

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии**

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

*Для студентов специализации
Н.04.01.08 «Биотехнология»*

**МИНСК
2001**

УДК 577.95(075.8)
ББК 28.03р.я73
К90

Авторы - составители:
О. В. Блажевич, Р. А. Желдакова

Рецензент
кандидат биологических наук,
доцент *А. П. Кудряшов*

Рекомендовано
Ученым советом биологического факультета БГУ
30 ноября 2000 г., протокол № 3

Культивирование клеток : Метод. указания/
К90 Сост. О. В. Блажевич, Р. А. Желдакова. - Мн.: БГУ, 2001. - 17 с.

В данном издании приведены методические указания и программа специальной дисциплины «Культивирование клеток». Предназначено для студентов биологического факультета специализации Н.04.01.08 «Биотехнология».

УДК 577.95(075.8)
ББК 28.03р.я73

© БГУ, 2001

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные культуры с каждым годом находят все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицины и сельского хозяйства. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и многих других.

Важную роль клеточные культуры играют в биотехнологии при производстве вакцин и биологически активных веществ. Они являются исходным материалом для создания клеток-продуцентов, используются в целях повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и для выведения новых сортов растений. Культуры клеток применяются для диагностики и лечения наследственных заболеваний, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических веществ, а также для сохранения генофонда исчезающих видов животных и растений.

Широкое распространение клеточных культур и постоянно возникающие новые аспекты их применения обусловлены бурным прогрессом техники культивирования и появлением все нового числа клеточных линий.

В отличие от микроорганизмов, которые издавна используются в традиционных технологиях (хлебопечение, производство кисломолочных продуктов и т.д.), культуры клеток высших организмов являются сравнительно новым объектом биотехнологии. С использованием данных биологических объектов может быть налажено производство биологически активных веществ, вакцин, моноклональных антител и др.

Задача 1. Изучение динамики роста и продукции вторичных метаболитов бактериями *Pseudomonas*

Бактерии рода *Pseudomonas* представляют собой интересную группу прокариотических микроорганизмов. Они распространены повсеместно благодаря способности утилизировать большой спектр органических веществ. Бактерии данного рода широко используются в хозяйственной практике, т.к. способны синтезировать значительное количество различных биологически активных веществ (антибиотиков, ферментов, органических кислот, витаминов и т.д.), а

также в качестве моделей для многочисленных теоретических научных исследований. Среди бактерий рода *Pseudomonas* определенный интерес вызывают представители флуоресцирующей группы благодаря продукции флуоресцирующих пигментов, представляющих собой желто-зеленые водо-растворимые соединения, хорошо диффундирующие в среду культивирования. Флуоресцирующие пигменты характеризуются чрезвычайно высокой хелатирующей ионы трехвалентного железа способностью и являются сидерофорами бактерий *Pseudomonas*. Сидерофоры синтезируются и функционируют в железodefицитных условиях и предназначены для перевода соединений железа в растворимую форму с последующим транспортом их внутрь клеток. Помимо основной железотранспортной функции сидерофоры микроорганизмов могут действовать как факторы роста, проявлять антимикробную активность, служить факторами вирулентности. Антимикробная активность флуоресцирующих пигментов *Pseudomonas* в отношении большого числа грибов, дрожжей, нематод, а также бактерий различных родов и видов обусловлена более высокой (примерно в 10 раз), чем у других бактериальных и грибных сидерофоров, константой связывания Fe^{3+} -ионов (при наличии в среде нескольких сидерофоров они всегда имеют преимущества в образовании железо-пигментных комплексов, причем стабильность их гораздо выше, чем у других хелаторов железа), а также недоступность железо-пигментных комплексов *Pseudomonas* для других микроорганизмов в виду высокой специфичности флуоресцирующих пигментов.

Цель занятия: изучение динамики роста и продукции флуоресцирующего пигмента бактерий *Pseudomonas putida* М при культивировании в жидких питательных средах, а также выяснение влияния условий культивирования на продукцию пигмента.

Штаммы: в работе используют бактерии *Pseudomonas putida* М.

