, зеатин, глицин, Fe₂SO₄ x 7H₂O, Na₂ЭДТА x 2H₂O, тиамин-HCl, никотиновая кислота, кинетин, аугментин.
 Распределите соединения по группам, заполнив таблицу 3.

Таблица 3 – Представители основных компонентов культуральных сред

Группы	Химические соединения
макроэлементы	
микроэлементы	
углеводы	
витамины и органические добавки	
источник железа	
фитогормоны	
антибиотики	

5 Решите задачу. Fe-хелат состоит из FeSO₄ x 7 H₂O + трилон Б (его химическая формула: C₁₀H₁₂FeN₂NaO₈) в эквимольных количествах. Рассчитайте, сколько необходимо для приготовления Fe-хелата добавить:

- FeSO₄ x 7 H₂O, если трилон Б добавлен в количестве 1 490 мг?
- трилона Б, если FeSO₄ x 7 H₂O добавлен в количестве 1 114 мг?

Распишите процесс решения задачи с пояснениями и расчеты.

6 Решите задачу: Имеются три группы исследователей. Они изучают влияние на клетку (ткани, организм) тяжелых металлов. В опыте исследуется влияние *ионов свинца*. Но каждая из трех групп исследователей имеет только одну соль свинца: сульфат свинца PbSO₄, нитрат свинца Pb(NO₃)₂, ацетат свинца Pb(CH₃COO)₂.

Необходимо определить концентрации разных солей, чтобы данные трех лабораторий можно было сравнивать друг с другом. Для этого рассчитайте, сколько необходимо добавить на 1 л воды солей PbSO₄, Pb(NO₃)₂, Pb(CH₃COO)₂, чтобы концентраций ионов свинца составляла 1 мкМ, 10 мкМ, 1 000 мкМ. Подробно распишите с пояснениями процесс решения задачи и расчеты.

7 При культивировании клеток *Datura tatula* была предложена питательная среда, содержащая микроэлементы, фитогормоны, источники углерода и углеводов. Достаточно ли этих компонентов, если целью является усиление индукции деления клетки для увеличения выхода целевого продукта?

8 Поясните значение тотипотентности при получении лекарственного сырья растительного происхождения.

9 Цель работы – изучить влияние разных соотношений ауксинов и цитокининов в питательной среде на направление морфогенеза в культуре клеток табака. Примените правило Скуга-Миллера.

Результаты оформить в виде таблицы 4, представленной ниже.

Таблица 4 – Направление морфогенеза в культуре клеток табака

№ п/п	Концентрация фитогормонов впитательной среде MS, мг/л		Морфогенетическая реакция (ответ представить в виде рисунка (рисунок 1))
	ИУК	БАП	
1	–	–	
2	2	0,2	
3	2	0,02	
4	2	0,5	
5	–	0,2	
6	2	2	
7	2	–	
8	–	2	

Сделать вывод о влиянии фитогормонов на направление морфогенеза в культуре клеток табака, а также морфогенетической способности каллусных тканей в зависимости от продолжительности культивирования. Вывод записать в тетрадь.

3 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

- 3.1 Введение в культуру клеток животных.
- 3.2 Основные требования к питательной среде.
- 3.3 Типы сред для клеточных культур.

3.1 Введение в культуру клеток животных

Культура клеток животных – это метод, при котором изолированные клетки выращивают в благоприятной искусственной среде. Метод культивирования клеток животных *in vitro* аналогичен культуре растительных тканей и микробной культуре. Но обращаться с клетками животных необходимо осторожно по сравнению с клетками растений и микробов: клетки млекопитающих оказываются более нежными и более восприимчивыми к механическим повреждениям; они имеют меньшую скорость роста и нуждаются в более сложных питательных средах вместе со специальными субстратами.

Выбор подходящей питательной среды для культивирования клеток *in vitro* является важным и необходимым шагом. Клетки органа в организме млекопитающих получают питательные вещества из системы кровообращения.

Для культивирования этих клеток *in vitro* предполагается, что они должны быть обеспечены компонентами, аналогичными тем, которые присутствуют в крови. В целом, выбор среды в основном зависит от типа культивируемых клеток и цели культивирования (рост, дифференцировка и производство желаемых продуктов).

