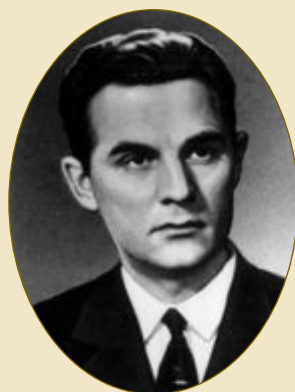


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

ВЕСТНИК
биотехнологии
и физико-химической
биологии
имени Ю.А. Овчинникова



Т. 1, № 2
2005

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

2005, Т.1, № 2

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, Ю.В. Махотин, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), А.А. Воробьев (Москва),
В.Г. Дебабов (Москва), В.В. Эверев (Москва), А.И. Иваненко (Москва),
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пуццино), М.П. Кирпичников (Москва),
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва), Т.В. Овчинникова (Москва),
О.Н. Озолинь (Пуццино), Е.Н. Орешкин (Москва), А.Н. Панин (Москва),
Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва), Л.С. Сандахчиев (Новосибирск),
К.Г. Скрябин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева
Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9
Тел.: 8-916-640-76-18, 8-903-143-99-14
E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»
Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1
Тел.: 8-916-251-64-13
E-mail: raifvasilov@hotmail.com

*Издается при поддержке
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова*

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2005.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г.Василов* 4

Оригинальные статьи

ПЦР, ЛЦР и ГЦР – цепные реакции нуклеиновых кислот в режиме реального времени.
*А.В. Чемерис, Ю.М. Никоноров, Д.А. Чемерис, Р.Р. Гарафутдинов, М.Л. Романенкова,
Р.Т. Матниязов, Ф.Р. Гималов, Г.В. Малеев, В.А. Вахитов* 5

Эктопическая экспрессия гена *rub* человека (*hrub*) в эмбриональных стволовых клетках мыши
оказывает разнообразное влияние на характер их дифференцировки *in vitro*.
*Е.В. Новосадова, Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева, Н.В. Хайдарова, О.В. Долотов,
Л.С. Иноземцева, О.В. Ситникова, В.Э. Тарантул, И.А. Гривенников* 14

Трансформация инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* L.) генами Т-ДНК агробактерий:
изменение опухолевого фенотипа и реакции на фитогормоны у трансгенных растений.
И.Е. Додуева, Н.В. Фролова, М.А. Власенко, В.А. Монахова, Л.А. Лутова 22

Влияние индукции интерферона в период пренатального развития на гормональный статус взрослых крыс.
Е.Д. Даниленко, А.В. Батенева, В.И. Масычева 30

Каллусные культуры как продуценты полисахаридов.
Е.А. Гюнтер, О.В. Попейко, О.М. Капустина, Ю.С. Оводов 36

Краткие сообщения

Взаимосвязь структуры амфифильного блок-сополимера и его воздействия
на динамические свойства липидных мембран. *Д.Н. Павлов, Н.С. Мелик-Нубаров* 42

Обзоры

Концепция, структура и механизмы реализации Национальной программы «Развитие биотехнологии
в Российской Федерации на 2006–2015 гг.». *А.А. Воробьев, Р.Г. Василов* 44

Пути развития отечественной микробиологической промышленности. *В.Г. Дебабов* 50

Генерация электрической энергии в биотопливном элементе на основе клеток микроорганизмов.
А.Н. Решетилов, О.Н. Пономарева, Т.А. Решетилова, В.А. Богдановская 54

Ферментные препараты в кормопроизводстве.
Л.Я. Телишевская, А.А. Комаров, Ю.В. Болденко 63

Страницы истории

Северо Очоа – испанский научный гений номер два: к 100-летию со дня рождения.
В.С. Воробьев 68

Юбилейные и знаменательные даты 2005 г. 73

Хроника

События второго полугодия 2005 г. 77

Информация

Предстоящие мероприятия 2006 года. 85

Правила для авторов. 86

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

PCR, LCR and HCR — nucleic acids chain reactions in the mode of real time.

*A.V. Chemeris, Yu.M. Nikonorov, D.A. Chemeris, R.R. Garafutdinov, M.L. Romanenkova,
R.T. Matniyasov, F.R. Gymalov, G.V. Maleev, V.A. Vakhitov* 5

Ectopic expression of the human gene *pub* (*hpub*) in embryonic stem cells of the mouse is rendered with various influence on character of their differentiation in vitro.

*E.V. Novosadova, E.S. Manuilova, E.L. Arsenyev, N.V. Hajdarova, O.V. Dolotov,
L.S. Inozemtseva, O.V. Sitnikova, V.Z. Tarantul, I.A. Grivennikov* 14

Transformation of inbred lines of the radish (*Raphanus sativus* L.) by T-DNA genes of *Agrobacteria*: change of a tumoral phenotype and reaction on phytohormones at transgenic plants.

I.E. Dodueva, N.V. Frolova, M.A. Vlasenko, V.A. Monakhova, L.A. Lutova 22

The effect of interferon induction during the period of prenatal development on the hormone state of mature rats.

E.D. Danilenko, A.V. Bateneva, V.I. Masycheva 30

Callus cultures as producers of polysaccharides.

E.A. Gjunter, O.V. Popejko, O.M. Kapustina, Yu.S. Ovodov 36

Short communications

Interrelation of the structure of amphiphilic block copolymer and its influence on dynamic properties of lipid membranes. *D.N. Pavlov, N.S. Melik-Nubarov* 42

Reviews

The concept, structure and mechanisms of realization of the National program

«Development of biotechnology in the Russian Federation for 2006–2015». *A.A. Vorobyev, R.G. Vasilov* 44

Ways of development of the microbiological industry in Russia. *V.G. Debabov* 50

Generation of electric energy in a biofuel element on the basis of microorganism cells.

A.N. Reshetilov, O.N. Ponamoreva, T.A. Reshetilova, V.A. Bogdanovskaja 54

Enzyme preparations in feed production.

L.Ya. Telishevskaja, A.A. Komarov, Yu.V. Boldenko 63

Pages of history

Severo Ochoa — the Spanish scientific genius number two: to centenary from the date of birth.

V.S. Vorobyev 68

Anniversary and significant dates 2005 73

The chronicle

Events of the second half-year 2005 77

The information

Forthcoming actions 2006 85

Rules for authors 86

К читателям

Второй номер журнала за 2005 год по форме и содержанию следует первому номеру. В нем также содержатся работы как фундаментального, так и прикладного характера в сфере физико-химической биологии и биотехнологии, сохраняется стереотипная композиция и т.д. Пока выдерживается принцип многотемья при комплектации статей, хотя в будущем планируются и монотематические выпуски по наиболее актуальным направлениям.

Внимание читателей, безусловно, привлекут исследования методического характера, в частности, оригинальная модификация ПЦР, разработанная уфимскими авторами под руководством профессора А.В. Чемериса. Добротный материал продолжают печатать специалисты-агробиотехнологи из Санкт-Петербургского университета, посвященный анализу отечественного опыта в области получения трансгенных растений. Представляют большой интерес и другие публикации данного номера, например, обзорная статья А.Н. Решетилова о возможности генерации электрической энергии в биотопливных элементах на основе клеток микроорганизмов и др.

В разделе «Хроника» приведена информация о наиболее важных событиях второго полугодия 2005 года, имеющих значение для развития современной биотехнологии, в частности, о прошедшем в октябре Третьем съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Помимо обсуждения актуальных вопросов теории и практики биотехнологии, на съезде была принята Национальная программа «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.». На страницах журнала в последующем эта тема будет освещаться. Кроме того, будут публиковаться статьи с изложением наиболее интересных фактических данных из докладов и выступлений на прошедшем съезде ОБР. Но уже в настоящем номере печатаются материалы доклада президента ОБР академика РАН А.А. Воробьева и вице-президента ОБР профессора Р.Г. Василова о концепции, структуре и механизмах реализации указанной программы, а также доклад члена-корреспондента РАН и академика РАСХН В.Г. Дебабова о перспективах развития промышленной биотехнологии в России.

Наверное, вызовет интерес информация о XII Европейском биотехнологическом конгрессе, состоявшемся в августе 2005 г. в Копенгагене и продемонстрировавшем невиданные до сих пор возможности биотехнологии в приложении к любым проявлениям человеческой жизни.

Редколлегия старается поддерживать историческую рубрику. Так, мы не могли не откликнуться на такую дату, как столетие со дня рождения выдающегося биохимика Северо Очоа — описанию его жизненного и творческого пути посвящена специальная статья.

В настоящем номере содержится также другая полезная информация по профилю журнала.

Приглашаем всех заинтересованных специалистов к сотрудничеству с журналом: это касается как присылки рукописей для публикации, так и заявок на получение вышедших в свет выпусков, а в дальнейшем — и возможной подписки.

**Главный редактор,
вице-президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ**

ПЦР, ЛЦР И ГЦР – ЦЕПНЫЕ РЕАКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

А.В. ЧЕМЕРИС^{1*}, Ю.М. НИКОНОРОВ¹, Д.А. ЧЕМЕРИС¹, Р.Р. ГАРАФУТДИНОВ¹,
М.Л. РОМАНЕНКОВА¹, Р.Т. МАТНИЯЗОВ¹, Ф.Р. ГИМАЛОВ¹, Г.В. МАЛЕЕВ², В.А. ВАХИТОВ¹

¹ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа;

² Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

В первой половине 90-х гг. полимеразная цепная реакция (ПЦР) после ее преобразования в режим реального времени (ПЦР-РВ) получила новый мощный импульс. За это время предложено немало разных схем детекции целевого продукта в ПЦР-РВ, однако все они имеют различные недостатки. Нами разработан улучшенный, очень быстрый и высокочувствительный способ детекции ампликонов в ПЦР-РВ, основанный на переносе флуоресцентной резонансной энергии (FRET – Fluorescent Resonance Energy Transfer) между праймерами, который по своему удобству и простоте заметно превосходит все ныне действующие варианты ПЦР-РВ. Лигазная цепная реакция (ЛЦР) впервые осуществлена в реальном времени (ЛЦР-РВ), где детекция результатов амплификации велась в одном случае путем регистрации флуоресценции специфического к двуцепочечной ДНК красителя SYBR Green I, а в другом – за счет FRET эффекта между соседними олигонуклеотидами. Гибридационная цепная реакция (ГЦР), протекающая изотермически, без участия каких-либо ферментов, также преобразована нами в режим реального времени (ГЦР-РВ). Причем в ней имеет место не амплификация специфических фрагментов ДНК, а они лишь служат инициаторными молекулами, вызывающими процесс самосборки соответствующих олигонуклеотидных наноструктур в виде последовательного роста цепей нуклеиновых кислот из них. При этом в ходе ГЦР-РВ при разнесении в пространстве пары молекул гаситель/краситель происходит увеличение свечения последнего, которое и регистрируется.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция (ЛЦР), гибридационная цепная реакция (ГЦР), методы, модификации.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) помимо того, что оказала огромное влияние буквально на всю фундаментальную биологическую науку, заставив пересмотреть многие экспериментальные подходы, она еще совершила настоящий переворот в ДНК-диагностике и в диагностике вообще. Новый мощный толчок методу ПЦР дал перевод этой реакции в режим реального времени (ПЦР-РВ), произошедший в первой половине 90-х гг. прошлого столетия [1, 2, 3, 4]. Наибольшую популярность приобрела ник-трансляционная ПЦР [3, 5], известная ныне как TaqMan система, в которой за счет экзонуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, разрушающей гибридационный зонд с гасителем и флуоресцентным красителем, происходит нарастание свечения последнего, что стало возможным детектировать

в ДНК амплификаторе с оптическим модулем. Данный способ TaqMan детекции ампликонов в реальном времени не лишен ряда недостатков, следствием чего явилось возникновение множества разнообразных вариантов ПЦР-РВ с другими гибридационными зондами в виде двух соседних линейных олигонуклеотидов HybProbes [6], пептидно-нуклеиновых кислот Light-up probes [7, 8], проб с интеркалятором MagiProbe [9] или имеющих вторичную структуру так называемых молекулярных маяков Beacon [10, 11, 12], HyBeacon [13, 14], а также прочих весьма сложных праймерных структур типа Sunrise (нынешнее коммерческое название Amplifluor) [15], Scorpion [16, 17]; DzyNA [18]; УТ-праймера с универсальной пробой; флуоресцентного комплекса с переносом энергии, состоящего из праймера и гибридационного зонда PriProET [19] и др. Один из вариантов детекции продуктов в ПЦР-РВ [20] аналогичен способу детекции ампликонов с бромистым этидием и основан на свечении другого интеркалирующего красителя SYBR Green I, который не связывается с одноцепочечной ДНК,

* Автор для переписки:

© 2005 г. Чемерис А.В., профессор,
Институт биохимии и генетики УНЦ РАН
Адрес: 450054 Уфа, пр-т Октября, 71
E-mail: chemeris_da@anrb.ru

представленной всегда в избытке в виде олигонуклеотидных праймеров, а специфичен только для двуцепочечной ДНК и светится в комплексе с ней приблизительно в 100 раз сильнее по сравнению с его собственной флуоресценцией.

Несмотря на все многообразие существующих подходов для ПЦР-РВ, оптимального пока не было создано, в связи с чем нами была предпринята попытка разработать свой собственный вариант этого метода.

Кроме полимеразной цепной реакции, существует еще и лигазная цепная реакция (ЛЦР), в силу ряда причин известная гораздо меньше. Прообразом ЛЦР можно считать работы, в которых сообщалось о наработке продуктов реакции только в арифметической прогрессии, так как использовалась всего одна пара олигонуклеотидов, отжигавшихся встык на одной из цепей ДНК [21, 22]. Соответственно чувствительность метода была крайне низкой. Впервые настоящая ЛЦР была разработана немного позже [23], когда была задействована уже термостабильная НАД-зависимая ДНК-лигаза и олигонуклеотидов было уже 4 вместо двух, а целевые продукты каждого цикла становились матрицами для последующих. Это уже была настоящая цепная реакция с геометрическим накоплением ЛЦР-продукта. Однако даже и в этом случае, несмотря на гораздо большее число копий конечного целевого продукта, его детекция в силу его небольших размеров была затруднительной, и поэтому экспериментаторы были вынуждены применять радиоактивную метку, предварительно метя исходные олигонуклеотиды [23]. В литературе описаны способы детекции продуктов ЛЦР, основанные даже на блот-гибридизации по Саузерну [24], что абсолютно не могло быть уже тогда принято в качестве современной диагностической процедуры. Таким образом, получив некоторое развитие в первой половине 90-х гг., ЛЦР оказалась по существу незаслуженно забытой, и в мировой литературе имеются лишь единичные обзорные статьи, посвященные ЛЦР, и те, главным образом, датированы началом и серединой 90-х гг. [25, 26, 27, 28, 29]. Причины забвения ЛЦР, с одной стороны, лежат в уже упоминавшихся трудностях детекции, а с другой — в интенсивном развитии ПЦР-РВ, благодаря успехам которой, похоже, просто забыли о возможности использования аналогичным образом ЛЦР в реальном времени (ЛЦР-РВ).

Относительно недавно американскими авторами была предложена новая цепная реакция — гибридационная (ГЦР) [30]. Занимаясь в своих исследованиях вопросами самосборки молекул ДНК при формировании различных наноконструкций и заметив, что в определен-

ных сценариях отдельные молекулы ДНК являются как бы переключателями процесса, они разработали условия, при которых два шпилечных фрагмента ДНК, частично или, точнее, особым образом комплементарные друг другу, после добавления олигонуклеотида, выступающего инициатором цепной реакции, начинают гибридизоваться, приводя к неферментативному линейному росту молекул ДНК с неизбежными регулярными «никами» на обеих цепях. Отдавая должное американским авторам [30] за их, несомненно, пионерскую работу, в которой они при синтезе олигонуклеотидов использовали, в том числе, и флуоресцентный аналог аденина — 2-аминопурин, нам тем не менее показалось, что ГЦР может и должна быть кардинально усовершенствована путем перевода ее в тот же самый режим реального времени (ГЦР-РВ).

Материалы и методы

Проведение ПЦР-РВ. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси содержащей буфер (40 мМ Трис-НСl рН 8,0, 2,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl); 20 фмоль ДНК; 1 ед. акт. Taq ДНК полимеразы; по 0,5 пмоль каждого из 2 праймеров, меченных каждый своим флуорохромом (донором и акцептором) и соответствующее количество дистиллированной воды. ПЦР-РВ проводили в ДНК амплификаторе модели iCycler iQ (Bio-Rad, США) при следующих условиях: денатурация двуцепочечной ДНК в первом цикле велась при 94 °С в течение 30 сек., затем следовал отжиг праймеров и их удлинение — 45 °С, 10 сек с регистрацией флуоресценции в конце этой стадии, денатурация целевого продукта — 80 °С, 10 сек., Количество циклов — 25. Температура отжига праймеров, а также температура плавления целевых продуктов несколько варьировала в разных экспериментах в зависимости от GC-состава используемых олигонуклеотидов.

Проведение ЛЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I. ЛЦР-РВ проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей буфер (40 мМ Трис-НСl рН 8,0, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 2 мМ спермидина, 5 мМ ДТТ, 0,1 мМ NAD); 20 фмоль ДНК; 30 ед. акт. Tth ДНК-лигазы; по 2 пмоль каждого из 4 олигонуклеотидов, два из которых (2 и 4) были фосфорилированы, и соответствующее количество дистиллированной воды. ЛЦР-РВ проводили в ДНК амплификаторе модели iCycler iQ при следующих условиях: денатурация двуцепочечной ДНК в первом цикле велась при 94 °С в течение 30 сек; отжиг олигонуклеотидов и их лигирование — 37–55 °С, 20 сек., денатурация одинарных дуплексов — 68–82 °С, 10 сек. с регистрацией свечения

интеркалирующего красителя SYBR Green I в конце этой стадии; денатурация двойных дуплексов — 80–90 °С, 10 сек. Количество циклов — 30. Температура отжига и лигирования олигонуклеотидов, а также температура плавления одинарных и двойного дуплексов варьировали в разных экспериментах в зависимости от GC-состава используемых олигонуклеотидов.

Проведение ЛЦР-РВ, основанной на FRET-эффекте. ЛЦР-РВ, основанную на FRET-эффекте, проводили аналогичным образом за исключением того, что отсутствовал этап денатурации одиночных дуплексов, и регистрация свечения велась в конце стадии денатурации двойного дуплекса. Другим отличием было то, что олигонуклеотиды 1 и 2 (или 3 и 4) несли соответствующие флуоресцентные красители (донор и акцептор).

Проведение ГЦР-РВ. ГЦР-РВ проводили изотермически в 30 мкл раствора 1xSSC (0,015 М цитрата натрия + 0,15 М хлористого натрия) при температуре 25 °С в ДНК амплификаторе модели iCycler iQ. Олигонуклеотиды HCR-A и HCR-B-F/Q, взятые в соотношении 3:2 (15 и 10 пмоль), смешивались в 1xSSC, образуя предварительную реакционную смесь. Затем в нее вносился инициаторный олигонуклеотид IniD в количестве 0,1 пмоль. Регистрация увеличения флуоресценции велась в течение 30 мин каждые 30 сек.

Электрофорез продуктов ПЦР, ЛЦР и ГЦР. Электрофоретический контроль продуктов ПЦР-РВ, ЛЦР-РВ и ГЦР-РВ проводили в 8%-ном полиакриламидном геле в трис-ацетатном буфере рН 7,8 в неденатурирующих условиях при градиенте напряжения 4 V на см длины геля в приборе вертикального типа в течение 4 часов. По завершении электрофореза гель после окрашивания бромистым этидием фотографировали в фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc., США).