Среды и реактивы: полноценная жидкая питательная среда (ППБ), среда Канеда (г/л: 8 KH_2PO_4 , 8 $(NH_4)_2SO_4$, 2 NaCl, 0,1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,0), обезжелезенная среда Канеда, обезжелезенная среда Филсона (г/л: 24 K_2HPO_4 , 12 KH_2PO_4 , 4 $(NH_4)_2SO_4$, 0,008 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,0), 20% раствор глюкозы, 40% раствор сукцината натрия.

Оборудование: колбы Эрленмейера объемом 250 мл, стерильные пипетки, колориметр фотоэлектрический

концентрационный КФК-2, набор прямоугольных кювет, миллиметровая бумага.

Ход работы:

В работе для изучения динамики роста популяции бактерий рода *Pseudomonas* используют полноценную жидкую питательную среду (ППБ) и минеральную среду Канеда с глюкозой в качестве источника углерода и энергии. Для изучения динамики роста и выявления продукции флуоресцирующего пигмента используют обезжелезненные среды Канеда и Филсона с сукцинатом натрия в качестве источника углерода и энергии.

Обезжелезненные среды получают путем обработки среды 8-оксихинолином. Очистку среды от 8-оксихинолина осуществляют путем трехкратной обработки среды хлороформом. Процедуры, позволяющие удалить ионы железа, проводят перед стерилизацией среды.

Техника исследований. Ночную культуру исследуемых бактерий *P. putida* М (10 мл) вносят в 90 мл жидкой среды в колбах Эрленмейера и помещают на качалку при 28°C (180 об/мин). Сразу после разведения и перед помещением на качалку отбирают первую пробу (3 мл) для измерения ОП при длине волны 540 нм. Далее отбор проб и измерение ОП осуществляют каждые 30 минут. Через 120 минут с начала культивирования параллельно отбирают первую пробу для определения продукции флуоресцирующего пигмента. Для этого отобранную пробу объемом 3 мл центрифугируют с целью осадить клетки бактерий. Полученную после центрифугирования надосадочную жидкость переливают в кювету и измеряют ОП при длине волны 400 нм. Во всех случаях при снятии показаний фотоэлектроколориметра к качеству контроля используют дистиллированную воду.

Получаемые результаты заносят в таблицу.

На основании полученных данных по оптической плотности строят кривые динамики роста и продукции флуоресцирующего пигмента.

Задача 2. Выделение и культивирование растительных протопластов

Развитие метода культивирования клеток растений открыло широкие возможности для изучения биологии клетки, ее биосинтетического потенциала, а также генетических основ стабильности и изменчивости клеток. В ряде случаев для этого необходимо уметь культивировать одиночные клетки. Одним из методов их получения является изолирование протопластов. В определенных условиях клетки, лишенные клеточной стенки, регенерируют ее заново и, возвращенные к нормальным условиям существования, начинают проявлять все характерные свойства культивируемых клеток, такие как деление и тотипотентность. Изолированные протопласты более доступны для введения в них экзогенных факторов, что позволяет также изучать влияние биологически активных соединений на жизнедеятельность клеток.

В настоящее время исследователи рассматривают протопласты как модель, с помощью которой можно изучать целый ряд проблем как на клеточном, так и на молекулярном уровне, имеющих большое значение при решении практических задач биотехнологии и сельского хозяйства.

Существует два метода выделения растительных протопластов: механическое удаление клеточной стенки в среде, содержащей осмотический стабилизатор (в этом случае получается незначительное количество протопластов, основным источником которых служат вакуолизованные клетки паренхимы), и энзиматическое удаление клеточной стенки (в соответствующих условиях можно получить большое количество протопластов, длительное время сохраняющих жизнеспособность).

Сущность метода изолирования протопластов состоит в удалении клеточной стенки таким образом, чтобы в клетке не возникло необратимых изменений. Для этого наружное и внутреннее осмотическое давление на мембрану должно быть таким, чтобы клетки не разрушались и не наблюдалось лизиса протопластов. Источником получения протопластов могут служить листья, проростки, клубни, лепестки, плоды, клубеньки бобовых и т.д. Для успешного получения протопластов имеют значение возраст растения (обычно используют молодое растение, еще не начавшее цветение) и условия его выращивания (интенсивность освещения, фотопериод,

влажность и температура). Большое число протопластов удается получить из растений, выращенных в стерильных условиях.