Минимальные критерии к составу питательных сред:

- среда должна иметь сбалансированный химический состав и снабжать клетки всеми питательными веществами;
- поддерживать физиологический рН около 7,0 с достаточной буферизацией;
- среда должна быть стерильной и изотонической по отношению к клеткам.

Существуют две основные системы выращивания клеток в культуре: монослой на искусственном субстрате (т. е. *адгезивная культура*) или свободно плавающие в питательной среде (*суспензионная культура*). Большинство клеток, полученных от позвоночных, за исключением гемопоэтических клеточных линий и некоторых других, зависят от якорения и должны быть культивированы на подходящем субстрате, который специально обработан для обеспечения клеточной адгезии и распространения.

3.2 Основные требования к питательной среде

3.2.1 Питательные компоненты

Клетки нуждаются в основных питательных условиях для роста *in vitro*, в том числе:

Аминокислоты. Аминокислота является сырьем для синтеза белка клеткой. Все клетки нуждаются в двенадцати незаменимых L-аминокислотах. Кроме того, глютамин также относится к компонентам, важным для процесса клеточного метаболизма. Азот, содержащийся в глютаmine, является не только источником пурина и пиримидина нуклеиновой кислоты, но и необходимым материалом для работы цикла лимонной кислоты при гликолизе.

Моносахарид. Большинство питательных сред содержат глюкозу, которая служит важным источником энергии. Глюкоза расщепляется при гликолизе с образованием пирувата/лактата. Эти соединения при

дальнейшем метаболизме вступают в цикл лимонной кислоты и окисляются до CO_2 . Кроме того, гексоза используется для синтеза некоторых аминокислот, жиров и нуклеиновых кислот.

Витамины. Витамины в основном действуют как кофакторы для многих ферментов в процессах клеточного метаболизма. Биотин, фолат, никотинамид, пантотеновая кислота, пиридоксин, рибофлавин, тиамин и витамин B_{12} являются важными компонентами питательной среды.

Неорганические ионы и микроэлементы. Помимо некоторых основных элементов (включая натрий, калий, кальций, магний, азот и фосфор), для роста клеток необходимы некоторые микроэлементы, такие как молибден, ванадий, железо, цинк и селен, медь, марганец.

Соли, присутствующие в различных средах, в основном содержатся в сбалансированных солевых растворах (BSS Игла и BSS Хэнка). Соли вносят свой вклад в образование катионов (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} и т. д.) и анионов (Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) и в основном отвечают за поддержание осмоляльности. Существуют и другие важные функции некоторых ионов, выполняемых солями:

- ионы Ca^{2+} необходимы для клеточной адгезии в сигнальной трансдукции, а также для их участия в клеточной пролиферации и дифференцировке;
- ионы Na^+ , K^+ и Cl^- регулируют мембранный потенциал;
- ионы PO_4^{3-} , SO_4^{2-} и HCO_3^- участвуют в поддержании внутриклеточного заряда; помимо этого, они служат предшественниками для производства некоторых важных соединений, например, PO_4^{3-} необходим для синтеза АТФ.

Гормоны и факторы роста. Для сред с сывороткой добавление гормонов и факторов роста обычно не требуется. Их часто добавляют в безсывороточные среды. Некоторые гормоны оказывают стимулирующее влияние на рост различных типов клеток. Например, инсулин может способствовать использованию глюкозы и аминокислот в клетке.

Антибиотики. В первые годы питательные среды неизменно содержали антибиотики для уменьшения контаминации культур. Наиболее часто используемыми антибиотиками были ампициллин, пенициллин, гентамицин, эритромицин, канамицин и тетрациклин. С улучшением асептических условий в современных лабораториях культивирования тканей добавление антибиотиков минимизировано. Применение антибиотиков связано с несколькими недостатками:

- возможностью развития устойчивых к антибиотикам клеток в культуре;
- могут вызывать антиметаболические эффекты и препятствовать пролиферации;

- возможностью временного сокрытия нескольких инфекций;
- может способствовать плохим асептическим условиям.

Рекомендовано для рутинного культивирования клеток антибиотиками не добавлять. Тем не менее, они могут быть использованы при получении первичных культур.