Результаты и обсуждение

Несмотря на огромное количество всевозможных вариантов ПЦР-РВ, которые можно условно разделить на две группы — высокоспецифичные и низкоспецифичные (в связи с недостатком места объяснения такого деления здесь приводить не будем, тем более, что нами готовится обзорная статья на эту тему), все они принципиально отличаются от разработанного нами расположением праймеров. Пожалуй, главной причиной этого служит некий стереотип мышления, из-за которого считается, что при ПЦР праймеры должны отстоять друг от друга на неком расстоянии. Действительно, когда-то

ПЦР и была предложена для того, чтобы в первую очередь получать новую информацию, скрывающуюся между праймерами, да и для ДНК-диагностики детектировать электрофорезом продукты ПЦР размером около 200 пн в агарозном геле (а не более мелкие в полиакриламидном) было гораздо удобнее. Но ПЦР в реальном времени является по существу самостоятельным методом, в котором размер ампликонов в подавляющем большинстве случаев может и даже, более того, должен быть небольшим. И такими они, надо признать, уже стали. Так, во многих высокоспецифичных вариантах размер амплифицируемого фрагмента ДНК укорочен до 70–80 п.н., 40–50 п.н. из которых приходятся на места отжига праймеров, а остальная последовательность с 2–3-нуклеотидными брешами между праймерами и гибридизационным зондом приходится на эту самую срединную часть в вариантах TaqMan или Beacon, например. Однако и в менее специфичных вариантах без применения гибридизационных зондов их авторам не удалось уйти от этого стереотипа и размеры ампликонов остаются по-прежнему довольно большими. Наиболее короткие продукты ПЦР-РВ упоминаются в недавних работах по низкоспецифичной амплификации ДНК в присутствии нового красителя LCGreen с последующим плавлением ампликонов, где длина фрагментов ДНК довольно критична [31]. Однако в плане укорочения продуктов ПЦР мы пошли дальше всех, и в нашем варианте ПЦР-РВ праймеры отжигаются встык (или иногда почти встык, что зависит от особенностей нуклеотидных последовательностей в конкретном выбранном месте), приводя к наработке целевого продукта ПЦР размером всего около 40 п.н. (рис.1).

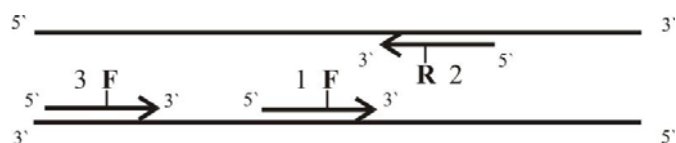


Рис. 1. Схема расположения прямых (1 и 3) и обратного (2) праймеров в варианте ПЦР-РВ с переносом флуоресцентной резонансной энергии между донорным (F) и акцепторным (R) красителями

Другой особенностью праймеров в разработанном нами способе ПЦР-РВ является то, что они несут в своих составах флуоресцентные красители, которые представляют собой пару с перекрывающимися спектрами испускания и возбуждения, и один из них служит донором, а другой — акцептором (в данном случае — FAM и ROX, соответственно), обеспечивая тем самым эффект

флуоресцентного резонансного переноса энергии от первого ко второму, что невозможно в вариантах ПЦР «стандартными» местами отжига праймеров.

В расположении меченных флуорохромами праймеров в такой близости друг от друга есть сразу несколько преимуществ.

Во-первых, еще значительно сокращается время, достаточное для уверенного удлинения праймера на требуемое количество нуклеотидов, и такой этап, как этап элонгации, становится абсолютно не нужным, поскольку построение второй комплементарной цепи ДНК успевает произойти полностью или еще на этапе отжига, или в ходе повышения температуры для осуществления денатурации получившихся ампликонов, что приводит к заметной экономии времени.

Во-вторых, из-за того, что целевой продукт ПЦР имеет небольшой размер около 40 п.н., существенно снижается температура денатурации, при которой цепи ампликона должны разойтись и стать новыми матрицами для отжига праймеров. И здесь есть сразу два важных момента. С одной стороны, это экономия времени вообще, так как переходы от одной температуры к другой не мгновенны, ввиду того, что в ДНК амплификаторах на основе элементов Пелетье скорости нагрева и охлаждения амплификационных блоков ограничены, как правило, тремя — двумя секундами на 1 градус, соответственно, и, следовательно, снижение температуры денатурации с классических 95 °С даже до 80 °С позволяет экономить в каждом цикле порядка 12—15 секунд. Другим важным обстоятельством является сокращение времени пребывания ДНК полимеразы при неоптимальных для работы фермента температурах (имеется в виду, повышенных) и тем самым продлевается время его жизни, обеспечивая в целом более надежную амплификацию.

В-третьих, подобное расположение праймеров способно обеспечить амплификацию довольно коротких фрагментов или, точнее, обломков молекул ДНК или РНК, которые с большей вероятностью могут сохраняться в старых или подвергнувшихся сильному разрушительному воздействию образцах. Бывает, что и для проведения ПЦР в диагностических целях не всегда удается выделить нуклеиновые кислоты (особенно РНК) должного размера, хотя бывают случаи, когда наоборот надо детектировать именно наличие крупных фрагментов ДНК и РНК, более достоверно свидетельствующих о присутствии жизнеспособных вирусов или бактерий, например.

Наконец, в-четвертых, самым главным является то, что подобное расположение праймеров обеспечивает

FRET-эффект, так как позволяет произойти такому переносу энергии, поскольку его эффективность обратно пропорциональна расстоянию между красителем-донором и красителем-акцептором в шестой степени и не может иметь место при привычном расположении праймеров на некотором и тем более значительном удалении друг от друга (рис. 2).

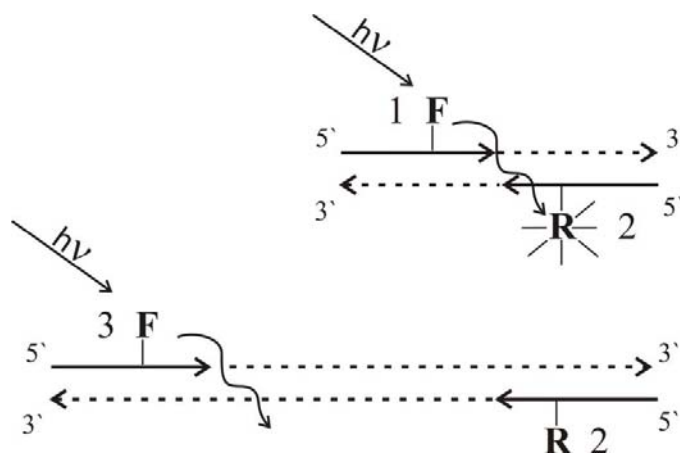


Рис. 2. Схема протекания ПЦР-РВ с переносом флуоресцентной резонансной энергии между донорным (F) и акцепторным (R) красителями. Волнистой стрелкой показан перенос энергии

Из приведенной на рисунке 2 схемы протекания нашего варианта ПЦР-РВ с переносом энергии между праймерами, названного нами UFA (Universal Fluorescent Amplification), видно, что в качестве положительно-отрицательного контроля была проведена амплификация с третьим удаленным праймером, обеспечившим наработку продукта, но не перенос энергии соответственно (рис. 3). В то же время ПЦР-продукты ожидаемых размеров, разделенные электрофорезом в высокопроцентном полиакриламидном геле (данные не показаны), образовались в обоих случаях, что свидетельствует о высокой специфичности такого варианта ПЦР-РВ. В данном конкретном случае расстояние между красителями в составе целевого ампликона было равно 16 п.н., что обеспечило FRET-эффект, тогда как в контрольном образце ПЦР красители располагались друг от друга на расстоянии около 100 п.н., на котором FRET-эффект уже не наблюдается.

Вариант ПЦР-РВ с переносом энергии от праймера к праймеру может найти широкое применение, в том числе, для простой и удобной количественной оценки уровня экспрессии различных генов, содержащих интроны, за счет того, что места отжига праймеров могут

подбираться по краям соседних экзонов с таким расчетом, что при амплификации молекул РНК это приведет к FRET-эффекту, а вклад геномной ДНК, где праймеры будут за счет интрона расположены далеко друг от друга, будет, таким образом, полностью отсечен, поскольку в этом случае переноса энергии не произойдет из-за большего расстояния между красителями, что показано нами на примере генов белков холодового шока капусты.

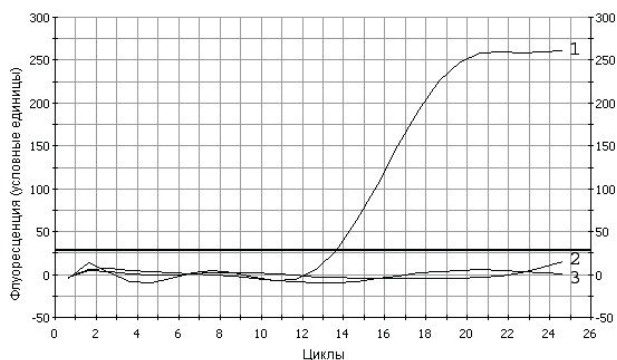


Рис. 3. Кривые роста флуоресценции в варианте ПЦР-РВ с переносом флуоресцентной резонансной энергии между донорным и акцепторным красителями. 1 — праймеры 1 и 2; 2 — праймеры 3 и 2; 3 — праймеры 1 и 2 без матричной ДНК (отрицательный контроль)

Принцип ЛЦР-РВ с детекцией целевых продуктов с помощью FRET-эффекта схематично представлен на рисунке 4. Поскольку на этапе отжига идет одновременно и лигирование, то весь процесс ЛЦР заключается в чередовании двух стадий: денатурации и отжига/лигирования олигонуклеотидов. Так, в отличие от ПЦР, в ЛЦР задействовано четыре олигонуклеотида, два из которых (2 и 4) должны нести на своих 5'-концах фосфатные группы, что осуществлялось нами постсинтетически ферментативно с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 или сразу во время химического синтеза. Эти четыре олигонуклеотида попарно комплементарны друг другу и как бы формируют собой из двух половинок двуцепочечный цельный фрагмент молекулы ДНК, детектировать который они и призваны. В результате этапа отжига и происходящей конкурентной гибридизации формируется ряд структур. Так, в каждом цикле неизбежно формируются одиночные дуплексы (1/4 и 2/3) из комплементарных друг другу олигонуклеотидов-половинок детектируемого фрагмента ДНК, временно не участвующие (в этом конкретном цикле, когда они образовались) в наработке целевого продукта, однако после этапа денатурации они вновь будут готовы конкурировать за мишени-матрицы

ДНК. При этом часть олигонуклеотидов отжигается все же не на комплементарных им одиночных олигонуклеотидах, а на детектируемых исходных молекулах ДНК и на образовавшихся в ходе предыдущих циклов матрицах в виде целевых продуктов из сдвоенных пролигировавшихся олигонуклеотидов. И в тех случаях, когда встык к ним с образованием «ников» отжигаются парные к ним олигонуклеотиды, тогда под действием НАД-зависимой термостабильной ДНК лигазы, работающей как раз в этих самых «никах», происходит их лигирование и образование целевого продукта ЛЦР в виде двойных дуплексов (1/4+2/3), детектировать которые в режиме реального времени оказывается значительно проще, чем гель-электрофорезом. Для этого необходимо, чтобы пара соседних олигонуклеотидов (1 и 2 или 3 и 4) несли соответствующие флуоресцентные красители, составляющие пару донор/акцептор. В результате лигирования они становятся единой цельной цепочкой ДНК, и перенос энергии можно детектировать на стадии денатурации, когда ампликоны представлены в виде одноцепочечных молекул. Как можно видеть, отличительной чертой такой детекции от предложенного нами варианта ПЦР-РВ УФА, где перенос энергии идет с одной цепи ДНК на другую, в ЛЦР-РВ FRET-эффект имеет место на одной цепи ДНК.

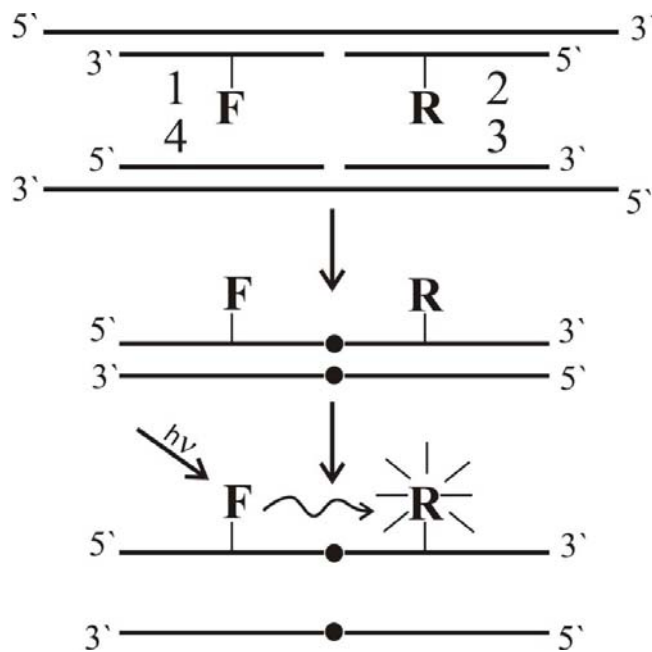


Рис. 4. Схема протекания ЛЦР-РВ с переносом флуоресцентной резонансной энергии между донорным (F) и акцепторным (R) красителями. Волнистой стрелкой показан перенос энергии

Так как НАД-зависимая ДНК-лигаза практически не способна вести тупоконечное лигирование, то нематричного (ложнопозитивного) объединения одиночных дуплексов не происходит, и искомым продуктом, соответственно, в таких случаях не образуется. Хотя, чтобы полностью исключить вероятность этого, отдельными авторами [32, 33] предлагалось использовать олигонуклеотиды с 3'-выступающими концами, заполнить которые ДНК-полимераза (которую в этом случае также надо добавлять в реакцию вместе с соответствующим дНТФ) не может, и только отжиг олигонуклеотидов на матрице с образованием однонуклеотидной брешки позволит полимеразе заполнить этот «пробел», а лигазе затем лигировать получившуюся конструкцию. Нами осуществлены и такие варианты ЛЦР-РВ с брешками, но из-за экономии места описывать их здесь мы не будем.

Для проведения ЛЦР-РВ с детекцией целевых продуктов с помощью красителя SYBR Green I, специфически окрашивающего только двуцепочечную ДНК, необходимо заранее экспериментально определить температуры плавления одиночных и двойного дуплексов с тем, чтобы уже при соответствующей температуре вести подсчет накопления только целевых двуцепочечных пролигировавших продуктов реакции (рис. 5, 6).

Безусловно, серьезный недостаток ЛЦР по сравнению с ПЦР (в ее классическом варианте) заключается в том, что с помощью ЛЦР нельзя получать новые знания об участках генов или прочих фрагментах ДНК, заключенных между местами отжига олигонуклеотидов и могущих быть довольно протяженными, как это возможно в ПЦР путем клонирования и/или секвенирования ограниченных праймерами продуктов амплификации.

Впрочем, при этом надо учитывать, что у методов ПЦР и ЛЦР разное предназначение. ЛЦР всего лишь может дать новые сведения о единичных нуклеотидах, приходящихся на «ник», и здесь она сопоставима с вариантом ПЦР, рассчитанным на удлинение праймера при детекции так называемых «снипов», или SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Что касается использования ЛЦР для целей ДНК-диагностики, то на протяжении почти десятилетия фирмой Abbot (США) продавались коммерческие наборы для обнаружения хламидийной и гонорейной инфекций, причем, во множестве статей [34, 35, 36 и др.] подчеркивалась более высокая чувствительность данной реакции по сравнению с ПЦР. Справедливости ради, следует сказать, что детекция там велась с помощью специального дополнительного прибора LCx Analyzer и являлась по существу комбинацией

ДНК-амплификации с последующим ИФА на микрочастицах.

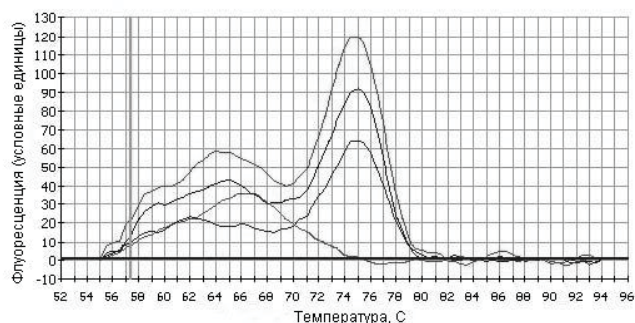


Рис. 5. Определение температур плавления одиночных (1/4 и 2/3) и двойного (1/4+2/3) дуплексов в ЛЦР-РВ в варианте с регистрацией целевых продуктов с помощью красителя SYBR Green I

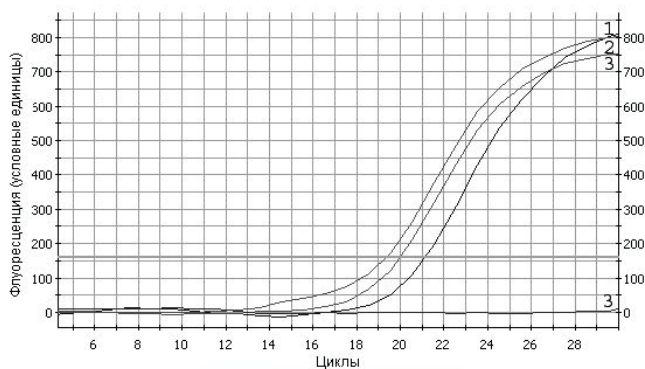


Рис. 6. Типичные кривые роста флуоресценции в вариантах ЛЦР-РВ с регистрацией целевых продуктов с помощью красителя SYBR Green I или с переносом флуоресцентной резонансной энергии между донорным и акцепторным красителями. 1–3 — разные образцы ДНК, 4 — отрицательный контроль (без матричной ДНК)

Касательно ГЦР можно считать, что движущей силой этой ферментативной реакции является временно сокрытая энергия, заключенная в олигонуклеотидных наноструктурах, представляющих собой шпильки с верхушечной петлей размером в 6 звеньев, двуцепочечным стержнем протяженностью в 18 пар нуклеотидов и одноцепочечным участком длиной также в 6 звеньев. Эти 18-звенные участки данных олигонуклеотидов полностью комплементарны друг другу, и можно сказать, что с учетом антипараллельности цепей ДНК одинаковы у обеих структур, а 6-звенные одноцепочечные участки расположены: один на 5'-конце одного, а другой на 3'-конце другого этих относительно сложно устроенных

олигонуклеотидов. При этом петля первой шпильчатой структуры полностью комплементарна выступающему одноцепочечному 6-нуклеотидному участку на 5'-конце второго олигонуклеотида, а петля второй шпильчатой структуры комплементарна такому же участку, только расположенному на 3'-конце первой. В обычных условиях данные олигонуклеотидные конструкции стабильны и в отсутствие инициаторной молекулы эти шпильки сохраняют свою структуру и не вступают в реакцию гибридизации. Однако стоит только добавить молекулу-инициатор, как шпильки раскрываются, «приходят в движение» и начинает происходить последовательный рост цепей ДНК.