Цель занятия: выделение и культивирование протопластов из листьев табака с целью получения каллусной культуры.

Источник получения протопластов: мезофилл листа табака.

Среды и растворы: среда Мурасиге-Скуга (мг/л: 170 KH_2PO_4 , 1900 KNO_3 , 370 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 440 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 27,85 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,25 Na_2EDTA , 1650 NH_4NO_3 ; 22,3 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6,2 H_3BO_3 , 8,6 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,83 KI ; 1 Са-пантотената, 1 тиамин, 1 пиридоксин, 100 инозита; 5 кинетин, 1 НУК; 30000 сахарозы; рН 5,5). Раствор фермента: 0,5 М маннит + 0,5%-ная целлюлаза (Onozuka R-10), рН 5,5-5,7. 0,4 М маннит, стерильная дистиллированная вода, этиловый спирт 70 и 96%-ный, 5-10% раствор гипохлорита кальция.

Оборудование: ламинар-бокс, инвертированный микроскоп, центрифуга с малым количеством оборотов, спиртовка, пинцеты глазные и хирургические, скальпели; стерильные пипетки, пробирки, чашки Петри диаметром 50-60 мм, колбы Эрленмейера на 50 и 100 мл, центрифужные пробирки, матрас с вложенными листами фильтровальной бумаги, стаканы на 500-800 мл; парафилм, камера Фукса-Розенталя; стеклянные воронки с бактериальными фильтрами (диаметр пор 0,2-0,4 мкм), нейлоновые фильтры с диаметром пор 60 мкм.

Ход работы:

Для выделения протопластов из мезофилла листа табака берут 50-60-суточные растения. Все работы проводятся в стерильных условиях. Ферментные растворы готовятся непосредственно перед использованием и стерилизуются через бактериальный фильтр.

Техника получения протопластов:

- 1) листья табака промывают проточной водой, затем споласкивают дистиллированной;
- 2) помещают их в стакан с 70% спиртом на 0,5-1 минуту;
- 3) затем на 3-5 минут помещают в 5% раствор гипохлорита кальция;
- 4) трижды по 10 минут промывают стерильной дистиллированной водой, разлитой в стаканы по 500-800 мл;

- 5) помещают в матрас на фильтровальную бумагу нижним эпидермисом вверх, осторожно с помощью скальпеля и глазного пинцета снимают эпидермис, нарезают на небольшие фрагменты шириной 5-10 мм и помещают в раствор фермента, разлитый по 10 мл в 100 мл колбы Эрленмейера так, чтобы ткань плавала на поверхности фермента и не тонула, при этом та часть листа, с которой удален эпидермис, должна контактировать с ферментным раствором;
- 6) колбы закрывают резиновыми пробками и оставляют в темноте при 25°C на 13-15 часов во влажной камере;
- 7) по истечении этого времени под инвертированным микроскопом оценивают качество и общее количество выделившихся протопластов;
- 8) если выделилось достаточное число протопластов и они имеют правильную сферическую форму с равномерно расположенными хлоропластами, то начинают отмывать от фермента;
- 9) с помощью пипетки пропускают суспензию через нейлоновый фильтр в центрифужные пробирки;
- 10) закрывают пробирки стерильными пробками и центрифугируют при 100 об/мин в течение 3 минут;
- 11) осторожно отбирают пипеткой надосадочную жидкость, а к находящимся на дне пробирки протопластам добавляют 7-8 мл 0,4 М маннита;
- 12) затем центрифугируют в тех же условиях, операцию отмывки повторяют дважды;
- 13) пипеткой отбирают раствор маннита и добавляют 1-2 мл среды Мурасиге-Скуга;
- 14) в стерильную пробирку наливают 0,9 мл среды и 0,1 мл полученной суспензии протопластов;
- 15) в камере Фукса-Розенталя определяют число протопластов в мл;
- 16) в стерильной пробирке исходную суспензию разводят средой так, чтобы конечное число клеток составляло $1-4 \cdot 10^4$ на 1 мл, и по 2 мл разливают в чашки Петри;
- 17) заклеивают чашки парафином и культивируют в темноте при 25°C.