Другие органические добавки. Для поддержания культур в среде обычно добавляют несколько дополнительных органических соединений. К ним относятся определенные белки, пептиды, липиды, нуклеозиды и промежуточные продукты цикла лимонной кислоты. Для сред, не содержащих сыворотки, добавки с этими соединениями очень полезны. В ряд сред в качестве криоконсерванта добавляют ДМСО (диметилсульфоксид), который предотвращает повреждение клеток.

3.2.2 Физико-химические свойства питательных сред

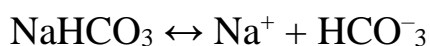
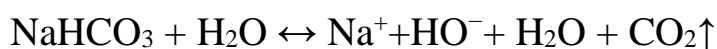
Для того, чтобы способствовать хорошему росту и пролиферации культивируемых клеток, питательная среда должна обладать определенными физико-химическими свойствами. Рассмотрим их.

рН и буферность. Большинство клеток могут развиваться в диапазоне рН, равном 7,0–7,4, но есть незначительные различия в зависимости от типа клеток.

Питательная среда должна иметь некоторую *буферную емкость*. Основным веществом, вызывающим изменение рН, является CO_2 , образующийся в процессе клеточного метаболизма. В герметичной среде CO_2 может объединяться с H_2O для получения угольной кислоты и, таким образом, снижать значение рН среды. Как видно ниже, CO_2 в среде встречается в виде угольной кислоты (H_2CO_3), а также в виде ионов бикарбоната (HCO_3^-) и H^+ :



Концентрации CO_2 , HCO_3^- и рН взаимосвязаны, что очевидно из приведенного выше уравнения. рН будет снижен за счет увеличения содержания CO_2 в атмосфере, что сделает среду кислой. Ионы бикарбоната нейтрализуются добавлением бикарбоната натрия (в составе бикарбонатного буфера):



Таже для буферизации можно использовать высокие концентрации аминокислот.

Таким образом, культуры в открытых сосудах необходимо инкубировать в атмосфере CO₂, концентрация которой находится в равновесии с концентрацией бикарбоната натрия в среде.

Кислород. Культивируемые клетки в основном зависят от растворенного в среде соответствующего количества O₂, который при высокой концентрации может быть токсичным из-за образования свободных радикалов. Введение в среду поглотителей свободных радикалов, таких как β-меркаптоэтанол или дитиотрейтол, подавляет токсичность O₂. Для снижения токсичности O₂ часто рекомендуется добавление селена в среду. Это связано с тем, что селен является кофактором для синтеза глутатиона.

Температура. Оптимальная температура для клеток, полученных от человека и теплокровных животных, составляет 37 °C, при этом важно поддерживать постоянную температуру.

Помимо непосредственного влияния на рост клеток, температура также влияет на растворимость CO₂, поскольку более высокие температуры увеличивают растворимость.

Осмоляльность. *Осмолярность* – сумма концентраций катионов анионов и неэлектролитов, т. е. всех кинетически активных частиц в 1 л раствора. Она выражается в миллиосмолях на литр (мосм/л). *Осмоляльность* – концентрация тех же частиц, растворенных в килограмме воды, выражающаяся в миллиосмолях на килограмм (мосм/кг).

Большинство культивируемых клеток имеют достаточно широкий допуск к осмотическому давлению. Это сопоставимо с осмоляльностью плазмы крови человека (290 мосм/кг). В питательной среде ее следует поддерживать на постоянном уровне (с допуском ± 10 мосм/кг). На осмоляльность влияет внесение в среду кислот, лекарств и т. д.

Вязкость. Вязкость питательной среды в значительной степени зависит от содержания сыворотки и в большинстве случаев оказывает незначительное влияние на рост клеток.

Увеличение вязкости среды с помощью карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) или поливинилпирролидона (ПВП) сведет к минимуму любое повреждение клеток, которое происходит в этих условиях.

Поверхностное натяжение и вспенивание. Последствия вспенивания четко не определены, но скорость денатурации белка может увеличиться, как и риск контаминации при попадании пены в горлышко культурального сосуда. Вспенивание может ограничить диффузию газов.

Добавление от 0,01 до 0,1 % силиконового пеногасителя (Dow Chemical) или Pluronic F68 (Sigma) помогает избежать пенообразования, сводя к минимуму поверхностное натяжение, а также может защитить клетки от напряжения сдвига пузырьков.