С целью преобразования ГЦР в ГЦР-РВ нами были синтезированы соответствующие модифицированные олигонуклеотиды с парой краситель/гаситель (FAM/Dabsyl) (рис. 7), а также различные варианты инициаторных молекул, включая более протяженные по длине, что как бы имитировало случайно фрагментированную ДНК и что не было продемонстрировано американскими авторами [30] ранее, поскольку они обошлись для инициации обычным олигонуклеотидом, причем встык приходящимся к одной из шпилек, что является достаточно невероятным событием в немодельном эксперименте. Первые же наши результаты показали успешное преобразование ГЦР в ГЦР-РВ, где детекция протекания реакции велась в изотермическом варианте по увеличивающейся флуоресценции красителя за счет исчезновения эффекта гашения, что происходило при пошаговом удлинении цепей ДНК и разнесении за счет этого в пространстве пары молекул флуорохром/гаситель (рис. 8).

Не ограничившись одним комплектом олигонуклеотидных шпилек, мы, исходя из того же принципа, сконструировали наноструктуры с другими нуклеотидными последовательностями, взяв в качестве инициаторной молекулы клонированный фрагмент гена нуклеокапсидного белка хантавируса и используя в качестве красителя и гасителя пару ROX/Dabsyl. Как и следовало ожидать, мы получили сходные кривые роста флуоресценции и для красителя ROX в зависимости от времени протекания реакции, температуры и концентрации ингредиентов. Контрольные эксперименты по наблюдению как в ДНК-амплификаторе, так и с помощью гель-электрофореза за поведением олигонуклеотидных шпилек, не показали роста наноструктур из них в отсутствие инициаторных молекул, в том числе в присутствии большого количества чужеродной одноцепочечной (денатурированной) ДНК, подтвердив тем самым высокую специфичность ГЦР.

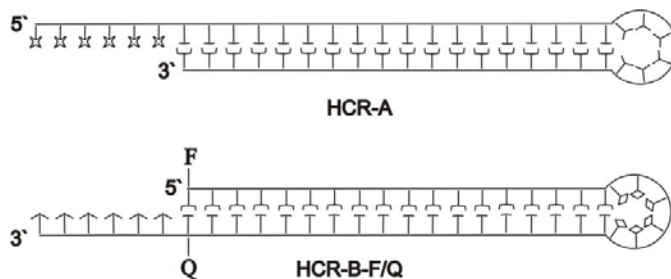


Рис. 7. Шпильчатые наноструктуры для метода ГЦР-РВ. F – флуоресцентный краситель, Q – универсальный гаситель

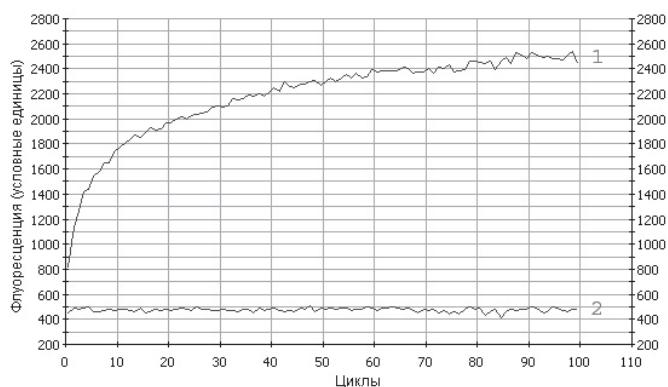


Рис. 8. Кривые роста флуоресценции в варианте ГЦР-РВ. 1 – образец; 2 – отрицательный контроль (без матричной ДНК)

В продолжение экспериментов на специфичность ГЦР, хотя и уже с другой целью, нами была успешно осуществлена мультиплексная ГЦР-РВ, где велась одновременная детекция увеличения свечения обоих красителей FAM и ROX, что свидетельствовало о параллельном росте обеих наноструктур. Другое доказательство высокой специфичности ГЦР было получено нами путем апробирования различных олигонуклеотидов, отличающихся от полностью комплементарного (имитирующего так называемую искомую последовательность нуклеотидов) заменами отдельных (в том числе единичных) оснований, делециями или вставками, на предмет их способности служить инициаторной молекулой, но ни одна из них таковой не стала.

После появления ГЦР «семейство» цепных реакций нуклеиновых кислот (в режиме реального времени, в том числе) расширилось, пополнившись еще одной. Пожалуй, главными принципиальными отличиями ГЦР от ПЦР и ЛЦР является то, что ГЦР протекает изотермически и к тому же без участия каких-либо ферментов. Другое важное отличие ГЦР заключается в том, что имеет место не ам-

плификация специфических фрагментов ДНК, а последние служат инициаторными молекулами, вызывающими процесс самосборки олигонуклеотидных наноструктур в виде последовательного линейного роста цепей нуклеиновых кислот из них. Таким образом, ГЦР-РВ вполне претендует на то, чтобы называться нанотехнологией или, точнее, нанобиотехнологией.

На разработанные нами варианты ПЦР-РВ, ЛЦР-РВ и ГЦР-РВ поданы заявки на получение патентов.

Данная работа проводилась в рамках Программы государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (гранты НШ-2217.2003.4 и РИ-112/001/141).

Литература

- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. // *Biotechnology*. — 1992. — Vol. 10. — P. 413–417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. // *Biotechnology*. — 1993. — Vol. 11. — P. 1026–1030.
- Lee L.G., Connell C.R., Bloch W. // *Nucl. Acids Res.* — 1993. — Vol. 21. — P. 3761–3766.
- Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. // *PCR Methods Appl.* — 1995. — Vol. 4. — P. 357–362.
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1991. — Vol. 88. — P. 7276–7280.
- Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J. // *Biotechniques*. — 1997. — Vol. 22. — P. 176–181.
- Isacsson J., Cao H., Ohlsson L., Nordgren S., Svanvik N., Westman G., Kubista M., Sjoback R., Sehlstedt U. // *Mol. Cell. Probes*. — 2000. — Vol. 14. — P. 321–328.
- Svanvik N., Stahlberg A., Sehlstedt U., Sjoback R., Kubista M. // *Anal. Biochem.* — 2000. — Vol. 287. — P. 179–182.
- Yamane A. // *Nucl. Acids Res.* — 2002. — Vol. 30. — P. e97.
- Tyagi S., Kramer F.R. // *Nat. Biotechnol.* — 1996. — Vol. 14. — P. 303–308.
- Tyagi S., Marras S.A., Kramer F.R. // *Nat. Biotechnol.* — 2000. — Vol. 18. — P. 1191–1196.
- Horejsh D., Martini F., Poccia F., Ippolito G., Di Caro A., Capobianchi M.R. // *Nucl. Acids Res.* — 2005. — Vol. 33. — P. e13.
- French D.J., Archard C.L., Brown T., McDowell D.G. // *Mol. Cell. Probes*. — 2001. — Vol. 15. — P. 363–374.
- French D.J., Archard C.L., Andersen M.T., McDowell D.G. // *Mol. Cell. Probes*. — 2002. — Vol. 16. — P. 319–326.
- Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K., Hohman R.J. // *Nucl. Acids Res.* — 1997. — Vol. 25. — P. 2516–2521.
- Solinas A., Brown L.J., McKeen C., Mellor J.M., Nicol J., Thelwell N., Brown T. // *Nucl. Acids Res.* — 2001. — Vol. 29. — P. e96.
- Huang Y., Kong D., Yang Y., Niu R., Shen H., Mi H. // *Biotechnol. Lett.* — 2004. — Vol. 26. — P. 891–895.
- Todd A.V., Fuery C.J., Impey H.L., Applegate T.L., Haughton M.A. // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46. — P. 625–630.
- Rasmussen T.B., Uttenthal A., de Stricker K., Belak S., Storgaard T. // *Arch. Virol.* — 2003. — Vol. 148. — P. 2005–2021.
- Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. // *Biotechniques*. — 1997. — Vol. 22. — P. 130–131, 134–138.
- Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L. // *Science*. — 1988. — Vol. 241. — P. 1077–1080.
- Wu D.Y., Wallace R.B. // *Genomics*. — 1989. — Vol. 4. — P. 560–569.
- Barany F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1991. — Vol. 88. — P. 189–193.
- Kalin I., Shephard S., Candrian U. // *Mutat Res.* — 1992. — Vol. 283. — P. 119–123.
- Barany F. // *PCR Methods Appl.* — 1991. — Vol. 1. — P. 5–16.
- Birkenmeyer L.G., Mushahwar I.K. // *J. Virol. Methods*. — 1991. — Vol. 35. — P. 117–126.
- Wiedmann M., Wilson W.J., Czajka J., Luo J., Barany F., Batt C.A. // *PCR Methods Appl.* — 1994. — Vol. 3. — P. S51–S64.
- Landegren U. // *Trends Genet.* — 1993. — Vol. 9. — P. 199–204.
- Landegren U., Samiotaki M., Nilsson M., Malmgren H., Kwiatkowski M. // *Methods*. — 1996. — Vol. 9. — P. 84–90.
- Dirks R.M., Pierce N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — Vol. 101. — P. 15275–15278.
- Liew M., Pryor R., Palais R., Meadows C., Erali M., Lyon E., Wittwer C. // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50. — P. 1156–1164.
- Abravaya K., Carrino J.J., Muldoon S., Lee H.H. // *Nucl. Acids Res.* — 1995. — Vol. 23. — P. 675–682.
- Marshall R.L., Laffler T.G., Cerney M.B., Sustachek J.C., Kratochvil J.D., Morgan R.L. // *PCR Methods Appl.* — 1994. — Vol. 4. — P. 80–84.
- Birkenmeyer L., Armstrong A.S. // *J. Clin. Microbiol.* — 1992. — Vol. 30. — P. 3089–3094.
- Schachter J. // *Immunol. Invest.* — 1997. — Vol. 26. — P. 157–161.
- Watson E.J., Templeton A., Russell I., Paavonen J., Mardh P.A., Stary A., Pederson B.S. // *J. Med. Microbiol.* — 2002. — Vol. 51. — P. 1021–1031.

PCR, LCR AND HCR – NUCLEIC ACIDS CHAIN REACTIONS IN THE MODE OF REAL TIME

A.V. CHEMERIS¹, Yu.M. NIKONOROV¹, D.A. CHEMERIS¹, R.R. GARAFUTDINOV¹,
M.L. ROMANENKOVA¹, R.T. MATNIYASOV¹, F.R. GYMALOV¹, G.V. MALEEV²,
V.A. VAKHITOV¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa;*

²*N.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

In first half of 90th a polymerase chain reaction (PCR) after its transformation to a mode of real time (PCR RT) has received a new powerful impulse. For this time different methods of the target product detection under PCR RT are offered many, but all of them have some lacks. We develop an improved, very fast and high-sensitivity procedure of amplicons detection in PCR RT, based on carry of Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) between primers which on the convenience and simplicity noticeably surpasses all current varieties of PCR RT. Also a ligase chain reaction (LCR) for the first time is carried out in real time (LCR RT) where a detection of amplification results was conducted in one case by registration of the fluorescence of dye SYBR Green I, specific to two-stranded DNA, and in other – due to FRET effect between adjacent oligonucleotides. And finally a hybridization chain reaction (HCR), proceeding isothermally, without participation of any enzymes is transformed by us to a mode of real time (HCR RT). At that an amplification of specific DNA fragments does not take place, but they only serve as initiator molecules causing process of self-assembly of the corresponding oligonucleotide nanostructures in the form of consecutive growth of the chains of nucleonic acids from them. Thus during HCR RT at separation in space of pair molecules extinguisher/dye occur an increase in luminescence of the last which is registered.

Keywords: polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR), hybridization chain reaction (HCR), methods, modifications.

ЭКТОПИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *hRub* ЧЕЛОВЕКА (*hRub*) В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ ОКАЗЫВАЕТ РАЗНООБРАЗНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ХАРАКТЕР ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ *IN VITRO*

Е.В. НОВОСАДОВА*, Е.С. МАНУИЛОВА, Е.Л. АРСЕНЬЕВА, Н.В. ХАЙДАРОВА,
О.В. ДОЛОТОВ, Л.С. ИНОЗЕМЦЕВА, О. В. СИТНИКОВА, В.З. ТАРАНТУЛ,
И.А. ГРИВЕННИКОВ

Институт молекулярной генетики РАН, Москва

На модели эмбриональных стволовых (ЭС) клеток мыши исследовали функции неизученного ранее гена человека *hRub*, имеющего гомологию с недавно охарактеризованным геном *rub* мыши, и высоко экспрессирующимся в ВИЧ-ассоциированных лимфомах. Пролиферативная активность ЭС клеток, трансфицированных геном *hRub*, не изменялась. Вместе с тем, при переходе генетически модифицированных ЭС клеток к спонтанной дифференцировке *in vitro* ген *hRub* оказывал индуцирующий эффект как на образование эмбрионидных тел, так и на появление сокращающихся кластеров клеток (кардиомиоцитов). Одновременно наблюдалось ингибирование дифференцировки ЭС клеток по нейрональному пути. Таким образом, эктопическая экспрессия гена *hRub* заметно влияла на характер различных начальных этапов дифференцировки, спонтанно происходящих в ЭС клетках мыши *in vitro*.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, ген *hRub*, трансфекция, транскрипция, дифференцировка.

В последние годы большое внимание исследователей привлекли к себе тотипотентные эмбриональные стволовые (ЭС) клетки млекопитающих. Это связано с целым рядом их уникальных свойств. Во-первых, ЭС клетки являются удобной экспериментальной моделью для исследования фундаментальных проблем биологии развития, таких как дифференцировка и трансдифференцировка клеток в онтогенезе [1, 2]. В определенных условиях культивирования ЭС клетки способны к спонтанной дифференцировке по мышечному, кроветворному, нейрональному и другим путям [3, 4].

Во-вторых, с помощью добавления в культуральную среду различных экзогенных факторов [5, 6] или путем генетической модификаций самих клеток [7, 8] может достигаться направленная дифференцировка ЭС клеток. Клетки, полученные в результате таких искусственных воздействий, приобретают важные дополнительные свойства, которые в перспективе могут

способствовать более успешному их использованию для трансплантологии и клеточной терапии.

В-третьих, в последние годы накапливается все больше данных, указывающих на значительное сходство между свойствами стволовых (в том числе и ЭС) и раковых клеток [9]. В злокачественное перерождение клеток часто вовлечены гены, участвующие в процессах нормального раннего развития организма. Мишенями для многих онкобелков служат белки-регуляторы дифференцировочных процессов, а нарушения дифференцировочных процессов могут приводить к возникновению рака. Показано, например, что мутации в гене *Pu.1*, кодирующем фактор транскрипции, ответственный за ранние этапы дифференцировки миелоидных клеток, является причиной развития острой лейкемии [10, 11]. Все это позволяет использовать ЭС клетки также в качестве модели для изучения механизмов злокачественного перерождения клеток.

Ранее нами с помощью метода вычитающей гибридизации была обнаружена повышенная экспрессия в ВИЧ-инфицированных лимфомах человека и обезьян гена с неизвестной функцией, нуклеотидная последовательность кДНК которого содержалась в базе данных генома человека под кодовым названием KIAA0129 [12, 13]. Было установлено, что этот ген относится к

* Автор для переписки:

© 2005 г. Новосадова Екатерина Вячеславовна,
сотрудник Института молекулярной генетики РАН
Адрес: 123182 Москва, площадь акад. И.В. Курчатова, 2
Тел. (495) 196-02-11,
E-mail: gin66@mail.ru

семейству TRIM (tripartite motif) белков, которое также известно как семейство RBBC [14–16]. Все белки этого семейства имеют общие консервативные домены, состоящие из трех цинк-связывающих доменов: RING (R), B-box 1 (B1) и B-box 2 (B2), сопровождаемые регионом coiled-coil (CC) [15, 16]. Гены этого семейства часто вовлечены в процессы пролиферации и дифференцировки клеток. Однако оставалась неизвестной роль гена KIAA0129 в этих процессах, а также в злокачественном перерождении клеток.

Недавно выяснилось, что ген KIAA0129, высоко экспрессирующийся в некоторых типах лимфом человека и обезьян, имеет высокую степень гомологии (более 80%) с мышинным геном, получившим название *pub* [14]. По этой причине мы назвали его как *hpub*. Ген *hpub* состоит из B-box2, coiled-coil, и B-30 like доменов. Белок, кодируемый этим геном, имеет 2 изоформы TRIM14 α и TRIM14 β и расположен на хромосоме 9q 21-31 [17]. О функциях гена *hpub* человека пока известно очень мало. Кроме того, что он высоко экспрессируется в некоторых типах опухолевых клеток [18], сообщалось, что гомологичный ему ген *pub* мыши является специфическим ингибитором транскрипционного фактора PU.1, который участвует в процессах клеточной дифференцировки при раннем гематопоэзе [14]. В отличие от гена *hpub*, относительно гена PU.1 имеются довольно обширные данные. Установлено, что в модуляции активности гена PU.1 важную роль играет функциональное взаимодействие PU.1 с другими факторами (NF-IL6 β , NF-EM5/Pip, Pub и т.д.). Так, белок Pub физически связывается с PU.1, снижая при этом его активность и тем самым влияет на дифференцировку и пролиферацию гематopoэтических клеток [14]. Сообщалось, что нокаут PU.1 у мышей приводил к гибели новорожденных, связанной с недостатком или полным отсутствием взрослых макрофагов, а также В- и Т-лимфоцитов [14]. При «кондиционном» нокауте гена PU.1 в В-лимфоцитах мыши рождались жизнеспособными [19]. Искусственное подавление экспрессии гена PU.1 в эмбрионных телах (ЭТ) мыши с помощью малой интерферирующей РНК также сказывалось на характере дифференцировки клеток гематopoэтического ряда [20]. Однако при дифференцировке ЭС клеток в культуре образовывались не только клетки гематopoэтического ряда, но и другие популяции соматических клеток [21]. Вместе с тем иные возможные функции гена *pub* пока не изучены. В связи с этим мы исследовали влияние экспрессии гена *hpub* как на формирование ЭТ, так и на процессы образования кардиомиоцитов и нейронов в ходе дифференцировки ЭС клеток *in vitro*.

Материалы и методы

Культивирование ЭС клеток. В работе использовали ЭС клетки мыши линии R1, любезно предоставленные А. Nagy (Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada). Клетки были выделены из бластоцист мышей линии (129/Sv x 129/SvJ) F1, имеющих окраску агутти. Культивирование ЭС клеток проводили при 37 °С и 5% CO₂ в среде альфа-MEM («Sigma», США), содержащей 15% фетальной сыворотки коровы (ФСК) («Gibco», США), 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 2 мМ L-глутамин, заменимые аминокислоты («Gibco», США), нуклеозиды, витамины и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). В качестве питающего (фидерного) слоя для ЭС клеток использовали первичные фибробласты, полученные из эмбрионов мышей на 11–12-е дни эмбрионального развития, пролиферация которых была блокирована митомицином С (5 мкг/мл). Ростовый средой для первичной культуры фибробластов служила среда DMEM («Sigma», США), содержащая 10% ФСК, 2 мМ L-глутамин и антибиотик гентамицин (20 мкг/мл). При культивировании ЭС клеток без фидерного слоя в среду добавляли LIF (фактор ингибирующий лейкемию) («Sigma», США) в конечной концентрации 10 нг/мл, который блокировал спонтанную дифференцировку этих клеток. Пересев клеток со сменой среды осуществляли каждые 3 дня.

Индукция дифференцировки ЭС клеток с образованием ЭТ. Для индукции дифференцировки с образованием эмбрионных тел ЭС клетки изолировали от фибробластов фидерного слоя. Для этого клетки обрабатывали трипсином, центрифугировали, а затем полученную суспензию инкубировали в чашке Петри (d = 60 мм) («Nunc», Дания) в течение 15–30 мин. За это время основная масса фибробластов прикрепляется ко дну чашки, в то время как ЭС клетки остаются в суспензии. Для формирования ЭТ суспензию ЭС клеток переносили на чашку Петри (d = 35 мм) («Nunc», Дания) в количестве 200000 шт, либо на 96-луночную иммунологическую плашку (по 1000 клеток на лунку) и затем помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂). Подсчет количества образованных ЭТ проводили на 3–4-е и 6–8-е сутки с момента появления первых ЭТ.