Протопласты табака, помещенные на среду Мурасиге-Скуга, через 24 часа образуют клеточную стенку, и через 2-3 суток наблюдается в них первое деление. Второе деление происходит на 7-8

сутки, затем образуются 8-клеточные колонии, и к 21-30 суткам культивирования формируются многоклеточные колонии.

При перенесении их на агаризованную среду образуется каллус, из которого при определенных условиях культивирования и состава среды может быть получено целое растение.

Задача 3. Культивирование клеток млекопитающих

В настоящее время практически любые клетки человека могут быть введены в культуру и, тем самым, служить средством и объектом во многих медико-биологических исследованиях. Однако, наибольший опыт накоплен в отношении фибробластов, что обусловлено не только легкостью их культивирования, но и тем, что соединительная ткань, главным элементом которой являются фибробласты, составляет весьма значительную часть массы тела. Кроме того, фибробласты, составляя строму многих органов, являются важными участниками их морфогенеза и создают условия микроокружения, необходимые для дифференцировки и функционирования специализированных клеток. Важно отметить, что фибробласты представляют *in vitro* не только самих себя и соединительную ткань, но и клеточные системы иной специализации, в частности нервные клетки. Так, в фибробластах имеется фермент моноаминоксидаза, изменения активности которого характерны для некоторых нервных и психических заболеваний, в фибробластах имеются рецепторы к глюкокортикоидным гормонам, инсулину, некоторым нейромедиаторам. В связи с этим фибробласты используются для изучения клеточных, биохимических и молекулярных аспектов патогенеза ряда болезней, в том числе и связанных с наследственными дефектами нервной системы.

Использование культивируемых клеток вне организма для диагностики наследственных заболеваний является логическим продолжением метода биопсии, при котором изъятый из организма фрагмент ткани подвергается немедленному (преимущественно морфологическому) исследованию. Однако, благодаря культивированию возможности исследования и диагностики расширяются практически беспредельно, так как имеется возможность оценки не только морфологических и биохимических изменений, но и изменений в поведении клеток, их реакций на различные агенты, в том числе и лекарственные воздействия.

Воспроизведение культивируемыми клетками в ряду поколений какого-либо дефекта или изменения, свойственного клеткам *in vivo*, свидетельствует о наследственной природе этого дефекта или изменения. Именно это обстоятельство делает культивируемые фибробласты ценным объектом физиологической генетики. Благодаря методу культивирования клеток патология человека и антропология становятся экспериментальными науками.

При рассмотрении вопроса о возможности и пределах экстраполяции данных, полученных на культивируемых фибробластах, на условия *in vivo* было показано, что 1) фибробласты *in vitro* сохраняют важнейшие черты, свойственные этим клеткам в организме; более того, они сохраняют онтогенетические и индивидуально-генотипические свойства организма-донора; 2) не существует другого типа клеток, который в полной мере мог бы представлять свойства клеток организма; 3) изменения, которые возникают при введении фибробластов в культуру, можно легко контролировать и свести к минимуму путем создания соответствующих условий.

Цель занятия: монослойное культивирование фибробластов человека с целью получения клеточного штамма.

Источники получения фибробластов: биопсия дермального слоя кожи.

Среды и реактивы: состав используемой питательной среды: 90-85% базальной среды Игла (мг/л: 6800 NaCl, 400 KCl, 200 CaCl₂, 200 MgSO₄·7H₂O, 150 NaH₂PO₄·2H₂O, 2000 NaHCO₃; 21 L-аргинин гидрохлорид, 12 L-цистин, 292 L-глутамин, 9,5 L-гистидин гидрохлорид, 26 L-лейцин, 26 L-изолейцин, 36 L-лизин гидрохлорид, 7,5 L-метионин, 18 L-фенилаланин, 24 L-треонин, 4 L-триптофан, 18 L-тирозин, 24 L-валин; 1 холинхлорид, 1 фолиевая кислота, 2 инозитол, 1 никотинамид, 1 пантотенат кальция, 1 пиридоксаль гидрохлорид, 0,1 рибофлавин, 1 тиамин; 1000 глюкоза); 5-10% сыворотки крупного рогатого скота; 5% пуповинной сыворотки человека. Кроме того в работе используют 0,25% раствор трипсина, 0,02% раствор версена (ЭДТА).