3.3 Типы сред для клеточных культур

Клетки животных могут культивироваться либо с использованием полностью натуральной среды, либо искусственной/синтетической среды вместе с некоторыми натуральными продуктами (таблица 5).

Таблица 5 – Виды естественных и искусственных сред

Среды	Тип среды	Примеры
Натуральные среды	Биологические жидкости	Плазма, сыворотка, лимфа, сыворотка плацентарного канатика, околоплодные воды
	Экстракты тканей	Экстракт печени, селезенки, опухолей, лейкоцитов и костного мозга, экстракт эмбриона крупного рогатого скота и куриного эмбриона
	Сгустки	коагулянты или сгустки плазмы
Искусственные среды	Сбалансированные солевые растворы	PBS, DPBS, HBSS, EBSS
	Базальные среды	MEM, DMEM
	Сложные (комплексные) среды	IMDM, RPMI-1640

3.3.1 Натуральная среда

Природная среда описывается как жидкости организма животных, включая плазму, сыворотку, лимфу, раствор для выщелачивания куриных эмбрионов. Поскольку эта среда имеет очень сложную технологию приготовления и большую вариабельность от партии к партии, она постепенно заменяется синтетической средой.

В качестве питательных сред могут быть использованы некоторые биологические жидкости (таблица 5). Среди них сыворотка является наиболее предпочтительной.

3.3.2 Сыворотка

Сыворотка производится из плазмы. Сыворотка является естественной биологической жидкостью, имеющая желтоватый цвет, прозрачную после удаления фибрина и клеток из крови, она богата различными компонентами для поддержания пролиферации клеток (таблица 6).

Таблица 6 – Основные компоненты сыворотки и их средняя концентрация

Компонент	Средняя концентрация	Компонент	Средняя концентрация
Na ⁺	137 моль/л	Щелочная фосфомоноэстераза	225 МЕ/л
K ⁺	11 моль/л	Молочнокислая дегидрогеназа	860 МЕ/л
Cl ⁻	103 моль/л	Инсулин	0,4 мкг/л
SeO ₃ ²⁻	26 мкг/л	Стимулятор щитовидной железы	1,2 мкг/л
Ca ²⁺	136 мг/л	Фолликулостимулирующий гормон	9,5 мкг/л
Фибонектин	35 мг/л	Соматотропин	39 мкг/л
Мочевая кислота	29 мг/л	Пролактин	17 мкг/л
Креатин	31 мг/л	T ₃	1,2 мкг/л
Гемоглобин	113 мг/л	Холестерин	310 мкг/л
Билирубин (общий)	4 мг/л	Кортизон	0,5 мкг/л
Неорганический фосфор	100 мг/л	Тестостерон	0,4 мкг/л
Глюкоза	1 250 мг/л	Прогестерон	80 мкг/л
Мочевина	160 мг/л	Простагландин E	6 мкг/л
Общий белок	38 г/л	Простагландин F	12 мкг/л
Альбумин	23 г/л	Витамин A	90 мкг/л
α2-макроглобулин	3 г/л	Витамин E	1 мг/л
Эндотоксин	0,35 мкг/л	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Co ³⁺ и др.	мг/л → нг/л

Сыворотка может быть получена от разных животных. В настоящее время в культуре тканей доступны и используются сыворотки лошади, кролика, козы, свиньи, телят и т. д., при этом фетальная бычья сыворотка (FBS) остается наиболее универсальной. FBS содержит редкое количество гамма-глобулина, более высокие уровни факторов роста и меньшее количество белков комплемента, чем сыворотка крови телят. Это делает FBS идеальной для размножения и роста клеток, а также снижает вероятность связывания или лизиса клеток млекопитающих в культуре. Также она имеет ряд преимуществ при использовании:

- достаточный ресурс,
- отработанную технику приготовления,
- длительное время использования.

Основные компоненты сыворотки и их средние концентрации показаны в таблице 6. Функции отдельных химических групп рассмотрены ниже.

Белки. Функции сывороточного белка *in vitro* не очень ясны. Некоторые из них участвуют в стимулировании прикрепления и роста клеток, например, фетуин, фибронектин. Белки повышают вязкость питательной среды, а также способствуют буферному действию.