Плазмиды, использованные для трансфекции ЭС клеток. В работе была использована плаزمида pcDNA3 («Promega», США) и сконструированная на ее основе рекомбинантная плазмида pPB. Рекомбинантная плазмида pPB содержал вставку в pcDNA3 по сайтам HindIII/NotI 4450 п.н. полноразмерной кДНК гена *hpub*

человека (номер в базе данных «Blast 2», gi 15208662). Структура рРВ представлена на рисунке 1.

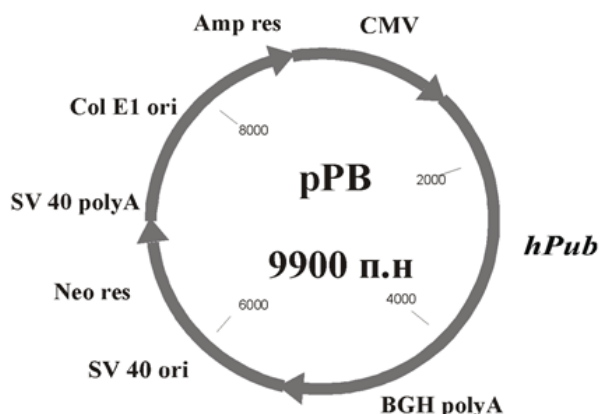


Рис. 1. Схема рекомбинантной плазмиды рРВ для трансфекции ЭС клеток. Рекомбинантная плаزمида (рРВ), сконструированная на основе вектора рсDNA3, несет вставку кДНК гена *hpub* по сайтам рестрикции Hind III-Not I

Плазмидную ДНК выделяли из трансформированных клеток *E. coli* XL1 на колонках с помощью набора реактивов фирмы «Qiagen» (США). Используемую для трансфекции ЭС клеток плазмидную ДНК после переосаждения спиртом растворяли в стерильной воде до конечной концентрации 2 мкг/мкл.

Трансфекция ЭС клеток и селекция. Введение плазмидной ДНК в ЭС клетки осуществляли с помощью электропорации на приборе СУМ4 (производство Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) при следующих экспериментально подобранных параметрах: продолжительность импульса — 1,5 мс, напряжение 400 В. Для трансфекции 1000000 клеток использовали 8 мкг плазмидной ДНК. Трансфицированные клетки рассеивали по 200000 на чашки диаметром 35 мм, покрытые желатином (0,01%), в 2 мл стандартной среды для ЭС клеток. В культуральную среду добавляли LIF (10 нг/мл). Селекцию начинали на вторые сутки после посева добавлением в среду антибиотика G418 (200 мкг/мл). Смену селективной среды проводили каждые 3–4 суток. Поликлональные культуры каждого варианта трансфекции снимали с чашек на 10-й день селекции в виде суммарного пула G418-резистентных клонов.

Оценка уровня экспрессии генов *rub* и *hpub* с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК из недифференцированных ЭС клеток,

которые культивировались без фидерного слоя в присутствии LIF, и из ЭТ выделяли методом фенол хлороформной экстракции с использованием набора YellowSolve («Clonogen», Россия), следуя рекомендациям производителя. Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием набора фирмы «Силекс» (Россия) согласно протоколу и рекомендациям производителя. Синтез кДНК проводили на 0,5 мкг тотальной РНК в течение 1 ч при 37 °С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0,05 мкг случайных гексапраймеров и 100 ед. обратной транскриптазы MMLV (Moloney murine leukemia virus). После остановки реакции (инкубация 10 мин. при 70 °С) образцы кДНК хранили при -20 °С.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из Taq-буфера, 1,5 мМ смеси dNTP, 1,25 ед. «colored» Taq полимеразы («Синтол», Россия), 0,5 мкл образца кДНК и 10 пмоль каждого праймера.

Для гена актина:

5' TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT AAAG 3' (прямой),

5' CCTAGAAGCATTTGCCGGTGCACGATG GAGG 3' (обратный) [22].

Для гена GAPDH:

5' -TCCATGACAACCTTTGGCATTTGTGG-3' (прямой),

5' -GTTGCTGTTGAAGTCGCAGGAGAC-3' (обратный) [23].

Для гена *rub*:

5' CCCATTTGGAAGACGCCG 3' (прямой),

5' AGGGTGGCTCAGCTCCG 3' (обратный) [14].

Для гена *hpub*:

5' -GCAGCAGCACATTTGACAACA-3' (прямой),

5' -TCCACGAGGCCCTTAAAGAA-3' (обратный).

Условия ПЦР для гена *rub* и актина: старт — 5 мин. 95 °С, 25 циклов (β -актин) и 43 цикла (*rub*), включающих 45 сек. при 95 °С; 45 сек. при 62 °С (β -актин) и при 70 °С (*rub*); 45 сек. при 72 °С. Условия ПЦР для гена GAPDH: старт — 2 мин 95 °С, 27 циклов, включающих 95 °С — 1 мин., 66 °С — 45 сек., 72 °С — 45 сек. и для *hpub*: старт — 2 мин. 95 °С, 30 циклов, включающих 95 °С, —1 мин., 60 °С — 45 сек., 72 °С — 45 сек. Праймеры были подобраны на С-концевой участок гена *hpub*, который негомологичен таковому у гена *rub* мыши (ген *hpub* длиннее мышинового гена). Та-

ким образом, исключалась возможность амплификации эндогенного гена *pub* мыши.

Продукты ПЦР разделяли в 1,5% агарозном геле с визуализацией с помощью бромистого этидия, далее с помощью системы BioDocAnalyze («Biometra», ФРГ) определяли интенсивность свечения продуктов (328 п.н. — *pub*, 284 п.н. — β -актина, 376 п.н. — GAPDH, 382 п.н. — *hpub*,) в ультрафиолетовом свете с последующей нормализацией по β -актину.

Анализ пролиферации трансфицированных ЭС клеток. Для определения ростовых характеристик клетки рассеивали по 150000 на чашки диаметром 35 мм, покрытые желатином (0,01%), в 2 мл стандартной среды для ЭС-клеток с добавлением LIF (10 нг/мл). Количество клеток оценивали на 3-и сутки после посева прямым подсчетом под микроскопом Olympus CKX41 («Olympus», Япония) в камере Горяева. Для каждой линии просчитывали не менее 6 чашек.

Анализ дифференцировки ЭС клеток в кардиоциты. ЭС клетки рассеивали на 96-луночные U-образные плашки («Costar», Нидерланды) по 1000 клеток на лунку, в 100 мкл стандартной среды для ЭС клеток без LIF для образования эмбрионидных тел. Подсчет ЭТ с сокращающимися кластерами проводили с 7-го по 12-й день культивирования.

Иммуноцитохимический анализ. Трехдневные ЭТ переносили на 4-луночную плашку ($S=2 \text{ см}^2$) («Nunc», Дания), обработанную желатином, по 8–10 тел на лунку в 2 мл стандартной среды для культивирования ЭС клеток. Частичную смену среды проводили каждые 2–3 дня. На 20-й день культивирования клетки фиксировали 4% параформальдегидом. После трехкратной отмывки 1x PBS, для уменьшения неспецифического связывания, лунки обрабатывали раствором PBS, содержащим 0,1% Triton X100 и 5% ФСК (PBS-T-FBS), в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли первичные антитела к β -III тубулину («Proteome», США), в разведении 1:500 и инкубировали при +4 °C в течение ночи. После трехкратной отмывки раствором PBS-T-FBS вносили биотинилированные вторичные антитела к Ig мыши в разведении 1:500 и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем после трехкратной отмывки PBS-T-FBS вносили пероксидазу, конъюгированную со стрептавидином («ИМТЕК», Россия), в разведении 1:100. Инкубировали 1 ч при комнатной температуре и после трехкратной отмывки раствором PBS-T-FBS вносили 0,2%-ный раствор субстрата 3-амино-9-этилкарбозола («Sigma», США) в ДМСО. Визуальный контроль за развитием окраши-

вания осуществляли под микроскопом Olympus CKX41 («Olympus», Япония). Для остановки реакции клетки 3–4 раза промывали дистиллированной водой.

Статистический анализ. Результаты обрабатывались с помощью программы «Sigma Plot», «Jandel Scientific», США. Достоверность различий групповых средних значений оценивалась с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Результаты представлялись в виде стандартной ошибки среднего ($\text{mean} + \text{SEM}$). Достоверными считались значимости различий при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Получение и характеристика трансфицированных клеточных культур. Для изучения функции гена *hpub* человека, высокоэкспрессирующегося в некоторых типах лимфом, были использованы ЭС клетки мыши линии R1. На первом этапе работы были проведены эксперименты по определению методом ОТ-ПЦР уровней экспрессии эндогенного гена *pub* как в исходных ЭС клетках, так и в сформированных ими ЭТ. Согласно полученным данным, ген *pub* начинает экспрессироваться уже в ЭС клетках, однако уровень экспрессии этого гена в ЭТ существенно повышается по сравнению с ЭС клетками (рис 2 а, б). Таким образом, в ходе нормальной дифференцировки ЭС клеток экспрессия эндогенного гена *pub* усиливается.

В результате трансфекции ЭС клеток вектором *pcDNA3* или рекомбинантной плазмидой *pPB*, содержащей кДНК гена *hpub* (см. Материалы и методы), с последующей селекцией трансфектантов были получены две линии ЭС клеток: ES-*hPub* (линия с конститутивно экспрессирующимся геном *hpub*) и ES-DNA3 (контрольная линия, трансфицированная вектором *pcDNA3*). Согласно данным ОТ-ПЦР, в поликлональной линии ES-*hPub* синтез мРНК гена *hpub* происходил как в клеточной культуре, так и в ЭТ, образующихся из них в ходе дифференцировки. В то же время в контрольных клетках и образующихся из них ЭТ наличие мРНК гена *hpub* не было обнаружено (рис. 3).

Сравнение пролиферативной активности опытных и контрольных клеток не выявило достоверных различий между ними (рис. 4). Полученные результаты позволяют заключить, что повышенная экспрессия гена *hpub* не играет существенной роли в регуляции пролиферации ЭС клеток.

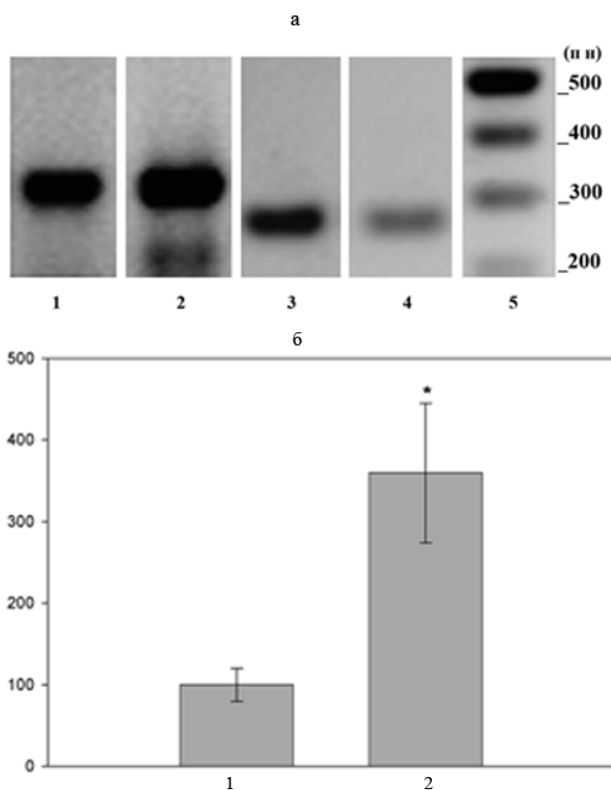


Рис. 2. Анализ экспрессии эндогенного гена *rub* в недифференцированных ЭС клетках мыши линии R1 и ЭТ методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР.

а) ОТ-ПЦР с праймерами на ген *rub* и β -актин мыши: 1 – экспрессия гена *rub* в ЭС клетках, 2 – экспрессия гена *rub* в ЭТ, 3 – экспрессия гена β -актина в ЭС клетках, 4 – экспрессия гена β -актина в ЭТ, 5 – маркер длин фрагментов «100 bp DNA Ladder».

б) Результаты полуколичественного анализа данных по уровню экспрессии гена *rub* в недифференцированных ЭС клетках мыши и ЭТ: 1 – ЭС клетки, 2 – ЭТ. По оси абсцисс – уровень мРНК *rub* в процентах. Нормализация по β -актину. * $p < 0,05$

в контроле (рис. 5а). Различия в количестве образовавшихся ЭТ сохранялось и через 6 дней культивирования, хотя разница между опытом и контролем уменьшалась и составляла не более 40% (рис. 5б).

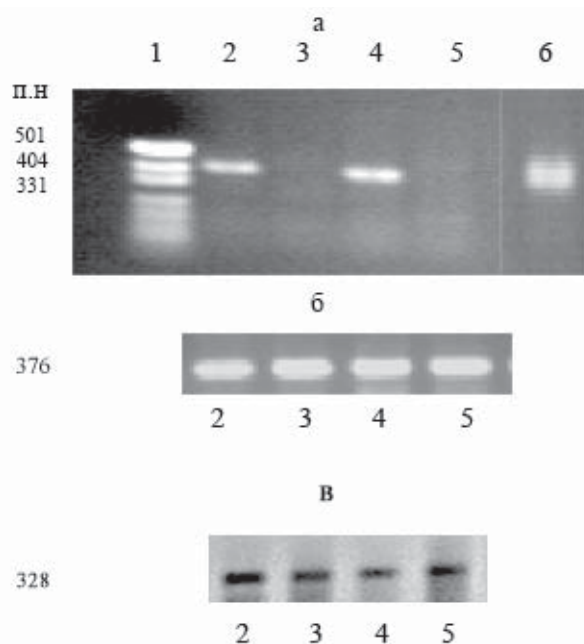


Рис. 3. Анализ экспрессии экзогенного гена *hRub* в стабильно трансфицированных недифференцированных ЭС клетках и ЭТ методом обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР.

а) ОТ-ПЦР с праймерами на ген *hRub*: 1 – Маркер pUC19/Msp1, 2 – ЭС клетки линии ES-hRub, 3 – ЭС клетки линии ES-DNA3, 4 – ЭТ-hRub (ЭТ, образованные из клеток линии ES-hRub), 5 – ЭТ-DNA3 (ЭТ, образованные из клеток линии ES-DNA3), 6 – плаزمида pRB, содержащая вставку гена *hRub* человека (положительный контроль).

б) ОТ-ПЦР с праймерами на ген GAPDH: 2 – ES-hRub, 3 – ES-DNA3, 4 – ЭТ-hRub, 5 – ЭТ-DNA3.

в) ОТ-ПЦР с праймерами на ген *rub*: 2 – ЭС клетки линии ES-hRub, 3 – ЭС клетки линии ES-DNA3, 4 – ЭТ-hRub (ЭТ, образованные из клеток линии ES-hRub), 5 – ЭТ-DNA3 (ЭТ, образованные из клеток линии ES-DNA3)

Таким образом, очевидно, что, не оказывая влияния на пролиферацию ЭС клеток, ген *hRub* существенно воздействует на формирование ЭТ.

Оценка влияния экспрессии гена *hRub* на дифференцировку ЭС клеток в кардиомиоциты и нейрональные предшественники. Как уже указывалось, продукт гена *rub*, взаимодействуя с транскрипционным фактором PU.1, принимает участие в гематопоэзе, бло-

кируя транскрипционную активность фактора PU.1 [14]. Однако оставалось неясным влияние гена *rub* на другие пути дифференцировки, в частности, на формирование кардиомиоцитов и нейрональных клеток.

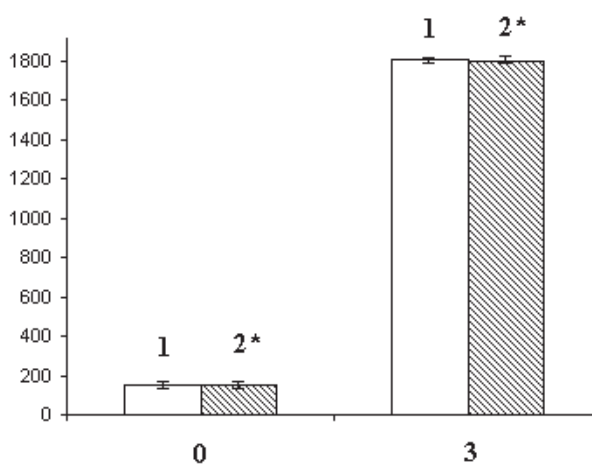


Рис. 4. Влияние повышенной экспрессии гена *hRub* на пролиферативную активность ЭС клеток. 1 – ЭС клетки линии ES-DNA3 (контроль), 2 – ЭС клетки линии ES-hRub.

Посев клеток осуществляли по 180000 на чашку d=35 мм (см. раздел «Материалы и методы»). Подсчет клеток проводился на 3-и сутки культивирования. По оси ординат – число клеток, по оси абсцисс – время культивирования (сутки). * $p < 0,01$

Одной из важнейших характеристик кардиомиоцитов является их ритмическое сокращение. В нашей работе мы оценивали время появления и количество сокращающихся кластеров клеток в ЭТ и показали, что среди ЭТ, образованных клетками, трансфицированными геном *hRub*, первые сокращающиеся структуры появлялись на 3 суток раньше, а их количество было примерно в 4 раза больше, чем в контрольной линии ES-DNA3 (табл. 1). Это позволяет заключить, что экспрессия гена *hRub* существенно ускоряет процесс дифференцировки ЭС клеток в кардиомиоциты.

На следующем этапе с помощью иммуноцитохимии мы исследовали влияние гена *hRub* на нейрональную дифференцировку ЭС клеток. Для этого были использованы антитела к специфическому нейрональному маркеру – β -III тубулину. В результате проведенных экспериментов было показано, что в культуре клеток, несущих экзогенный *hRub* (ES-hRub), по сравнению с контрольными клетками (ES-DNA3), количество тубулин-положительных клеток существенно уменьшалось (рис. 6).

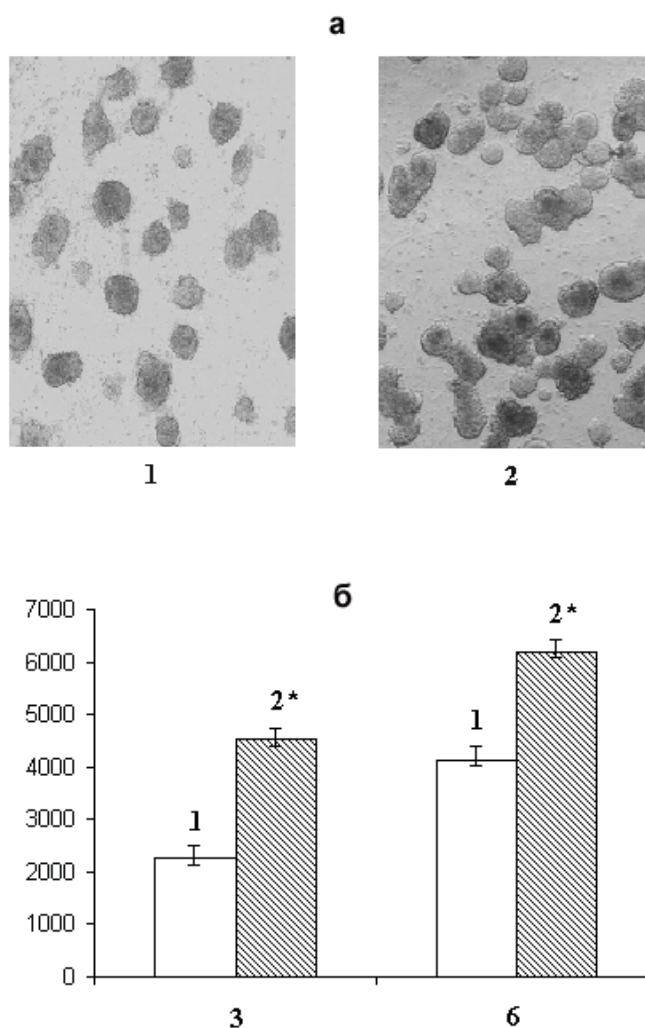


Рис. 5. Влияние повышенной экспрессии гена *hRub* на образование ЭТ в культуре ЭС клеток.