Оборудование: стерильные пипетки, пипетки Пастера, сосуды Карреля, пенициллиновые флаконы, стекла покровные, пинцеты глазные анатомические и хирургические, зажим Кохера, бритва

безопасная, препаровальная игла, микроскоп, ламинар-бокс или стерильный бокс, пробки резиновые, термостат, центрифуга.

Ход работы:

Поскольку имеются данные о том, что биологические особенности фибробластов варьируют в зависимости от мест взятия эксплантата, необходимо придерживаться стандартного метода взятия биопсии. Наиболее удобным местом является внутренняя сторона предплечья левой руки (нижняя треть).

Техника получения и культивирования фибробластов человека:

- 1) кожу дезинфицируют 70% этиловым спиртом (употребление других дезинфицирующих раствором не рекомендовано);
- 2) после дезинфекции кожу захватывают стерильным глазным хирургическим пинцетом, оттягивают, насколько возможно, и отсекают стерильной бритвой кусочек кожи непосредственно под браншами пинцета;
- 3) полученный фрагмент кожи помещают в стерильную чашку Петри с каплей трипсина (0,25% раствор) или питательной среды (предохраняет от высыхания) и, придерживая его стерильным пинцетом, нарезают стерильным лезвием на мелкие кусочки величиной с булавочную головку и меньше;
- 4) при помощи изогнутой препаровальной иглы кусочки извлекают из капли и помещают на покровное стекло, находящееся в пенициллиновом флаконе. Уложенные кусочки кожи накрывают другим покровным стеклом, слегка прижимая его препаровальной иглой;
- 5) покровные стекла с зажатыми между ними кусочками кожи при помощи пинцета кладут на боковую сторону пенициллинового флакона, а питательную среду наливают так, чтобы она покрыла верхнее стекло;
- 6) флаконы устанавливают на специальной подставке под углом примерно в 30° , плотно закрывают пробкой и помещают в термостат при 37°C ;
- 7) в течение недели следят только за цветом среды. Изменение цвета к желто-оранжевому свидетельствует о хорошем состоянии эксплантата;

- 8) через неделю начинают периодически (каждые сутки) наблюдать культуру под микроскопом. Вокруг кусочков появляются вначале единичные фибробласты, которые заметны в виде веретеновидных клеток, либо появляется слой эпителия, окружающего фрагмент в виде «кружевного» ореола;
- 9) когда клетки займут все пространство между кусочками кожи (это видно невооруженным глазом), клетки пересевают (точные сроки указать невозможно, поскольку скорость роста клеток зависит от многих факторов, в том числе и характеристик донора);
- 10) при пересеве клеток удаляют питательную среду из флакона и наливают 2-3 мл заранее подогретого раствора трипсина (0,25%). Через 2 минуты трипсин удаляют, оставив его только между стеклами;
- 11) инкубируют в термостате при 37°C в течение 15-20 минут;
- 12) по окончании трипсинизации при помощи препаровальной иглы отделяют одно стекло от другого и при помощи тонко оттянутой пипетки смывают клетки небольшим количеством (1мл) среды, тщательно пипетируя суспензию клеток и кусочки кожи;
- 13) суспензию клеток переносят в небольшой флакон Карреля или пенициллиновый флакон и добавляют среду до 2-3 мл, оставшиеся в прежнем флаконе кусочки снова укладывают между двумя покровными стеклами и заливают средой для получения второго «урожая» клеток;
- 14) флакон Карреля с растущими фибробластами просматривают под микроскопом каждые сутки;
- 15) при образовании сплошного монослоя клеток (обычно через 4-7 суток) производят второй пересев. Для этого удаляют среду, вносят в сосуд 2-3 мл раствора ЭДТА, слегка покачивая сосуд, смачивают этим раствором клетки. Раствор ЭДТА удаляют и вносят 2-3 мл раствора трипсина, который удаляют в течение 1 минуты, оставив слой клеток, смоченный трипсином. Флакон помещают на 15-20 минут в термостат;
- 16) клетки смывают струей питательной среды, аккуратно пипетируя. Пересев производят в соотношении 1:2, т.е. из одного флакона клетки распределяют в два или в один, но большего объема;
- 17) обычно пересевы осуществляют 1 раз в неделю (после достижения полного монослоя);