Питательные вещества и метаболиты. Эти составляющие в некоторой степени служат для удовлетворения потребностей клеток в питательных веществах.

Факторы роста. В сыворотке крови есть определенные факторы роста, которые стимулируют пролиферацию клеток в культуре.

Гормоны. Например, гидрокортизон способствует прикреплению клеток, в то время как инсулин облегчает поглощение глюкозы клетками. Гормон роста способствует пролиферации клеток.

Ингибиторы. Сыворотка также может содержать факторы, ингибирующие рост клеток. Многие из них – это артефакты, например, бактериальные токсины, антитела. Большинство из этих факторов, ингибирующих рост, могут быть удалены путем тепловой инактивации (при 56 °С в течение 30 минут).

В таблице 7 указаны положительные и отрицательные факторы содержания сыворотки в питательной среде.

Таблица 7 – Положительные и отрицательные факторы содержания сыворотки в питательной среде

Положительные	Отрицательные
Обеспечение необходимыми питательными веществами	Неопределенность состава; проблемы со стандартизацией, специфичностью и вариабельностью
Содержит различные факторы роста и гормоны, они стимулируют рост и функции клеток	Необходимость контроля качества каждой партии
Участвует в прикреплении клеток	Может содержать ингибиторы факторов роста
Действует как буфер, поддерживая постоянный рН	Опасность контаминации микроорганизмами
Содержит связывающий белок	Трудности с очисткой и выделением продуктов
Уменьшает механические повреждения и повреждения, связанные с поверхностным натяжением среды	Зависимость от рынка сельскохозяйственной продукции
	Этические проблемы
	Высокая стоимость

3.3.3 Синтетическая среда

Искусственные среды используются для клеточных культур с 1950 года. Синтетическая среда представляет собой искусственно спроектированную и подготовленную среду. В настоящее время синтетическая среда уже становится стандартизированным товаром с широким разнообразием и удобством в использовании.

Искусственные среды можно разделить на следующие виды:

- среда, содержащая сыворотку;
- среда, не содержащая сыворотки;
- безбелковая среда;
- химически определенные среды.

3.3.4 Полная питательная среда

В первые годы сбалансированные солевые растворы дополнялись различными питательными веществами (аминокислотами, витаминами, сывороткой и т. д.), чтобы способствовать пролиферации клеток в культуре. Игл первым в 1950–1960-х годах определил потребности в питательных веществах для клеточных культур млекопитающих. В настоящее время доступно более десятка основных сред для различных типов культур.

MEM, также называемая минимальной основной средой Eagle, представляет собой питательную среду для клеток, разработанную Harry Eagle, и является наиболее распространенной средой для культивирования клеток наряду со средой DMEM. В среде обычно используется феноловый красный в качестве индикатора pH.

DMEM – разновидность MEM, называемая модифицированной средой Eagle's (DMEM), содержит примерно в четыре раза больше витаминов и аминокислот, присутствующих в оригинальной формуле, и в два–четыре раза больше глюкозы. Кроме того, в ее составе присутствуют железо и феноловый красный.

IMDM – это уникальная модифицированная базовая среда DMEM, которая содержит 42 ингредиента. Она хорошо подходит для сложных пролиферирующих культур клеток низкой плотности, включая гибридную селекцию клеток после их слияния, селекцию трансформированных клеток после трансфекции ДНК.

RPMI-1640 – среда Мемориального института Розуэлл-Парка, обычно называемая RPMI, подходит для большинства типов клеток, включая опухолевые клетки, нормальные клетки, клетки первичной культуры, пассажные клетки.

Ham F12 – среда Хэма. Это классическая среда, разработанная Хэмом для поддержки роста диплоидных клеток мыши и человека в 1962 году.

Все вышеперечисленные среды уже коммерциализированы, и каждая среда имеет разные формы, такие как порошок или жидкость, в больших и малых упаковках. В некоторых средах нет фенолового красного, а в некоторых нет ионов кальция и магния. Исследователь или иной пользователь может выбрать продукт в соответствии с требованиями эксперимента. Основные компоненты вышеупомянутых сред перечислены в таблице 8.