а) Фотографии ЭТ в культуре (x200): 1 – ЭТ-DNA3 (3-и сутки после посева клеток линии ES-DNA3), 2 – ЭТ-hRub (3-и сутки после посева клеток линии ES-hRub).

б) Гистограмма количества ЭТ в трансфицированных культурах ЭС клеток: 1 – ЭТ-DNA3 (контроль), 2 – ЭТ-hRub. Подсчет количества образованных ЭТ проводился на 3- и 6-е сутки после посева клеток. По оси ординат – число ЭТ, по оси абсцисс – время культивирования (сутки). * $p < 0,05$

Таким образом, нами впервые показано разнонаправленное влияние гена *hRub* на дифференцировку ЭС клеток в кардиомиоциты и нейрональные предшественники *in vitro*. Установленное ранее ингибирующее действие продукта гена *rub* на транскрипционный фактор PU.1 [14] предполагает его влияние на дифференцировку гематопоезических клеток [20]. Представленные результаты позволяют предположить, что ген *hRub* может оказывать

также воздействие на характер ранних стадий спонтанной дифференцировки ЭС клеток *in vitro*. В дальнейшем представляется интересным выяснить количественные соотношения между различными направлениями дифференцировки (гематopoэтическая, нейрональная, мышечная и др.) ЭС клеток как с повышенной, так и с пониженной экспрессией гена *hRub*.

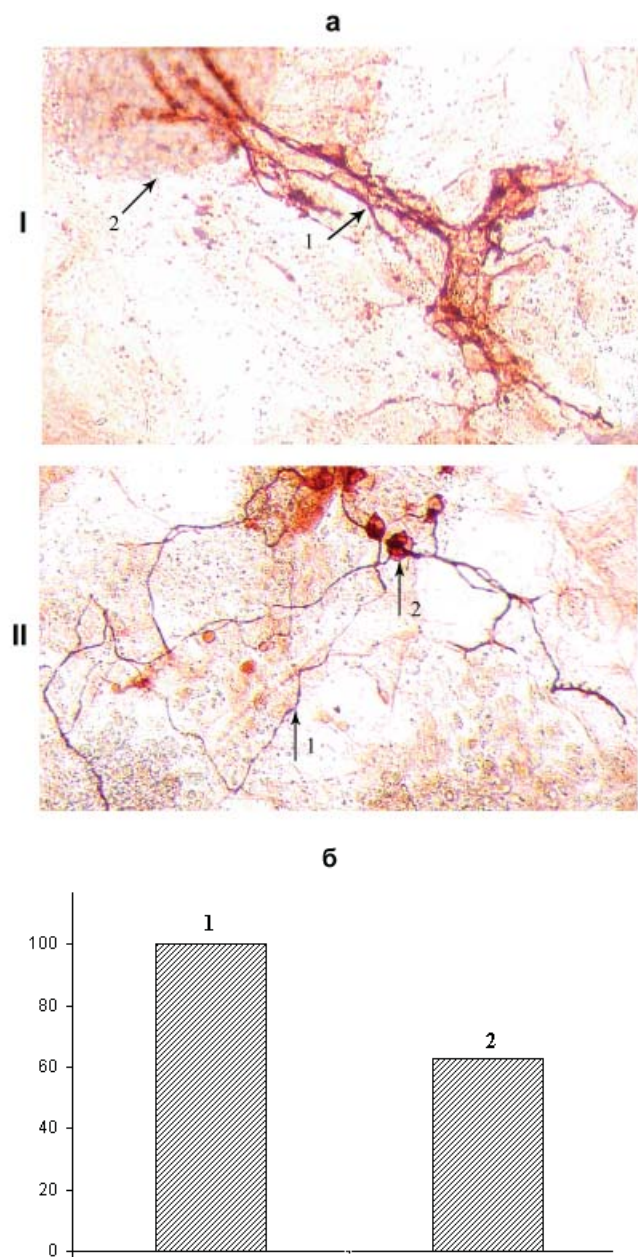


Рис. 6. Влияние повышенной экспрессии гена *hRub* на процессы нейрональной дифференцировки ЭС клеток *in vitro*. а) Иммуноцитохимическое окрашивание ЭС клеток антителами к β -III тубулину на 20-е сутки после посева (x200). I – ES-DNA3 (контроль), стрелками обозначено: 1 – нейрональные отростки, 2 – эмбрионное тело; II – ES-hRub (клетки, трансфицированные геном *hRub*), стрелками обозначено: 1 – отросток нейрона, 2 – тело нейрона

б) Гистограмма количества нейронов в трансфицированных культурах ЭС клеток на 20-е сутки после посева. По оси ординат – процент нейронов на лунку, за 100% принято количество нейронов в контрольном варианте (линия клеток ES-DNA3). 1 – ES-DNA3 (контроль), 2 – ES-hRub

Таблица 1

Эффективность образования кластеров сокращающихся кардиомиоцитов в культуре ЭС клеток с повышенной экспрессией гена *hRub*

Дни культивирования	ЭТ-hRub	ЭТ-DNA3
7	3+1	0
8	4+1	0
9	8+2	0
10	13+2	2+1
11	26+3	5+2
12	33+1	8+1

Примечание. Клетки высевали на 96-луночные планшеты по 1000 клеток на лунку, в 100 мкл среды. Подсчет производили с момента появления первых сокращающихся кардиомиоцитов. В таблице представлены средние значения количества кардиомиоцитов на плашку. Значения, приведенные в таблице, представляют собой результаты трех независимых экспериментов

Постепенно накапливаются данные, свидетельствующие о том, что возникновение опухолевых клеток связано, скорее всего, не столько с нарушениями процесса клеточной пролиферации, сколько с аномалиями дифференцировки клеток [24]. Поскольку, согласно приведенным в настоящей работе данным, ген *hRub* вовлечен в разнообразные дифференцировочные процессы, происходящие на самых начальных этапах развития ЭС клеток, можно предположить, что он при определенных условиях (например, при повышенной экспрессии) может иметь онкогенный потенциал. В пользу этого свидетельствуют и наши данные о повышенной экспрессии гена *hRub* в некоторых типах лимфом у человека и обезьян [13, 18].

Авторы выражают благодарность Тищенко Н.А. за техническое обеспечение работы.

Данная работа была осуществлена при поддержке грантов РФФИ № 00-04-55055, № 04-04-48904 и гранта Президиума РАН по программе «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. *Prelle K., Vassiliev I.M., Vassilieva S.G., Vassilieva S.G., Wolf E., Wobus A.M.* // Cell. Tiss. Organ. – 1999. – Vol. 165. – P. 220–236.
2. *Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Douglas A.M., and Benvenisty N.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 165. – P. 11307–11312.
3. *Guan K., Rohwedel J., Wobus A.M.* // Cytotechnology. – 1999. – Vol. 30. – P. 211–226.
4. *Rohwedel J., Maltsev V., Bober E., Arnold H.H., Hescheler J., and Wobus A.M.* // Development Biology. – 1994. – Vol. 164. – P. 87–101.
5. *Hughes S.* // J. Pathol. – 2002. – Vol. 197. – P. 468–478.
6. *Klug M.G., Soonpa M.H.* // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 98. – P. 216–224.
7. *Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В., Шугурова И.М., Горностаева С.Н., Иноземцева Л.С., Катруха А.Г., Гривенников И.А., Тарантул В.З.* // Онтогенез. – 2003. – Т. 34. – С. 204–210.
8. *Armstrong L., Saretzki G., Peters H., Wappler I., Evans J., Hole N., von Zglinicki T., Lako M.* // Stem cells. – 2005. – Vol. 23. – P. 516–529.
9. *Sell S.* // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2004. – Vol. 51. – P. 1–28.
10. *Rosmarin A.G., Yang Z., Resendes K.K.* // Exp. Hematol. – 2005. – Vol. 33. – P. 131–143.
11. *Walter M.J., Park J.S., Lau S.K.M., McLellan M., Jaeger S., Wilson R.K., Mardis E.R., and Ley T.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 12513–12518.
12. *Tarantul V.Z., Nikolaev A.I., Martinenko A.V., Hannig H., Hunsmann G., Bodemer W.* // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2000. – Vol. 16. – P. 173–179.
13. *Tarantul V.Z., Nikolaev A.I., Hannig H., Maximov V., Nenasheva V., Hunsmann G., Bodemer W.* // Neoplasia. – 2001. – Vol. 3. – P. 132–142.
14. *Hirose H., Nishizumi H., Sakano H.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 311. – P. 351–360.
15. *Reddy B.A., Etkin L.D., Freemont P.S.* // Trends Biochem. Sci. – 1992. – Vol. 17. – P. 344–345.
16. *Borden, K.L.* // Biochem. Cell Biol. – 1998. – Vol. 76. – P. 351–358.
17. *Reymond A., Germana M., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganelli D., Zanaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti F., Minucci S., Pelicci P.G., and Ballabio A.* // EMBO J. – 2001. – Vol. 20. – P. 2140–2151.
18. *Nenasheva V.V., Nikolaev A.I., Martynenko A., Tarantul V.Z.* // Int. J. Med. Sci. – 2005. – Vol. 2. – P. 122–128.
19. *Polli M., Dakic A., Light A., Wu L., Tarlinton D.M., Nutt S.L.* // Blood. – 2005. Jun.2. [Epub ahead of print].
20. *Zou G.M., Chen J.J., Yoder M.C., Wu W., Rowley J.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. Sep 1 [Epub ahead of print].
21. *Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.* // Stem cells. – 2001. – Vol. 19. – P. 193–204.
22. *Crist S.A., Griffith T.S., and Ratliff T.L.* // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 35950–35958.
23. *Tabuchi A., Sakaya H., Kisukeda T., Fushiki H.* // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 35920–35931.
24. *Harris H.* // Bioessays. – 2005. – Vol. 27. – P. 833–838.

ECTOPIC EXPRESSION OF THE HUMAN GENE PUB (HPUB) IN EMBRYONIC STEM CELLS OF THE MOUSE IS RENDERED WITH VARIOUS INFLUENCE ON CHARACTER OF THEIR DIFFERENTIATION IN VITRO

E.V. NOVOSADOVA, E.S. MANUILOVA, E.L. ARSENYEV, N.V. HAJDAROVA, O.V. DOLOTOV,
L.S. INOZEMTSEVA, O.V. SITNIKOVA, V.Z. TARANTUL, I.A. GRIVENNIKOV

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

On model of embryonic stem cells (ESC) of the mouse the functions of not studied before a human gene pub (hpub) were investigated. Hpub has homology with recently characterized murine gene pub, and is highly expressed in a HIV-associated lymphomas. Proliferative activity of ESC, transfected by a gene hpub, did not change. At the same time, at transition of genetically modified ESC to a spontaneous differentiation in vitro the gene hpub rendered an inducing effect both on formation of embryoid bodies, and on occurrence of reduced clusters of cells (cardiomyocytes). The inhibition of ESC differentiation on neuronal pathway was simultaneously observed. Thus, ectopic expression of hpub noticeably influenced on character of the various initial stages of the differentiation spontaneously occurring in ESC of the mouse in vitro.

Keywords: embryonic stem cells, gene hpub, transfection, transcription, differentiation.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РЕДИСА (*RAPHANUS SATIVUS* L.) ГЕНАМИ Т-ДНК АГРОБАКТЕРИЙ: ИЗМЕНЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО ФЕНОТИПА И РЕАКЦИИ НА ФИТОГОРМОНЫ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

И.Е. ДОДУЕВА*, Н.В. ФРОЛОВА, М.А. ВЛАСЕНКО, В.А. МОНАХОВА, Л.А. ЛУТОВА

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции

В связи с остротой вопроса о безопасности трансгенных растений одной из важных задач биотехнологии является изучение горизонтального переноса генов (ГПГ) от агробактерий к растениям как примера естественного трансгеноза. Единственный подробно изученный пример такого ГПГ — гомологи генов Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* в геномах представителей рода *Nicotiana*. Показано, что экспрессия этих генов играет роль в индукции опухолеобразования у межвидовых гибридов табака. Нами получены данные, позволяющие предположить наличие гомологов агробактериальных генов в геномах инбредных линий редиса, многие из которых также характеризуются генетически детерминированным опухолеобразованием. При трансформации линий редиса отдельными генами Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* и *Agrobacterium tumefaciens* получены трансгенные растения с изменениями опухолевого фенотипа и повышенной чувствительностью к ауксинам и цитокининам. Эти данные подтверждают наше предположение о роли экспрессии гомологов агробактериальных генов в опухолеобразовании у редиса.

Ключевые слова: трансгенные растения, агробактериальная трансформация, генная инженерия, опухолеобразование, фитогормоны

В связи с широким применением трансгенных растений в разных отраслях промышленности и сельского хозяйства возник вопрос о безопасности растений, экспрессирующих чужеродные гены. В то же время известны примеры естественного трансгеноза, то есть фактически создания трансгенных организмов без участия человека. Речь идет о горизонтальном переносе генов (ГПГ) от одного вида к другому. Известно, что значительная часть используемых в настоящее время трансгенных растений создана с помощью векторов на основе плазмид агробактерий. Это уникальная группа фитопатогенных бактерий, использующих стратегию генетической колонизации, при которой имеет место встраивание участка бактериальной ДНК — Т-ДНК в геном растения-хозяина. В некоторых случаях Т-ДНК может стабильно встраиваться в геном растения и наследоваться в ряду поколений [10].

Возможно, ГПГ от агробактерий к растениям имел место на ранних этапах эволюции растительного мира

[17]. В геномах всех изученных групп растений имеются гены изопентилтрансферазы (*ipt*) — фермента, катализирующего первую стадию биосинтеза цитокининов. Для них характерен высокий процент гомологии к гену *ipt* *Agrobacterium tumefaciens* [17]. Возможно, растительные *ipt* гены являются результатом такого ГПГ; также вполне вероятно, что агробактерии получили свой *ipt* ген в результате ГПГ от растений.

В настоящее время наиболее хорошо изученным примером ГПГ от агробактерий к растениям являются последовательности с высокой гомологией к генам Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* в геномах представителей рода *Nicotiana*. Это гомологи *rol*-генов, функцией которых является повышение чувствительности тканей растения-хозяина к ауксинам и цитокининам, а также генов ORF13 и ORF14, точная функция которых не установлена [12]. Впервые гомологи агробактериальных генов были обнаружены у *Nicotiana glauca* [18], в дальнейшем — и у других представителей этого рода. По данным последних лет, в геномах более чем 40 видов рода *Nicotiana* обнаружены последовательности, имеющие 70–90 % гомологии с *rol* и ORF генами *Agrobacterium rhizogenes* [10]. Предполагается, что ГПГ произошел на ранних этапах эволюции рода *Nicotiana* при поражении предковой формы агробактериями [8]. Установлено,

* Автор для переписки:

© 2005 г. Додуева Ирина Евгеньевна,
кафедра генетики и селекции

Санкт-Петербургского государственного университета,
Адрес: 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9,
Тел./факс: (812)328-15-90,

E-mail: Wildtype@yandex.ru

что межвидовые гибриды от скрещивания видов табака, несущих гомологи агробактериальных генов, с видами без этих гомологов характеризуются генетически детерминированным опухолеобразованием, которое напоминает гиперплазии, вызванные агробактериями. Гибриды характеризуются также повышенным содержанием ауксинов и цитокининов и повышенной чувствительностью к ним. Имеются данные в пользу того, что экспрессия гомологов агробактериальных генов играет роль в индукции опухолеобразования у межвидовых гибридов табака [18].

Итак, значительная часть представителей рода *Nicotiana*, по сути, является трансгенными растениями, полученными без участия человека. Важной проблемой является поиск других примеров ГПГ от агробактерий к растениям как примеров естественного трансгеноза. На кафедре генетики и селекции СПбГУ проводится работа по поиску гомологов агробактериальных генов в геномах культурных и дикорастущих видов растений; получен ряд положительных результатов. Например, имеются данные в пользу наличия гомологов генов ORF13 и ORF14 *Agrobacterium rhizogenes* в геномах инбредных линий генетической коллекции редиса. По аналогии с межвидовыми гибридами табака значительная часть линий редиса способна к формированию генетически детерминированных опухолей, а также обладает повышенным содержанием ауксинов и цитокининов и повышенной чувствительностью к ним [11].

Одним из направлений работы по изучению ГПГ от агробактерий к растениям является моделирование ГПГ в лабораторных условиях. В качестве модели в этих экспериментах были использованы высокоинбредные линии редиса. Генетическая коллекция редиса *Raphanus sativus* var. *Radicola Pers.* поддерживается в лаборатории геномной и клеточной инженерии растений БиНИИ СПбГУ с 60-х годов XX века [3]. В настоящее время линии представляют собой стабильный генетический материал 35–40-го поколений инбридинга. Линии редиса различаются по комплексу морфологических и биохимических признаков интактных растений, а также по регенерационным показателям *in vitro* [1, 2]. Мы проводили трансформацию опухолевых и безопухолевых линий редиса штаммами агробактерий, несущими отдельные гены *Agrobacterium rhizogenes* и *Agrobacterium tumefaciens*, после чего оценивали связь наличия и экспрессии вставки с изменениями опухолевого фенотипа и гормонального статуса трансгенных растений.

Следует отметить, что редис плохо поддается традиционным способам агробактериальной трансформации *in vitro*. В связи с этим важным этапом работы

была разработка методов трансформации этого растения. В последние несколько лет зарубежными учеными был опубликован ряд работ, посвященных разработке методов трансформации культурных представителей рода *Raphanus* — редьки и редиса. Были получены положительные результаты при использовании метода *floral-dip* [9], ультразвуковой и вакуумной инфильтрации культуры агробактерий в прорастающие семена [14]. В нашей лаборатории был разработан и успешно применен метод трансформации завязи цветка редиса [6]. С использованием этого метода были впервые получены трансгенные растения безопухолевой линии редиса, несущие ген биосинтеза цитокининов *ipt* *Agrobacterium tumefaciens* под промотором 35S. Часть трансгенных растений формировала опухоли как у интактных растений в поле, так и в условиях *in vitro*. С использованием этого метода была создана коллекция трансгенных растений редиса со вставками гена *ipt* *Agrobacterium tumefaciens* и *rol*-генов *Agrobacterium rhizogenes*, которая представлена сейчас 2–3 поколениями трансформантов. Тем не менее важной задачей остается подбор других, менее трудоемких в исполнении методов трансформации редиса.

Материал и методы

Материал. Материалом для работы послужили высокоинбредные линии генетической коллекции редиса. В данной работе были использованы три безопухолевые и одна опухолевая линии (табл. 1).