- 18) клеточный штамм считается установившимся, если после пассирования в течение первых 5 пассажей прирост клеток спустя 3-4 суток после посева превосходит количество посеянных клеток минимум вдвое, что и позволяет посеивать такие клетки в отношении 1:2.

Программа курса «Культивирование клеток»

Введение

Актуальность применения культур клеток в различных областях биологии, медицины и сельского хозяйства. Возможность их использования в решении проблем дифференцировки и пролиферации клеток, взаимодействия клеток с окружающей средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и др. Роль клеточных культур в биотехнологии при производстве биологически активных веществ; применение их для диагностики и лечения наследственных заболеваний; в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических веществ, а также для сохранения генофонда исчезающих видов животных и растений.

Оборудование и питательные среды для работы с клеточными культурами

Аппараты для очистки воды, используемой для приготовления питательных сред или мытья культуральной посуды. Их характеристика и возможности получения сверхчистой и общелабораторной воды.

Приборы, аппараты и реактивы для мытья и стерилизации посуды, обеспечивающие выполнение всех этапов технологического процесса: сушильные шкафы с принудительной продувкой горячим воздухом, паровые или воздушные стерилизаторы и т.д.

Приборы для дозирования, разведения и пробоотбора. Автоматические и полуавтоматические дозаторы-диллюторы, пипетки и т.п. Основные требования, предъявляемые к такого рода приборам.

Принципы составления питательных сред. Устройства для приготовления питательных сред. Основные требования, предъявляемые к питательным средам для клеточных культур.

Установки для стерилизующей фильтрации жидких питательных сред. Микро- и ультрафильтрация питательных сред.

Боксовые помещения и ламинар-боксы. Их типы, обустройство и значение.

Лабораторные термостаты. Специальные требования, предъявляемые к лабораторным термостатам для культивирования клеток, и типы их конструкций.

СО₂- инкубаторы и аэраторы. Необходимость и значение их использования.

Аппараты для массового культивирования клеток, обеспечивающие принудительное перемешивание питательных сред с помещенными в них клеточными культурами. Лабораторные встряхиватели, роллерные установки и т.п., их типы, режимы работы и значение для культивирования клеток. Лабораторные ферментеры. Их назначение, типы, конструкция и области применения. Глубинное культивирование клеточных и бактериальных культур. Общая модель динамики роста клеточных культур. Специфические особенности работы с ферментерами. Проблемы пенообразования и пеногашения. Хемостаты и турбидостаты.

Культуральная посуда. Особые требования к свойствам поверхности и материала изделий из стекла и пластика, предназначенных для роста клеток в монослое. Специальная культуральная посуда: флаконы, колбы, матрасы, чашки Петри, платы, роллерные сосуды, пробирки, пипетки и т.д. Области применения стеклянной и пластиковой посуды. Основные подходы, способы и степень подготовки культуральной посуды к культивированию клеток.

Основные типы и состав питательных сред для культивирования различных типов клеток. Основные питательные потребности клеток. Преимущества и недостатки разных типов питательных сред.

Культивирование клеток микроорганизмов

Историческое развитие культивирования микроорганизмов. Работы Л.Пастера, М.Ролэна, Р.Коха и др. по созданию методов культивирования и изучению питательных потребностей микроорганизмов.

Методы выделения чистых культур аэробных и анаэробных микроорганизмов.

Подбор состава культуральных сред с учетом типов питания культивируемых микроорганизмов. Влияние условий культивирования на жизнедеятельность микроорганизмов. Потребность в кислороде и аэрация. Культивирование анаэробных микроорганизмов.