Таблица 8 – Основные компоненты некоторых сред (мг/л)

Компоненты	MEM	DMEM	IMDM	RPMI-1640	Ham F12
1	2	3	4	5	6
Неорганические соли					
CaCl ₂	200.0	200.0	165.0	–	33.2
KCl	400.0	400.0	330.0	400.0	223.6
MgSO ₄	98.0	97.67	98.00	48.84	–
NaCl	6800.0	6400.0	4500.0	6000.0	7599.0
NaHCO ₃	2200.0	3700.0	3024.0	2000.0	1176.0
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140.0	125.0	125.0	–	–
KHO ₃	–	–	0.076	–	–
NaSeO ₃	–	–	0.017	–	–
Ca(NO ₃) ₂	–	–	–	100.0	–
Na ₂ HPO ₄	–	–	–	800.0	142.0
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	–	–	–	–	0.86
MgCl ₂	–	–	–	–	57.22
Fe(NO ₃) ₃	–	0.1	–	–	–
Cu ₂ SO ₄ x 5H ₂ O	–	–	–	–	0.003
FeSO ₄	–	–	–	–	0.083
Аминокислоты					
L-аргинин гидрохлорид	126.0	84.0	84.0	200.0	211.0
L-цистин 2HCl	31.0	63.0	91.2	65.0	–
L-цистин HCl H ₂ O	–	–	–	–	35.0
L-гистидин HCl H ₂ O	42.0	42.0	42.0	15.0	21.0
L-изолейцин	52.0	105.0	105.0	50.0	4.0
L-лейцин	52.0	105.0	105.0	50.0	13.0
L-лизин HCl	73.0	146.0	146.0	40.0	36.5
L-метионин	15.0	30.0	30.0	15.0	4.5
L-фенилаланин	32.0	66.0	66.0	15.0	5.0
L-треонин	48.0	95.0	95.0	20.0	12.0
L-триптофан	10.0	16.0	16.0	5.0	2.0
L-тирозин 2Na 2H ₂ O	52.0	104.0	104.0	29.0	7.8

Окончание таблицы 8

1	2	3	4	5	6
L-валин	46.0	94.0	94.0	20.0	11.7
L-аланин	–	–	25.0	–	8.9
L-аспарагин	–	–	25.0	50.0	15.0
L-аспарагиновая кислота	–	–	30.0	20.0	13.0
L-глутаминовая кислота	–	–	75.0	20.0	14.70
L-глутамин	–	584.0	284.0	300.0	146.0
Глицин	–	30.0	30.0	10.0	7.5
L-пролин	–	–	40.0	20.0	34.5
L-серин	–	42.0	42.0	30.0	10.5
L-гидроксипролин	–	–	–	20	–
Витамины					
D-Са-пантотенат	1.0	4.0	4.0	0.25	0.5
Холина хлорид	1.0	4.0	4.0	3.0	14.0
Фолиевая кислота	1.0	4.0	4.0	1.0	1.3
Инозитол	2.0	7.2	7.2	35.0	18.0
Ниацинамид	1.0	4.0	4.0	1.0	0.04
Пиридоксаль HCl	1.0	–	4.0	–	–
Пиридоксин гидрохлорид	–	4.0	–	1.0	0.06
Рибофлавин	0.1	0.4	0.4	0.2	0.04
Тиамин HCl	1.0	4.0	4.0	1.0	0.3
Биотин	–	–	0.013	0.2	0.007
Витамин B ₁₂	–	–	0.013	0.005	1.4
Парааминобензойная кислота	–	–	–	1.0	–
Другие компоненты					
D-глюкоза	1000.0	4500.0	44500.0	2000.0	1802.0
Феноловый красный	10.0	15.0	15.0	5.0	1.2
Пируват натрия	–	–	110.0	–	110.0
Глутатион	–	–	–	1.0	–
Гипоксантин	–	–	–	–	4.08
Тимидин	–	–	–	–	0.7
Липоевая кислота	–	–	–	–	0.21
Линолевая кислота	–	–	–	–	0.08
Путресцин 2HCl	–	–	–	–	0.16

3.3.5 Безсывороточная среда

Свободные от сыворотки среды (**SFM**) являются важными инструментами, которые позволяют исследователям выращивать определенный тип клеток в отсутствие сыворотки. Однако, следует помнить, что

клетки в культуре без сыворотки более чувствительны к экстремальным значениям рН, температуры, осмоляльности, механическим силам и ферментной обработке.