Таблица 1

Использованные в работе инбредные линии редиса

Линия	Фенотип	Опухоле- образова- ние	Чувстви- тельность к фитогормо- нам
3	корнеплод красный, удлиненный, цветок светло-розовый	-	-
6	корнеплод белый, удлиненный, цветок белый	-	-
19	корнеплод красный, круглый, цветок ярко-розовый	+	+
30	корнеплод красный, круглый, цветок белый	-	-

Для трансформации линий редиса были использованы агробактериальные штаммы, любезно предоставленные профессором Т. Шмюллингом (Т. Schmulling, Institute of Biology, Applied Genetics, Freie Universitaet Berlin, Berlin, Germany), несущие следующие векторы (табл. 2) [15, 16].

Таблица 2

Использованные в работе штаммы агробактерий

Вектор	Маркерный ген чувствительности к антибиотикам	Ген Т-ДНК агробактерии	Источник
ρ GV3850	$P_{nos-npt2}$	$\rho 35S\text{-ipt}$	Schell, 1982
ρ CV002	$P_{nos-npt2}$	rolC	Schmulling et al., 1988
ρ CV002	$P_{nos-npt2}$	rolB+rolC	Schmulling et al., 1988

Методы трансформации редиса. Для получения трансгенных растений редиса были использованы три метода трансформации:

1. *Трансформация завязи цветка.* Ночную культуру агробактерии, разведенную в 5–10 раз жидкой средой LB, стерильной микробиологической петлей наносили на рыльца пестиков цветков редиса в поле, после чего все соцветие помещали под изолятор из пергаментной бумаги для самоопыления.
2. *Инъекция ночной культуры агробактерии в апекс проростка.* Проводили инъекцию разведенной в 5–10 раз ночной культуры агробактерии в апекс трехдневных проростков редиса, выращенных в почве, с помощью шприца. После достижения стадии розетки молодые растения пересаживали в поле. В период цветения проводили постановку изоляторов для самоопыления.
3. *Инъекция ночной культуры агробактерии в апекс зародыша.* Проводили инъекцию разведенной ночной культуры в апексы стерильных зародышей, извлеченных из семян, с помощью стерильной препаративной иглы. После этого зародыши помещали для регенерации на среду Мурасиге и Скуга (MS) [4] с цитокинином БАП и клафораном, через 3–4 дня их пересаживали на среду MS0 без гормонов и с клафораном. После развития достаточной для поддержания жизни массы корней молодые растения пересаживали из асептической культуры в почву.

В таблице 3 приводятся данные об использовании определенных методов трансформации и штаммов агробактерий для трансформации разных линий редиса.

Таблица 3

Использование разных методов трансформации на линиях редиса

Линия	Ген Т-ДНК агробактерии	Метод трансформации
3	rolC, rolB+rolC	1, 2, 3
6	rolC, rolB+rolC	1, 2, 3
19	ipt	1
30	ipt	1

Детекция перенесенных генов методом ПЦР

Растения T_1 – T_3 , полученные от трансформации завязи, а также побеги T_0 , полученные от трансформации апексов, были проанализированы на наличие вставки методом ПЦР с праймерами к гену *npt2*, а также с праймерами к целевым генам (*ipt*, *rolC*, *rolB*). ДНК трансформантов и родительских линий редиса была выделена из молодых листьев растений, выращенных в полевых условиях, с помощью СТАБ-метода [5]. Для ПЦР были использованы следующие последовательности праймеров:

npt2: GTCGTCTGGTCGGTCATTTCG
GTGATCTCACSTTGCTCCTGCC
ipt: TATTCCGCCACAAGTTACCCGACCA
CTGTTGGCGCGCATGGATGAAATA
rolC: CCATTAGCCGATTTGCAAACCTTGCA
CATGGCTGAAGACGACCTGTGTTC
rolB: CAATGGATCCCAAATTGCTATTCC
CGGCTTTAGGCTTCTTTCTTGAGG

Анализ экспрессии перенесенных генов методом ОТ-ПЦР. Наличие или отсутствие экспрессии вставки оценивали с помощью метода ОТ-ПЦР. Тотальная РНК трансформантов и родительских линий редиса была выделена из молодых листьев редиса с помощью гуанидинтиоцианата [5]. На матрице тотальной РНК была синтезирована кДНК с использованием набора «ОТ-ПЦР, версия с олиго-dT-праймерами» фирмы «Силекс-М». Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР с праймерами к маркерному гену *npt2* и целевым генам *ipt*, *rolB*, *rolC*.

Изучение чувствительности к ауксинам и цитокининам *in vitro* у трансгенных растений и инбредных линий редиса. С помощью метода асептической

культуры изолированных органов растений *in vitro* была изучена реакция трансгенных растений и родительских линий редиса на экзогенные цитокинины и ауксины.

Для получения асептического материала семена редиса стерилизовали 10 минут в смеси (1:1) 96% этилового спирта и 30% перекиси водорода. Стерильные семена проращивали на среде MS без фитогормонов. В качестве эксплантов использовали семядоли 5–7-дневных проростков, которые помещали на среды MS с добавлением цитокинина кинетина (10 мг/л) или ауксина 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) (10 мг/л). В качестве контроля использовали экспланты на безгормональной среде MS0. Инкубацию проводили при температуре 20–23 °С и длине светового дня 16 часов. Чувствительность к цитокининам оценивали через 30 дней по наличию некротических пятен на поверхности экспланта.

Параллельно проводили изучение особенностей регенерации трансгенных растений и родительских линий редиса на среде с цитокинином. Для этого у проростков изолировали «точки роста» (апикальные меристемы проростков с прилегающей частью гипокотыля длиной 1 см) и помещали их для регенерации на среду MS с цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) (2 мг/л). В качестве контроля использовали «точки роста» на безгормональной среде MS0. Ранее было показано, что при регенерации «точек роста» редиса на средах с цитокининами в базальной части гипокотыля регенерантов формируются разрастания, морфологически и гистологически сходные с корнеплодами интактных растений редиса, которые назвали корнеплодоподобными структурами (КС) [1]. У опухолевых линий на КС развиваются опухолевые структуры (ОС) [1]. После 30 дней инкубации «точек роста» трансгенных растений и инбредных линий редиса на среде с БАП у молодых растений оценивали образование КС и ОС.

Результаты и их обсуждение

Каждый из использованных в нашей работе методов трансформации редиса имеет ряд достоинств и недостатков. Метод трансформации завязи цветка достаточно трудоемок; кроме того, наличие вставки и фенотипические изменения можно оценивать только на растениях T_1 , то есть на следующий год. Поэтому мы решили использовать для трансформации линий редиса инъекции ночной культуры агробактерий в апексы зародышей и молодых проростков. Этот метод позволяет анализировать по наличию вставки и фенотипическим

изменениям побеги T_0 , регенерированные из трансформированных апексов. Наиболее удобным оказался метод трансформации апексов проростков — он прост в исполнении и не требует подбора условий для регенерации, как в случае с зародышами.

Растения $T_1 - T_3$, полученные с помощью трансформации завязи, и побеги T_0 , регенерированные из трансформированных апексов, были проверены на наличие вставки с помощью ПЦР с праймерами к целевым генам (*ipt*, *rolC*, *rolB*) и гену канамицин-устойчивости *npt2*. При ПЦР ДНК трансгенных растений наблюдались ПЦР-продукты ожидаемой длины, совпадающие с соответствующими ПЦР-продуктами агробактерии (рис. 1).

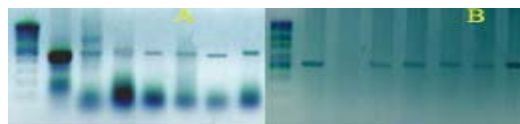


Рис. 1. Результат ПЦР ДНК трансгенных растений редиса с праймерами к генам *npt2* (А) и *rolC* (В)

Растения T_1 , полученные методом трансформации завязи, были проанализированы на предмет наличия или отсутствия экспрессии вставки с помощью ОТ-ПЦР с праймерами к генам *ipt*, *rolC*, *npt2*. Практически у всех растений T_1 наблюдались ПЦР-продукты ожидаемой длины (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что у большинства растений вставка Т-ДНК произошла в транскрипционно активный район генома.

У растений $T_1 - T_3$, полученных с помощью трансформации завязи, и побегов T_0 , полученных при трансформации апексов, наблюдался ряд фенотипических изменений по сравнению с родительскими линиями.

Одним из наиболее интересных результатов является изменение опухолевого фенотипа у трансгенных растений редиса (рис. 2). Так, при трансформации безопухолевой линии редиса геном *ipt* у части растений T_1 наблюдалось образование опухолей [6]; этот признак проявляется у части потомков T_2, T_3 , полученных от опухолевых растений T_1 . При трансформации геном *ipt* опухолевой линии редиса отмечался обратный эффект: все растения T_1 и часть растений T_2 были безопухолевыми (в то время как для родительской линии характерно 100% опухолеобразование). Мы предполагаем, что опухолеобразование у трансгенных растений безопухолевой линии возникает вследствие повышения уровня цитокининов в результате экспрессии гена *ipt*. Отсутствие опухолей у трансгенных растений опухолевой линии, предположи-

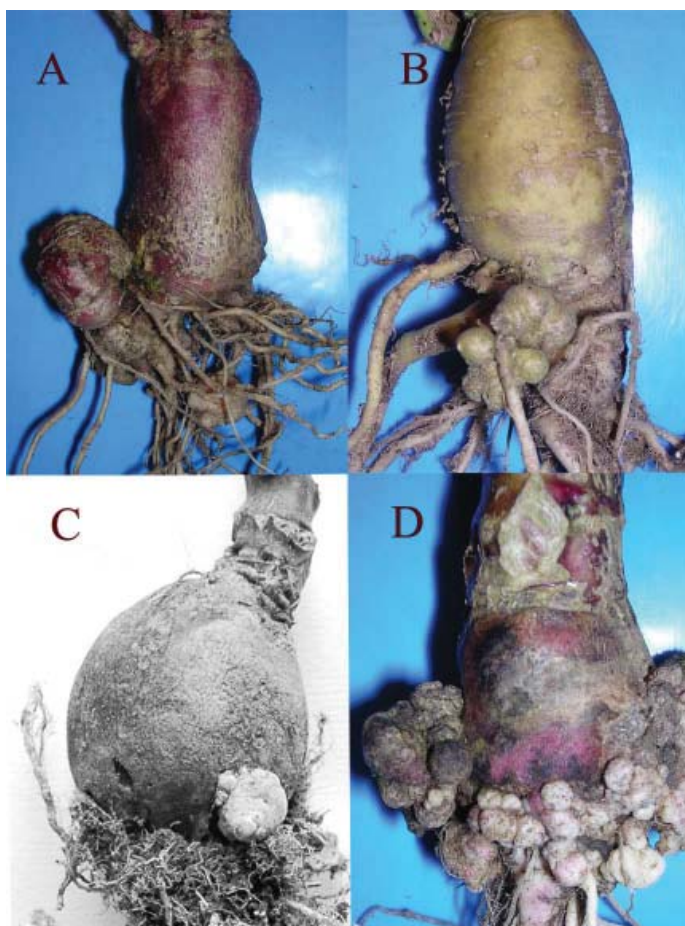


Рис. 2. Опухоли на корнеплодах трансгенных растений и инбредных линий редиса: А – T_0 rolB+rolC, линия 3; В – T_2 rolC, линия 6; С – T_1 ipt, линия 30; D – опухолевая линия 19

тельно, является результатом сайленсинга перенесенного гена *ipt* по механизму косупрессии. Известно, что при гомологии трансгена и какого-либо растительного гена у трансформантов часто происходит инактивация экспрессии как перенесенного, так и собственного гена [13]. В данном случае причиной косупрессии могла быть гомология перенесенного агробактериального гена *ipt* и собственных *ipt* генов редиса. Этим же эффектом можно объяснить не 100% опухолообразование у трансгенных по *ipt* растений T_1 безопухолевой линии, а также снижение доли опухолевых растений в поколениях T_2 и T_3 от трансформации опухолевой линии геном *ipt* (табл. 4). При трансформации безопухолевых линий редиса геном *rolC* фенотипии опухолевого фенотипа у растений T_1 и T_2 наблюдались с меньшей частотой, чем при трансформации *ipt* (см. табл. 4). Вероятно, одного повышения чувствительности к цитокининам за счет экспрессии гена *rolC* не всегда достаточно для индукции опухолообразования у растений безопухолевых линий. При трансформации

безопухолевых линий сразу двумя агробактериальными генами (*rolB*+*rolC*) мы также обнаруживали большой процент опухолообразования у трансгенных растений. Поскольку в данном случае для трансформации был использован метод инъекции агробактерий в апексы, то опухоли образовывались у части растений T_0 , показавших наличие вставки (см. табл. 4). Эти данные еще раз свидетельствуют об удобстве использования именно этого метода трансформации редиса.

Таблица 4

Процент опухолевых растений T_1 и T_2 , полученных при трансформации инбредных линий редиса отдельными генами T-ДНК агробактерий

Ген T-ДНК	Линия редиса	T_0	T_1	T_2
ipt	30 (оп-) *	-	61,5	33,3
	19 (оп+) *	-	60,0	83,8
rolC	3 (оп-) *	-	42,8	Нет данных
	6 (оп-) *	-	0,0	36,25
rolB+rolC	3 (оп-) **	33,3	Нет данных	Нет данных
	6 (оп-) **	50,0	Нет данных	Нет данных

* использован метод трансформации завязи цветка

** использован метод инъекции агробактерий в апексы

Кроме опухолей на корнеплодах, у единичных растений T_1 присутствовали другие фенотипические изменения, которые могут быть вызваны нарушением фитогормонального баланса у растений: изгибы стебля, плоский стебель, а также наплывы в узлах и образование опухолей на стебле (рис. 3). У значительной части трансгенных растений разных линий (10–100%) происходило изменение антоциановой окраски (табл. 5). Например, у части трансгенных растений линий 3 и 30 проявлялась светло-розовая, пятнистая или почти белая окраска корнеплода (у родительских линий красная); в одной из семей трансформантов линии 6 корнеплоды были красными (у родительской линии – белые). У многих растений изменялась антоциановая окраска венчика цветка: белая – вместо розовой у линий 3 и 30, ярко-малиновая – вместо светло-розовой у линии 3, розовая – вместо белой у линии 6. При этом изменение антоциановой окраски одной части растения не всегда сопровождалось изменением окраски другой. Наиболее часто изменение окраски цветка и кор-

Таблица 5

Процент растений T_1 и T_2 с изменениями антоциановой окраски, полученных при трансформации инбредных линий редиса отдельными генами Т-ДНК агробактерий

Ген Т-ДНК	Линия редиса	T_0		T_1		T_2	
		КП	венчик	КП	венчик	КП	венчик
Ipt	30 (оп-) *	—		50,0	50,0	75,0	50,0
	19 (оп+) *	—		0,0	0,0	43,2	0,0
rolC	3 (оп-) *	—		12,5	50,0	Нет данных	
	6 (оп-) *	—		10,0	0,0	16,7	0,0
rolB+rolC	3 (оп-) **	13,3	80,0	Нет данных		Нет данных	
	6 (оп-) **	0,0	100,0	Нет данных		Нет данных	

* использован метод трансформации завязи цветка

** использован метод инъекции агробактерий в апексы

неплода имело место при трансформации сразу двумя генами (rolB+rolC) — до 100%. Причиной изменения окраски может быть как вставка Т-ДНК в один из антоциановых генов, так и влияние генов ipt, rolB, rolC на метаболизм антоцианов. Данные о влиянии этих генов на антоциановый фенотип растения в литературе отсутствуют.

Трансгенные растения редиса были проанализированы по чувствительности к ауксинам и цитокилинам *in vitro*. Ранее было показано, что опухолевые линии редиса, как правило, обладают повышенной чувствительностью к экзогенным ауксинам и цитокилинам и повышенным содержанием эндогенных [11], что позволяет связать причину опухолеобразования у инбредных линий редиса с ауксинами и цитокилинами. Повышенная чувствительность выражается в пониженной жизнеспособности (некротизации) семядольных и листовых эксплантов на средах, содержащих ауксины или цитокинины. При регенерации «точек роста» редиса на средах с цитокилинами в базальной части растений формируются корнеплодоподобные структуры (КС); регенеранты опухолевых линий образуют также опухолевые структуры (ОС), способные к гормон-независимому росту [1].

У трансгенных растений редиса безопухолевых линий чувствительность эксплантов к ауксинам и цитокилинам была повышена по сравнению с нетрансформированными растениями, причем у опухолевых трансгенных растений безопухолевых линий чувствительность к ауксинам и цитокилинам была на таком же уровне, как и у растений опухолевых линий (рис. 4, 5). При регенерации «точек роста» на средах с цитокилинами у трансгенных растений безопухолевых линий формировались опухолевые структуры (рис. 6).

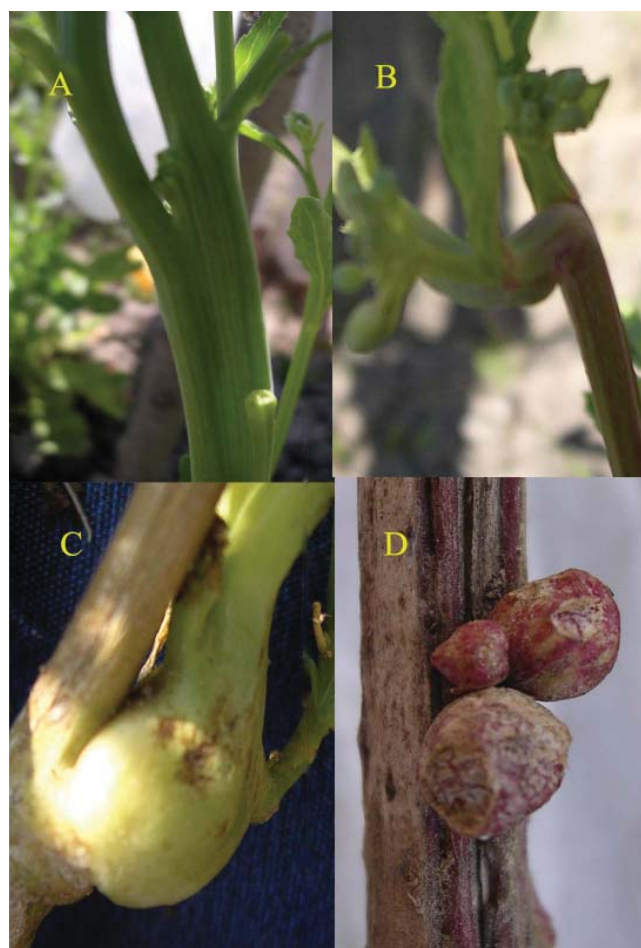


Рис. 3. Морфологические изменения у трансгенных растений редиса: А — плоский стебель, T_2 rolC, линия 6; В — изгибы стебля T_2 ipt, линия 30; С — наплывы в узлах, T_2 rolC, линия 6; D — опухоль на стебле, T_0 rolB+rolC, линия 3

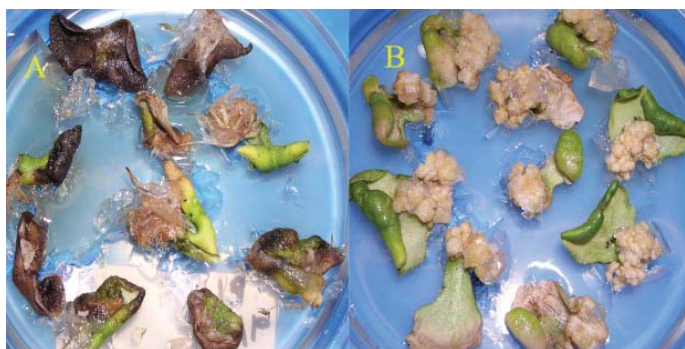


Рис. 4. Реакция семядольных эксплантов редиса на экзогенные цитокинины: А – T₂ rolC, линия 6; В – линия 6

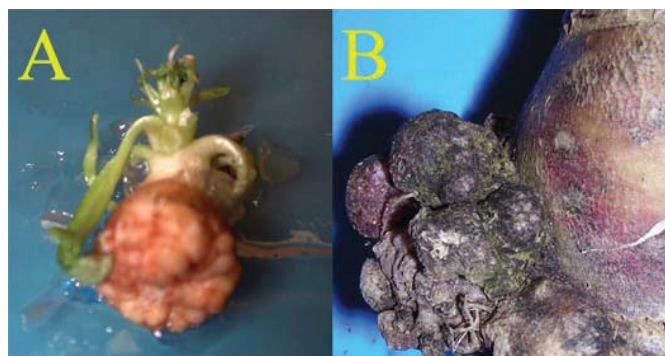


Рис. 6. Опухолообразование in vitro (А) и in vivo (В) у редиса

Таким образом, при трансформации редиса безопухолевых линий генами T-ДНК агробактерий у них начинают проявляться характерные признаки опухолевых линий. Это подтверждает наше предположение о роли экспрессии обнаруженных в геноме редиса гомологов агробактериальных генов, которые, предположительно, являются результатом ГПГ, в опухолеобразовании у редиса.