Динамика роста культуры микроорганизмов и характерные особенности каждой фазы. Параметры роста: скорость роста, урожай клеток, время генерации, длительность лаг-фазы, экономический и метаболический коэффициенты и др.

Динамическое и статическое (стационарное) культивирование. Открытые и закрытые системы культивирования. Поверхностное и глубинное культивирование, суспензионные культуры. Периодический, продленный периодический, многоциклический и непрерывный процессы культивирования клеток микроорганизмов. Непрерывное культивирование.

Методы создания и биологические свойства синхронных культур микроорганизмов. Управляемое культивирование микроорганизмов с заданными свойствами.

Особенности культивирования бактериальных, дрожжевых и грибных клеток.

Условия получения, регенерация клеточной стенки и культивирование бактериальных и грибных протопластов.

Культивирование растительных клеток

История создания культур клеток растений. Значение работ немецких ученых Х.Фехтинга, К.Рехингера, Г.Габерландта. Опыты Роббинса и Котте. Последующая разработка методов, питательных сред и условий культивирования клеток растений.

Методы создания клеточных культур растений. Получение культуры каллусных клеток. Среды и методы выращивания каллусных клеток: поверхностный способ на агаризованной питательной среде, суспензионные культуры и глубинное культивирование, культивирование отдельных (одиночных) клеток. Динамика роста популяции растительных клеток и особенности каждой фазы.

Протопласты растительных клеток. Способы выделения растительных протопластов. Условия культивирования протопластов. Значение культур клеток растений и изолированных растительных

протопластов для создания методов биологического конструирования растений с заданными свойствами.

Культивирование животных клеток

Проблемы развития культивирования животных клеток. Культивируемые элементы.

Возможности получения первичных культур. Популяция клеток и клоновые линии. Клеточные линии: ограниченные и постоянные.

Выбор питательных сред и субстратов для культивирования животных клеток. Состав питательных сред (среды, содержащие сыворотку, и бессывороточные питательные среды).

Динамика развития клеточных линий и влияние физических, химических и биологических факторов. Монослойные и суспензионные клеточные культуры. Типы культуральных систем для непроточных и проточных культур.

Культивирование клеток беспозвоночных. Специфические особенности культивирования клеточных линий, полученных из разных типов тканей высших животных и человека.

Значение и возможности использования культивируемых животных клеток.

Литература

1. Методы культивирования клеток. Л.: Наука. 1988. 315с.
2. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир. 1978. 333с.
3. Культура клеток растений. М.: Наука. 1981. 168с.
4. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир. 1983. 263с.
5. Новые методы культуры животных тканей. М.: Мир. 1976. 255с.
6. Культура животных клеток. Методы. Под ред. Р.Ферши. М.: Мир. 1989. 332с.
7. Никольский Н.Н., Вахтин Ю.Б., Игнатова Т.Н. и др. Биология клетки в культуре. Л.: Наука. 1984. 280с.
8. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина. 1992. 192с.
9. Методы общей бактериологии. М.: Мир. 1983. т.1, ч.2. с.163-512.
10. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка. 1984. 160 с.

Учебное издание

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
КЛЕТОК**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

*Для студентов специализации
Н.04.01.08 «Биотехнология»*

А в т о р ы – с о с т а в и т е л и:
Блажевич Ольга Валентиновна
Желдакова Римма Анатольевна

Ответственный за выпуск *О. В. Блажевич*

Подписано в печать 07.05.2001. Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 1,04. Тираж 50 экз.
Зак.

Налоговая льгота – Общегосударственный классификатор
Республики Беларусь ОКРБ 007 - 98, ч. 1; 22.11.20. 600.

Белорусский государственный университет.
Лицензия ЛВ № 315 от 14.07.98.
220050, Минск, пр. Ф. Скорины, 4.

Отпечатано на копировально-множительной технике
биологического факультета Белгосуниверситета.
220050, Минск, ул. Курчатова, 10.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
Введение	3
Задача 1. Изучение динамики роста и продукции вторичных метаболитов бактериями <i>Pseudomonas</i>	3
Задача 2. Выделение и культивирование растительных протопластов	6
Задача 3. Культивирование клеток млекопитающих	9
Программа курса «Культивирование клеток»	13