К преимуществам использования безсывороточных сред относятся:

- упрощенная очистка и последующая обработка;
- точная оценка клеточной функции;
- ускоренный рост и (или) более стабильная производительность;
- лучший контроль над физиологической реакцией;
- улучшенное обнаружение клеточных медиаторов;

SFM включает в себя основную питательную среду и пищевые добавки. В базовых питательных средах обычно используют Ham F12 и DMEM в виде смеси 1:1. Добавки включают: способствующие адгезии вещества; соматомедин и гормоны; ингибитор ферментов; связывающий белок(ки) и транслокатор; микроэлемент селен.

3.3.6 Сбалансированные солевые растворы (BSS)

Сбалансированные солевые растворы могут обеспечить среду, которая поддерживает структурную и физиологическую целостность клеток *in vitro*. **BSS** используются для орошения и промывки тканей и клеток и обычно комбинируются с другими средствами для обработки тканей и клеток. Они снабжают клетки водой и неорганическими ионами, поддерживая при этом физиологический рН и осмотическое давление. В таблице 9 приведен состав нескольких распространенных BSS.

Таблица 9 – Состав нескольких распространенных BSS, мг/л

Компоненты	PBS (Буфер фосфатно-солевой)	EBSS	HBSS	DPBS
NaCl	8.0	6.8	8.0	8.0
KCl	0.2	0.4	0.4	0.2
CaCl ₂	–	0.2	0.14	0.1
MgCl ₂ x 6H ₂ O	–	–	–	0.1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	–	0.2	0.2	–
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1.56	–	0.06	–
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	–	0.14	–	1.42
KH ₂ PO ₄	0.2	–	0.06	0.2
NaHCO ₃	–	2.2	0.35	–
Глюкоза	–	1.0	1.0	–
Феноловый красный	–	0.02	0.02	0.02

Функции сбалансированных солевых растворов:

- поставляют необходимые неорганические ионы;
- обеспечивают необходимый уровень рН;
- поддерживают желаемую осмоляльность;
- поставляют энергию из глюкозы.

По сути, сбалансированные солевые растворы являются основой для приготовления полноценных сред с необходимыми добавками. Также BSS полезны и для короткого периода (до 4 часов) инкубации клеток.

Вопросы для самоконтроля

- 1 Определите понятие «культура клеток животных».
- 2 Какие минимальные критерии предъявляют к составу питательных сред?
- 3 Перечислите основные питательные компоненты сред культивирования. Опишите их роль.
- 4 Охарактеризуйте физико-химические свойства питательных сред.
- 5 Перечислите типы сред для клеточных культур, более подробно охарактеризуйте их.
- 6 Опишите основные компоненты сыворотки и ее функции.
- 7 Охарактеризуйте синтетические среды. Приведите наиболее используемые на практике среды.
- 8 Дайте описание безсывороточных сред (SFM).
- 9 Охарактеризуйте сбалансированные солевые растворы (BSS).

Практическое занятие 3

Цель: Ознакомление с наиболее часто употребляемыми питательными средами, их составом, назначением.

Ход работы

Решите ситуационные задачи. В рамках решения ситуационной задачи обучающийся дает развернутый письменный (при необходимости устный) ответ.

Перечень ситуационных задач:

- 1 Несмотря на то, что среды для культивирования клеток животных различаются по своей сложности, большинство из них содержат в 1 л: аминокислоты (например, L-валин, L-лейцин, L-лизин HCl, L-метионин,

L-триптофан, L-фенилаланин): 0,1–0,2 мМ, витамины (например, биотин, витамин В₁₂, никотиновая кислота, пиридоксин гидрохлорид, тиамин НСl, фолиевая кислота): 1 мкМ, NaCl: 150 мМ, KCl: 4–6 мМ, CaCl₂: 1 мМ, глюкоза: 5–10 мМ. Сделайте расчеты указанных соединений (в мг).

2 Перечислите в составе основных искусственных сред двенадцать незаменимых L-аминокислот.

3 Выберите 10 компонентов сыворотки (таблица 6). Для каждого из них напишите молекулярную формулу и определите молекулярную массу.

4 Проанализируйте состав сыворотки по данным таблицы 6. Распределите соединения по группам, заполнив таблицу 10.