Работа выполнена при поддержке проектов CRDF ST-012, Министерства образования РФ 40-45, РФФИ 05-04-48583.

Литература

1. Бузовкина И.С., Кнешке И., Лутова Л.А. Генетический анализ признака «чувствительность к цитокинину» у редиса in vitro // Генетика. – 1993. – Т. 29. – С. 995–1001.
2. Лутова Л.А., Верзина И.И. Наследование способности к каллусо- и корнеобразованию у изолированных семядолей редиса в условиях асептической культуры // Генетика. – 1984. – Т. 20. – С. 1663–1670.
3. Нарбут С.И. Генетическая коллекция инбредных линий редиса // Генетика. – 1966. – Т. 5. – С. 89–100.
4. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. – Киев: Наукова думка, 1985. – 230 с.
5. Тютчев С.Л., Евстигнеева Т.А. Биохимические методы исследования индуцированной болезнестойчивости растений. – СПб: ВИЗР РАН, 2001. – 68 с.
6. Фролова Н.В., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Использование метода агробактериальной трансформации in vivo для получения фенкопий опухолеобразования у безопухолевой линии редиса (*Raphanus sativus* L.) // Биотехнология. – 2004. – Т. 4. – С. 3–7.
7. Ahuja M. R. A hypothesis and evidence concerning the genetic components controlling tumor formation in *Nicotiana* // Mol. Gen. Genet. – 1968. – Vol. 103. – N 2. – P. 176–184.
8. Aoki S., Kawaoka A., Sekine M., Ichikawa T., Fujita T., Shinmyo A., Syono K. Sequence of the cellular T-DNA in the untransformed genome of *Nicotiana glauca* that is homologous to ORFs 13 and 14 of the Ri plasmid and analysis of its expression in genetic tumors of *N. glauca* x *N. langsdorfii* // Mol. Gen. Genet. – 1994. – Vol. 243. – N 15. – P. 706–710.

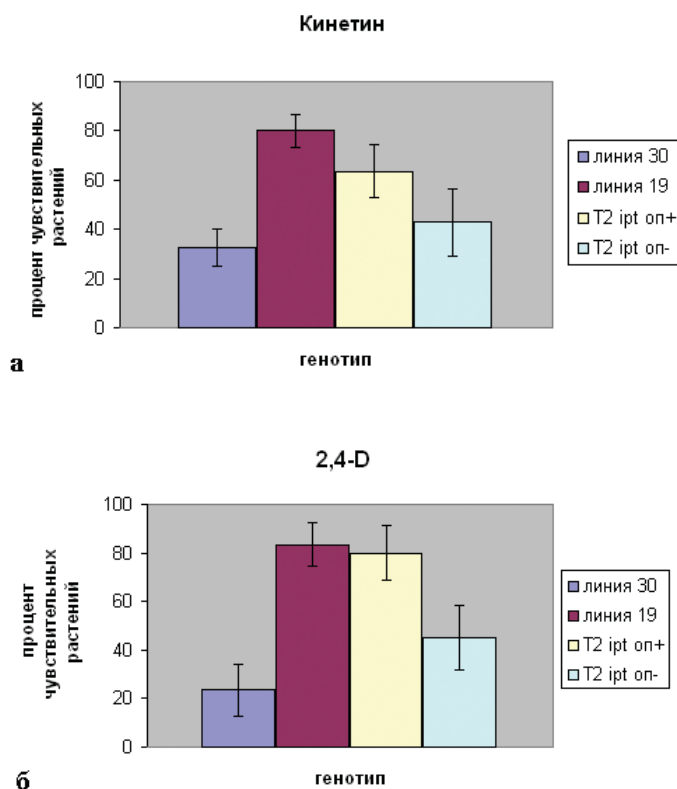


Рис. 5. Чувствительность семядольных эксплантов трансгенных растений (T₁ ipt линия 30) и инбредных линий редиса редиса к цитокинину (кинетин – а) и ауксину (2,4-D – б)

9. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // Transgenic Res. – 2001. – Vol. 10. – N 4. – P. 363–371.
10. Intriери M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana* // Mol. Phylogenet. Evol. – 2001. – Vol. 20. – N 1. – P. 100–110.
11. Lutova L.A., Matveeva T.V., Frolova N.V., Dodueva I.E., Buzovkina I.S., Van Onckelen H. Hormonal control of tumor formation in radish // J. Plant Growth Regul. – 2004. – Vol. 23. – N 1. – P. 37–43.
12. Nagata N., Kosono S., Sekine M., Shinmyo A., Syono K. The regulatory functions of the rolB and rolC genes of *Agrobacterium rhizogenes* are conserved in the homologous genes (Ngrol) of *Nicotiana glauca* in tobacco genetic tumors // Plant Cell. Physiol. – 1995. – Vol. 36. – N 6. – P. 1003–1012.
13. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // Plant Cell. – 1990. – Vol. 2. – P. 279–289.
14. Park B.J., Liu Z., Kanno A., Kameya T. Transformation of radish (*Raphanus sativus* L.) via sonication and vacuum infiltration of germinated seeds with *Agrobacterium* harboring a group 3 LEA gene from *B. napus*. // Plant Cell Rep. – 2005. – Vol. 24. – N 8. – P. 494–500.
15. Schell J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity // EMBO J. – 1982. – Vol. 2. – P. 2143–2150.
16. Schmulling T., Shell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development // EMBO J. – 1988. – Vol. 7. – P. 2621–2629.
17. Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – N 13. – P. 26405–26410.
18. White F., Garfinkel D., Huffman G., Gordon M., Nester E. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of the uninfected plants // Nature. – 1983. – Vol. 301. – N 5898. – P. 348–350.

TRANSFORMATION OF INBRED LINES OF THE RADISH (*RAPHANUS SATIVUS* L.) BY T-DNA GENES OF AGROBACTERIA: CHANGE OF A TUMORAL PHENOTYPE AND REACTION ON PHYTOHORMONES AT TRANSGENIC PLANTS

I.E. DODUEVA, N.V. FROLOVA, M.A. VLASENKO, V.A. MONAKHOVA, L.A. LUTOVA

Chair of Genetics and Selection, St.-Petersburg State University

In connection with an acuteness of a question on safety of transgenic plants the study of the horizontal gene transfer (HGT) from *Agrobacteria* to plants as an example of the natural transgenesis is one of the important problems of biotechnology. The unique in detail studied example of such HGT are T-DNA genes homologues of *Agrobacterium rhizogenes* in genomes of the representatives of *Nicotiana* genus. It is shown, that expression of these genes plays a role in an induction of tumor-formation at interspecific hybrids of tobacco. We obtain the data, allowing to assume a presence of agrobacterial genes homologues in genomes of the inbred lines of the radish, many of which are also characterized by genetically determined tumor-formation. Under transformation of lines of the radish by separate T-DNA genes of *Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens* the transgenic plants with changes of tumoral phenotype and the raised sensitivity to auxins and cytokinins are received. These data confirm our assumption about a role of the expression of agrobacterial genes homologues in tumor-formation at radish.

Keywords: transgenic plants, agrobacterial transformation, gene engineering, tumor-formation, phytohormones

ВЛИЯНИЕ ИНДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА В ПЕРИОД ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ НА ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Е.Д. ДАНИЛЕНКО*, А.В. БАТЕНЕВА, В.И. МАСЫЧЕВА

*Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ
ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
г. Бердск Новосибирской области*

Представлены результаты изучения отдаленных последствий введения индуктора интерферона, двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, беременным самкам крыс Уистар. Установлено, что пренатальное воздействие препаратом дсРНК способно изменять как фоновый уровень функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и поджелудочной железы, так и реактивность этих систем у взрослых потомков крыс. Эффект дсРНК был наиболее выраженным при использовании высоких доз препарата и проявлялся лишь в том случае, когда воздействие охватывало весь период беременности.

Ключевые слова: дсРНК, индуктор интерферона, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, поджелудочная железа, глюкоза, беременность, потомство, крысы.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении заболеваний, вызванных бактериальными и вирусными агентами, инфекции по-прежнему представляют собой значительную угрозу здоровью человека. Особенно острой является проблема инфекционных заболеваний, вызванных цитомегаловирусом, вирусом герпеса, хламидиоз, грипп, в период беременности. Следствием инфицированности матери, в частности, хламидиозом, являются преждевременные роды, мертворождение либо повышенная неонатальная смертность, хламидиозные конъюнктивиты, гастроэнтериты, пневмонии их потомков [1].

В настоящее время можно выделить два основных направления создания лечебно-профилактических средств борьбы с инфекционными заболеваниями. К первому следует отнести препараты, обладающие прямым противовирусным либо антибактериальным действием (антитела, рецепторы, блокаторы метаболизма), и вещества, направленные на формирование и поддержание

специфической иммунной реакции (вакцины). Второе направление связано с созданием лекарственных средств, основным механизмом действия которых является повышение неспецифической защитной реакции. Среди представителей этого класса препаратов важное место занимают препараты двуспиральных РНК (дсРНК).

Препараты на основе дсРНК являются индукторами интерферона и широко используются в медицине и ветеринарии в качестве противовирусных, антипаразитарных и иммуномодулирующих средств [2]. Их терапевтическая эффективность установлена при лечении острых и хронических инфекций (грипп, гепатит А, вирусные энцефалиты, герпес, хламидиоз, энтеровирусные инфекции, бешенство и т.д.) [3]. В то же время вопрос о возможности терапевтического использования препаратов дсРНК в период беременности до конца не выяснен.

Известно, что результатом разного рода воздействий, которым подвергается мать в период беременности, является изменение морфологических, физиологических, поведенческих характеристик ее потомков [4–6]. Анализ этих данных позволил заключить, что необходимым компонентом исследования должна быть оценка функционального состояния систем гормональной регуляции потомков [7]. Это объясняется ключевой ролью нервных и эндокринных механизмов в регуляции физиологических функций и различных форм поведения. К числу таких

* Автор для переписки:

© 2005 г. Даниленко Е.Д.,

Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ

ФГУН «Государственный научный центр вирусологии

и биотехнологии «Вектор»,

Адрес: 633010 Бердск Новосибирской области,

E-mail: danilenko@sibmail.ru

систем относятся эндокринные системы и железы, обеспечивающие углеводный гомеостаз организма: гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС) и поджелудочная железа.

Существует значительный экспериментальный материал, свидетельствующий о способности интерферона и его индукторов изменять функцию ГГНС и поджелудочной железы [8–10]. В то же время сведения о влиянии интерферонов/индукторов интерферона на становление этих систем в период пренатального развития и их последующее функционирование у взрослых животных практически отсутствуют. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование функционального состояния ГГНС и поджелудочной железы крыс, матерям которых в период беременности вводили препарат дсРНК.

Материалы и методы

Условия эксперимента. В эксперименте использовали половозрелых крыс линии Wistar обоего пола 3–3,5 месячного возраста. Самцы и самки в соотношении 1:2 ссаживались на ночь, на следующее утро между 830 и 10 часами проводили микроскопический анализ вагинальных мазков на наличие спермы. День обнаружения спермы во влагалище считался первым днем беременности.

Было проведено две серии экспериментов. В первом эксперименте беременные самки крыс были разделены на 4 экспериментальные группы. Животным первой и второй опытных групп с 1-го по 19-й день беременности вводили препарат дсРНК, выделенных из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в дозе 5 мг/кг (терапевтическая доза) и 20 мг/кг массы тела (субтоксическая доза), соответственно. Препарат дсРНК вводили внутримышечно ежедневно, один раз в день, в утренние часы (между 9 и 10 ч), в объеме 0,2 мл на 200 г массы тела животных. Крысы третьей, контрольной, группы в те же сроки получали физиологический раствор в эквивалентном объеме. Животные четвертой группы не подвергались воздействиям (интактная группа).

Во втором эксперименте препарат дсРНК (5 мг/кг, внутримышечно) вводили беременным самкам крыс опытной группы на 16-, 17- и 18-й день беременности. Контролем служили животные, которые в те же сроки получали физиологический раствор, и интактные крысы.

У 2–3-месячных половозрелых потомков этих крыс, самцов, оценивали содержание кортикостерона, инсулина и глюкозы крови в покое, а также уровень этих

показателей по окончании эмоционального стресса, вызванного 30-минутным ограничением подвижности.

Содержание кортикостерона в плазме крови измеряли после предварительной эфирной экстракции радиоиммунным методом с помощью набора реактивов «РИН-В-3Н» (НИИ экспериментальной патологии и терапии РАМН, г. Москва). Уровень инсулина в сыворотке крови определяли с помощью набора реактивов «Рио-ИНС-ПГ-125I» производства Института биоорганической химии АН Республики Беларусь. Содержание глюкозы крови измеряли глюкозооксидазным методом с помощью наборов реактивов «Новоглюк» (АО «Вектор-Бест», п. Кольцово Новосибирской области). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statgrafics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность полученных различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что введение физиологического раствора самкам крыс с 1-го по 19-й день беременности не вызывало изменения фонового уровня кортикостерона или реакции на эмоциональный стресс надпочечников их потомков (рис. 1). Результатом введения беременным самкам крыс препарата дсРНК в обеих дозах являлось снижение в крови их потомков уровня кортикостерона в покое, по сравнению с величиной данного показателя у потомков крыс контрольной и интактной групп. Снижение показателя в первой опытной группе составило 43 и 49%, во второй группе — 55 и 59% по отношению к показателям контрольных и интактных крыс, соответственно.

Стрессорный уровень кортикостерона крови потомков крыс, которым вводили препарат дсРНК, также был ниже контрольных значений. Концентрация гормона в крови крыс первой опытной группы составляла 63 и 70% от уровня показателя в интактной и контрольной группах; у крыс второй опытной группы — 76 и 73%, соответственно (см. рис. 1). При этом уровень гормона при стрессе и в состоянии покоя у животных первой и второй групп различался в 2,6 и 3,39 раза, тогда как у потомков интактных и контрольных крыс повышение содержания кортикостерона в крови при стрессе не превышало 200 и 190%.

Введение препарата дсРНК в дозе 5 мг/кг, также как и физиологического раствора, беременным крысам не вызывало изменения содержания инсулина крови

их взрослых потомков (рис. 2). В то же время в крови животных, матери которых подверглись воздействию препарата в более высокой дозе (20 мг/кг), наблюдали существенное (на 78–83%, по отношению к показателям крыс контрольных групп) повышение уровня инсулина.

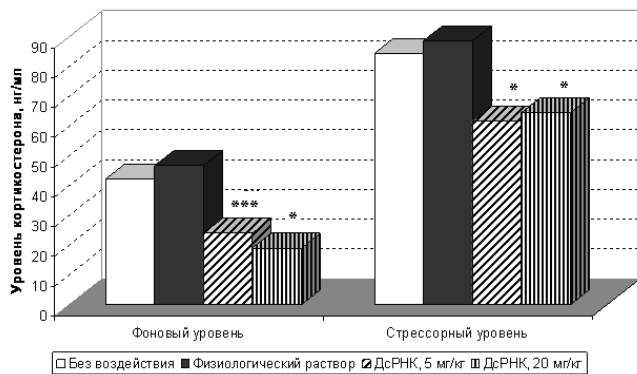


Рис. 1. Содержание кортикостерона в периферической крови самцов крыс, матерям которых вводили препарат дсРНК с 1-го по 19-й день беременности. Различия с контрольной группой достоверны при *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$

Иммобилизация крыс вызывала характерное для стрессорного ответа снижение уровня инсулина, однако выраженность реакции у крыс разных экспериментальных групп существенно различалась. Концентрации инсулина в крови стрессированных крыс контрольной и первой опытной группы были достоверно выше, чем у интактных животных и не различались между собой (см. рис. 2). Содержание инсулина в крови крыс второй опытной группы в 4 раза превышало уровень показателя интактных крыс и в 1,8–2,4 раза — крыс первой опытной и контрольной групп.

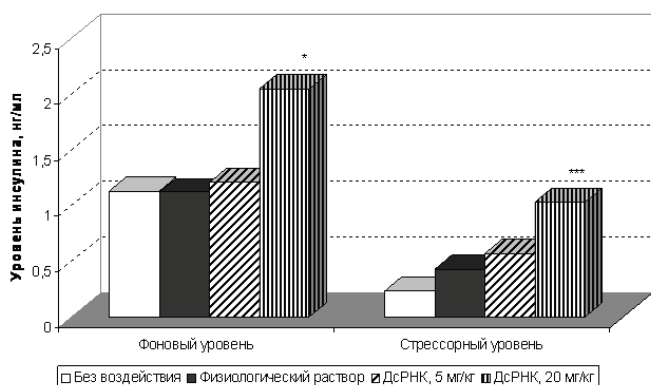


Рис. 2. Содержание инсулина в периферической крови самцов крыс, матерям которых вводили препарат дсРНК с 1-го по 19-й день беременности. Различия с контрольной группой достоверны при *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$

Сравнение интенсивности реакции на стресс по соотношению стрессорного и фонового уровня инсулина показало, что реакция на воздействие поджелудочной железы опытных крыс была менее интенсивной, чем у контрольных животных. Содержание инсулина в крови крыс первой и второй опытных групп после стресса составляло 47 и 50% от фонового уровня, тогда как в интактной и контрольной группах этот показатель не превышал 20–38%.

Препарат дсРНК в дозе 5 мг/кг, подобно физиологическому раствору, не вызывал изменения содержания глюкозы в покое взрослых потомков крыс (рис. 3). Введение препарата беременным крысам не приводило к достоверному изменению стрессорного уровня глюкозы потомков, по сравнению с показателями контрольных крыс, хотя значения показателя были выше, чем у интактных крыс. Стрессорное снижение уровня глюкозы в крови крыс первой опытной группы, по отношению к фоновому уровню показателя, было менее интенсивным, и составляло 33% при 55- и 43%-ном снижении данного показателя в контрольной и интактной группах.