Таблица 10 – Представители основных компонентов сыворотки

Группы	Химические соединения
макроэлементы	
микроэлементы	
углеводы	
витамины	
белки	
ферменты	
гормоны	
факторы роста	
ингибиторы роста	

5 Рассчитайте для компонентов сыворотки Na⁺ и K⁺ (таблица 6) среднюю концентрацию (в г/л) для солей KCl и NaCl.

6 Проанализируйте качественный и количественный составы базовых синтетических сред по данным таблицы 8. Подчеркните их основные отличия.

7 Выберите по каждой группе компонентов основных сред (таблица 8) по пять представителей. Для каждого из них напишите молекулярную формулу (если она отсутствует) и определите молекулярную массу.

8 В некоторых источниках (фирмах) в составах питательных сред указаны концентрации для безводных (или, наоборот, водных) неорганических солей. Следуя данным таблицы 8, рассчитайте: 1) для одной по выбору из перечисленных питательных сред количество (в мкМ); 2) для указанных водных солей пропишите безводную формулу и рассчитайте их концентрацию (в мг/л и мкМ); 3) для указанных безводных солей пропишите водную формулу и рассчитайте их концентрацию (в мг/л и мкМ).

9 Проанализируйте качественный и количественный составы двух-трех распространенных BSS по данным таблицы 9. Подчеркните их основные отличия.

ЛИТЕРАТУРА

1 Василевич, Н. И. Бессывороточные питательные среды: научные, этические и биотехнологические аспекты / Н. И. Василевич, В. В. Честков // Лаборатория и производство. – 2019. – № 6 (10). – С. 64–71.

2 Вербицкий, А. А. Средства для культивирования микроорганизмов при проведении лабораторных исследований : монография / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – 200 с.

3 Емцев, В. Т. Микробиология : учебник для СПО / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 8-е изд., испр. и доп. – М. : Издательство Юрайт, 2023. – 428 с.

4 Калашникова, Е. А. Культура тканей и клеток растений : учебник / Е. А. Калашникова, Р. Н. Киракосян. – М. : КноРус, 2023. – 183 с.

5 Концевая, И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий : практическое руководство / И. И. Концевая. – Чернигов : Десна Полиграф, 2017. – 44 с.

6 Ленивко, С. М. Основы биотехнологии : учебно-методический комплекс / С. М. Ленивко, Ю. В. Кирисюк. – Брест : БрГУ, 2018. – 92 с.

7 Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов / А. Ю. Прилепский [и др.]. – СПб. : Университет ИТМО, 2019. – 43 с.

8 Черкасова, Е. И. Работа с культурами клеток : учебно-методическое пособие / Е. И. Черкасова, А. А. Брилкина. – Н. Новгород : Издательство Нижегородского университета, 2015. – 57 с.

9 Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток / Р. Я. Фрешни ; пер. 6-го англ. изд. – 5-е изд., электрон. – М. : Лаборатория знаний, 2022. – 791 с.

10 Acharya, T. Bacterial Culture Media: Classification, Types, Uses / T. Acharya [Электронный ресурс]. – 2021. – Режим доступа: <https://microbeonline.com/types-of-bacteriological-culture-medium/>. – Дата доступа: 15.03.2024.

11 Aiman, F. Microbial Culture Media – Definition, Types, Examples, Uses / F. Aiman [Электронный ресурс]. – 2022. – Режим доступа: <https://microbenotes.com/types-of-culture-media/#application-of-culture-media>. – Дата доступа: 15.03.2024.

12 PhytoTechnology Laboratories [Электронный ресурс]. – 2023. – Режим доступа: www.phytotechlab.com. – Дата доступа: 15.12.2023.

Производственно-практическое издание

Концевая Ирина Ильинична

**ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ:
ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ**

Практическое руководство

Редактор Е. С. Балашова
Корректор В. В. Калугина

Подписано в печать 09.01.2025. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография.
Усл. печ. л. 2,56. Уч.-изд. л. 2,80.
Тираж 10 экз. Заказ 1.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины».
Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013 г.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий в качестве:
издателя печатных изданий № 1/87 от 18.11.2013 г.;
распространителя печатных изданий № 3/1452 от 17.04.2017 г.
Ул. Советская, 104, 246028, Гомель.