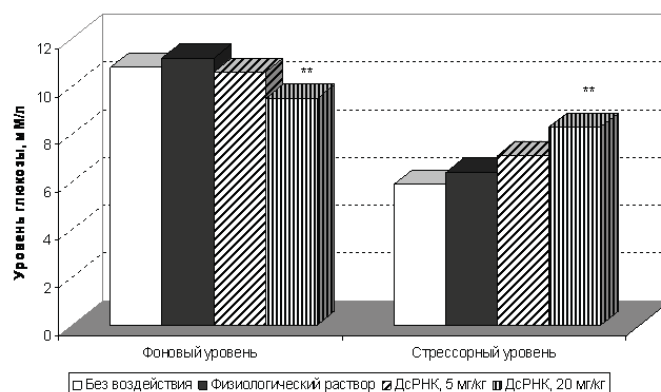


Рис. 3. Содержание глюкозы в крови самцов крыс, матерям которых вводили препарат дсРНК с 1-го по 19-й день беременности. Различия с контрольной группой достоверны при ** $p < 0,01$

Содержание глюкозы крови в покое у крыс второй опытной группы было достоверно ниже, а стрессорный уровень глюкозы — выше, чем у животных контрольной и интактной групп (см. рис. 3). Стрессорная реакция крыс этой группы была наименее интенсивной среди животных всех экспериментальных групп.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение препарата дсРНК беременным самкам крыс с 1-го по 19-й день беременности приводило к изменению как фонового уровня функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и поджелудочной

железы, так и реактивности этих систем у взрослых потомков. Наибольшим разнообразием отличались эффекты препарата в высокой дозе, в то же время очевидна однотипность наблюдаемых изменений при введении разных доз дсРНК.

Препарат в обеих использованных дозах вызывал снижение фонового уровня кортикостероидных гормонов взрослых потомков, по сравнению с показателями контрольных животных, при этом ответ коры надпочечников на эмоциональный стресс усиливался. Следует отметить, что нам не удалось обнаружить литературных данных относительно снижения фонового уровня кортикостерона либо повышения стрессорной реакции в результате различного рода пренатальных воздействий. Существующие сведения говорят о повышении концентрации кортикостерона крови в покое крыс, матерей которых стрессировали в течение всей беременности [11, 12], либо отсутствии какого-либо эффекта стрессирования в последнюю неделю беременности [13, 14]. Стрессирование матерей во время беременности не вызывало изменения стрессорного ответа их взрослых потомков либо ослабляло реакцию [4, 12, 15]. Этот факт позволяет говорить о том, что пренатальное воздействие дсРНК на ГГНС может осуществляться через механизмы, отличные от механизмов действия таких неспецифических факторов, как стресс.

В настоящее время не представляется возможным установить то звено регуляции функции ГГНС, которое подвержено пренатальному действию дсРНК. Данные, полученные в экспериментах с инкубацией надпочечниковых желез, свидетельствуют о том, что уровень продукции кортикостерона железой в покое и ее реакция на АКТГ потомков крыс, которым вводили дсРНК, не претерпевали существенных изменений [16]. Следовательно, можно предположить, что воздействие затрагивало центральные механизмы регуляции системы.

Причиной повышения инсулина в крови потомков крыс, которым вводили препарат дсРНК в высокой дозе (20 мг/кг), на наш взгляд, может быть усиление процессов депонирования инсулина, либо изменение чувствительности поджелудочной железы к регуляторным факторам. В пользу последнего свидетельствуют данные об ослаблении стрессорного ответа железы у крыс, матерям которых вводили дсРНК. Как известно, повышение уровня инсулина крови в ранней фазе стрессорной реакции сменяется гипоинсулинемией, вызванной высокой концентрацией глюкокортикоидных гормонов [17]. В нашем исследовании снижение содержания инсулина крови в ответ на иммобилизацию опытных

животных было менее выраженным, по сравнению с контрольными показателями, что может свидетельствовать о снижении чувствительности железы к действию кортикостероидов.

Соотношение динамики изменения уровня кортикостерона и инсулина с изменениями содержания в крови глюкозы позволяет говорить о взаимосвязи данных показателей.

Так, повышение уровня инсулина и снижение уровня кортикостерона в крови крыс, матерям которых вводили препарат дсРНК в высокой дозе, сопровождалось снижением уровня глюкозы. Очевидно, что развитие гипогликемической реакции может быть результатом как снижения ее синтеза в условиях уменьшения продукции и/или секреции в кровь кортикостерона, так и усиления утилизации глюкозы периферическими тканями под действием высоких концентраций инсулина. Причем, критическую роль в этом процессе, по-видимому, играет гормон поджелудочной железы, поскольку столь же значительное снижение фонового уровня кортикостерона в группе потомков крыс, матерям которых вводили препарат дсРНК в дозе 5 мг/кг, не приводило к существенному изменению уровня глюкозы крови.

Сравнение интенсивности реакции на стресс кортикостерона и инсулина показало, что воздействие препарата дсРНК в период внутриутробного развития усиливало реакцию ГГНС потомков и ослабляло реакцию поджелудочной железы. Как результат, менее интенсивным было и снижение в ответ на стрессирование уровня глюкозы.

В настоящее время неясно, каковы механизмы реализации эффекта дсРНК. С одной стороны, существует значительный объем экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что изменения функции ГГНС и поджелудочной железы потомков могут быть результатом изменения кортикостероидных гормонов, инсулина и глюкозы в крови их матерей, подвергшихся различного рода воздействиям в период беременности [4, 5]. С другой стороны, известно, что интерферон и его индукторы способны изменять фоновый уровень функционирования этих систем и их реактивность [8–10]. В связи с этим можно предположить, что действие препарата дсРНК на функцию ГГНС и поджелудочной железы потомков может быть опосредовано изменением функционального состояния аналогичных систем матери.

Помимо этого, установлено, что двуспиральные рибонуклеиновые кислоты являются липофильными соединениями, которые при определенных условиях, в частности, повышенной концентрации ионов кальция,

способны транслоцироваться через клеточные мембраны [18], в том числе, плаценты. Показано, что способность к полноценной продукции интерферона появляется уже в период внутриутробного развития [18]. Следовательно, весьма вероятно, что усиление синтеза эмбрионального интерферона под действием дсРНК на определенной стадии развития может вызывать глубокие и длительно сохраняющиеся изменения структуры и функции как эндокринных желез, так и центральных механизмов их регуляции. Очевидно, что чем более продолжительным будет период циркуляции интерферона и выше его уровень, тем более значительными будут отдаленные последствия его воздействия. По-видимому, эту закономерность мы наблюдали в случае введения препарата дсРНК в высокой дозе в течение всего периода беременности.

В пользу данного предположения могут служить и данные изучения последствий введения дсРНК (5 мг/кг) матерям в последнюю неделю беременности (с 16-го по 18-й день). Установлено, что введение препарата в эти сроки не отражалось на уровне синтеза кортикостерона взрослых потомков крыс как в покое, так и в условиях стрессорного воздействия. Фоновый уровень глюкозы крови этих животных не отличался от контрольного показателя; содержание в крови глюкозы при стрессе хотя и снижалось более значительно, чем у крыс контрольной группы, но не выходило за границы диапазона интактных крыс (табл. 1).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что введение индуктора интерферона, препарата дсРНК, беременным самкам крыс вызывало модификацию фун-

Таблица 1

Уровень глюкозы и кортикостерона в покое и по окончании эмоционального стресса у взрослых самцов крыс, матерям которых с 16-го по 18-й день беременности вводили препарат дсРНК

Группа животных	Глюкоза крови, мМ/л		Кортикостерон крови, нг/мл	
	Фоновый уровень	Стрессорный уровень	Фоновый уровень	Стрессорный уровень
Без воздействия	8,11±0,19	7,04±0,47	25,9±4,5	51,4±1,3
Физиологический раствор	8,87±0,2 **	7,68±0,27	20,9±3,7	48,6±2,5
дсРНК, 5 мг/кг	9,48±0,21***	6,90±0,20 *	25,8±5,4	52,4±1,5

Примечание: Различия с контролем достоверны: по сравнению с интактными животными (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) по сравнению с группой крыс, которой вводили физиологический раствор (* $p < 0,05$)

кции ГГНС и поджелудочной железы их взрослых потомков. Эффект воздействия был наиболее выраженным при использовании высоких доз препарата и проявлялся лишь в том случае, когда воздействие охватывало весь период беременности. Применение препарата дсРНК в терапевтической дозе в последнем триместре беременности не вызывало существенного изменения углеводного метаболизма и функции эндокринных систем, обеспечивающих его регуляцию.

Литература

1. Терских И.И., Казанцев А.П. // *Вопр. вирусол.* — 2000. — Т. 45. — № 1. — С. 45–47.
2. Еришов Ф.И. // *Экспер. клин. фармакол.* — 1995. — Т. 58. — № 2. — С. 74–78.
3. Еришов Ф.И., Тазулахова Э.Б. // *Terra medica.* — 1998. — № 2. — С. 2–7.
4. Ader R., Plaut S.M. // *Psychosom. Med.* — 1968. — Vol. 30. — P. 274–286.

5. Acher J.E., Blackman D.W. // *Develop. Psychobiol.* – 1971. – Vol. 4. – P. 193–248.
6. Anderson D.K., Fleming D.E., Rhees R.W., Kinghorn E. // *Brain Res.* – 1986. – Vol. 370. – P. 1–10.
7. Dorner G. // *Acta biol. med. germ.* – 1975. – Vol. 34. – P. 1093–1095.
8. Milton N.G., Hillhouse E.W., Milton A.S. // *J. Endocrinol.* – 1992. – Vol. 135. – N 1. – P. 69–75.
9. Tanaka H., Shiota G., Kawasaki H. // *J. Med.* – 1997. – Vol. 28. – N 5–6. – P. 325–334.
10. Heitmeyer M.R., Scarim A.L., Corbett J.A. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – N 18. – P. 12531–12536.
11. Takahashi L.K., Baker E.W., Kalin N.H. // *Physiol. Behav.* – 1990. – Vol. 47. – N 2. – P. 357–364.
12. Weinstock M., Poltyrev T., Schorer-Apelbaum D., Men D., McCarty R. // *Physiol. Behav.* – 1998. – Vol. 64. – N 4. – P. 439–444.
13. Maccari S., Piazza P.V., Kabbaj M., Barbabnges A., Simon H., Le Moal M. // *J. Neurosci.* – 1995. – Vol. 15. – N 1. – Pt. 1. – P. 110–116.
14. Stohr T., Schulte Wermeling D., Szuran T., Pliska V., Domeney A., Welzl H., Weiner I., Feldon J. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1998. – Vol. 59. – N 4. – P. 799–805.
15. Smythe J.W., McCormick C.M., Meaney M.J. // *Brain Res. Bull.* – 1996. – Vol. 40. – N 3. – P. 195–199.
16. Даниленко Е.Д., Масычева В.И. Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии / Тез докл. конф. «Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии». – Новосибирск, 2002. – С. 45.
17. Теппермен Д., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М: Мир, 1989. – 653 с.
18. Соколова Т.М. Индукторы интерферона / Сб. научн. труд. Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР. Под ред. Жданова В.М., Ершова Ф.И. – М., 1982. – 201 с.
19. Barlow D.P., Raudle B.J., Burk D.C. // *Differentiation.* – 1984. – Vol. 27. – P. 229–235.

THE EFFECT OF INTERFERON INDUCTION DURING THE PERIOD OF PRENATAL DEVELOPMENT ON THE HORMONE STATE OF MATURE RATS

E.D. DANILENKO, A.V. BATENEVA, V.I. MASYSHEVA

Research Design and Technology Institute of Biologically Active Substances, Federal State Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Berdsk, Novosibirsk region

The data on the investigation of remote consequences of the interferon inducer, double-stranded yeast (*S. cerevisiae*) RNA preparation, administration to pregnant Wistar rats are presented. It has been shown that a prenatal action of the dsRNA preparation may change both the basal level of functioning of the hypothalamus-pituitary-adrenal system and pancreas and the stress reactivity of these systems in mature rats. The dsRNAs effect was most pronounced when high doses of the preparation were administered over the whole pregnancy period.

Keywords: dsRNA, interferon inducer, hypothalamus-pituitary-adrenal system, pancreas, glucose, pregnancy, offspring, rats.

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ПОЛИСАХАРИДОВ

Е.А. ГЮНТЕР*, О.В. ПОПЕЙКО, О.М. КАПУСТИНА, Ю.С. ОВОДОВ

Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар

Изучен качественный и количественный состав полисахаридов каллусной культуры смолевки, ряски и пижмы и выявлена различная биосинтетическая активность каллусных линий. Наряду с пектиновыми полисахаридами, продуцируемыми нативными растениями, каллусными культурами *in vitro* синтезируются арабиногалактаны. Каллусы, по сравнению с нативными растениями, продуцируют равное или значительно большее количество полисахаридов. Пектины клеточных культур смолевки, ряски и пижмы, отличаются строением боковых цепей. Показано, что для пектинов каллуса смолевки и пижмы характерно низкое содержание нейтральных моносахаридных остатков (10–12%) в сравнении с пектинами каллуса ряски (25–30%). Дедифференцированные клетки разных видов растений могут продуцировать образцы пектинов, близкие (клетки смолевки и пижмы) или отличные (клетки ряски) от пектинов интактных растений. Выявлены клеточные линии ряски, полисахариды которых содержат остатки апиозы (1–5%). Углеводы, азот, кальций и ультрафиолетовое излучение могут использоваться как факторы, модифицирующие строение полисахаридов растительных клеток, стимулирующие рост клеток и содержание в них полисахаридов. Изменение содержания этих элементов вызывает изменения в моносахаридном составе продуцируемых полисахаридов. Варьируя условия роста каллуса, можно влиять на состав продуцируемых полисахаридов, их структуру и свойства, что может иметь существенное прикладное значение при производстве наиболее ценных биопрепаратов.

Ключевые слова: *Lemna minor* L., *Silene vulgaris* (M.) G., *Tanacetum vulgare* L., культура клеток, каллус, пектин, арабиногалактан, растительные полисахариды.

Физиологическая активность полисахаридов обусловлена особенностями их структуры. Поэтому актуальной задачей является поиск эффективных методов биотехнологической регуляции с целью получения полисахаридов с заданными свойствами и структурой. Кроме того, существует проблема стандартизации, касающаяся химического состава и биологической активности полисахаридов, выделенных из нативных растений. Обе проблемы могут быть успешно решены с помощью биотехнологических методов получения полисахаридов, в частности, с использованием культуры растительных клеток. Одно из главных преимуществ культуры клеток перед традиционным сырьем — это гомогенность системы, состоящей в основном из клеток с первичными клеточными стенками. Ранее нами была описана иммуномодулирующая активность полисахаридов из каллуса смолевки обыкновенной [1].

Настоящая работа выполнена с использованием каллусных культур лекарственных растений, таких как смолевка обыкновенная *Silene vulgaris*, ряска малая *Lemna minor* и пижма обыкновенная *Tanacetum vulgare*. Пектиновые полисахариды этих растений обладают иммуномодулирующей активностью [1–3].

Целью работы являлась разработка биотехнологических подходов к получению физиологически активных полисахаридов с измененным строением с использованием клеточных культур, а также исследование влияния различных факторов на рост и биосинтез полисахаридов каллусными культурами.

Материалы и методы

Условия культивирования каллусных культур.

Каллусные культуры смолевки, ряски и пижмы выращивали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга [4] при 26 ± 1 °С в темноте. Каллус смолевки, пижмы и ряски субкультивировали с интервалом в 21, 28 и 35 сут., соответственно.

В качестве источников углеводного питания каллуса смолевки использовали сахарозу, глюкозу, галактозу и арабинозу в концентрации 30 г/л; сахарозу — в кон-

* Автор для переписки:

© 2005 г. Гюнтер Елена Александровна,
к.б.н., зав. лабораторией,

Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН

Адрес: 167982 Сыктывкар, ул. Первомайская, 50

Тел./факс: (8212) 241001,

E-mail: gunter@physiol.komisc.ru

центрации 10, 20, 40, 50, 75 и 100 г/л. Контрольный вариант среды — 30 г/л сахарозы.

Исследовали действие азота в различных концентрациях в среде культивирования при соотношении 1 : 2 аммонийного и нитратного азота: 0, 30, 60 (контроль) и 90 мМ. Испытывали также действие аммонийного и нитратного азота ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$) в различных соотношениях: 0 : 1; 1 : 2 (контроль); 1 : 1 и 2 : 1.

Изучали действие ионов кальция в различных концентрациях в среде культивирования: 0, 1,5, 3,0 (контроль), 4,5 мМ.

Исследовали действие ионов фосфата в различных концентрациях: 0, 0,63, 1,25 (контроль), 2,5, 3,75 мМ.

В конце цикла культивирования подсчитывали индексы роста по сырой и сухой массе, а также продуктивность по сухой биомассе (г/л). В опыт на каждый фактор брали 10–15 каллусов. Для определения сухого веса сырую биомассу высушивали при 60°. Индексы роста определяли по формуле: $I = (m_i - m_0) / m_0$, где m_0 и m_i (г) исходная и конечная масса каллуса.

При изучении действия ультрафиолетового излучения на физиолого-биохимические характеристики каллуса смолевки проводили облучение каллуса ультрафиолетовым светом С (длина волны 254 нм, 70 Вт/м²) в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин в середине экспоненциальной фазы роста (12 сут.). Полисахаридный состав каллуса исследовали на 21 сут. культивирования (стационарная фаза роста). Контроль — необлученные клетки.

Выделение полисахаридов из каллуса проводили, как было описано ранее [5].

Общие аналитические методы. В полисахаридных фракциях определяли содержание гликуроновых кислот по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [6], содержание белка — по методу Лоури [7]. Общее содержание углеводов устанавливали по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты [8]. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (Великобритания). ГЖХ выполняли на приборе Hewlett-Packard 4890А (США) с плазменно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395А на капиллярной колонке RTX 1 (0,25 мм x 30 м), газ-носитель — аргон.

Полный кислотный гидролиз. Полисахаридные фракции (по 2,0–2,5 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (ТФУ, 1 мл) при 100 °С в течение 3–4 ч, гидролизаты упаривали в вакууме с метиловым спиртом до полного удаления ТФУ. В качестве внутреннего стандарта использовали мио инозит (0,5 мг/мл).

Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [9].

При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Достоверность оценивали по t критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Получены каллусные культуры смолевки обыкновенной, ряски малой и пижмы обыкновенной, высокопродуктивные по биомассе и синтезируемым полисахаридам. Создана коллекция каллусных культур этих видов растений. Прирост сухой биомассы в различных клеточных культурах составляет от 9 до 12 г/л, индекс роста — 5–17.

Показано, что в исследованных клеточных культурах синтезируются пектиновые полисахариды, характерные для интактных растений: силенан из смолевки, лемнан из ряски и танацетан из пижмы. В культурах, наряду с пектином, продуцируется кислый арабиногалактан (табл. 1).

Кислые арабиногалактаны или арабиногалактановые протеины выделены из клеточных культур явора [10, 11], смолевки белой [12], наперстянки [13], барвинка [14], эхинацеи [15] и многих других. Они, скорее всего, представляют собой фрагменты боковых цепей пектинов этих растений и образуются в качестве промежуточных продуктов биосинтеза пектиновых полисахаридов.

Близкие по структуре пектины (рамногалактуронаны RGI) были выделены из клеточных стенок суспензионных культур сои *Glycine max* [16], кукурузы *Zea mays*, риса [17], криптомерии [18], картофеля [19], моркови *Daucus carota* [20], кипариса *Chamaecyparis obtusa* [21], мяты *Mentha sp.* [22], хлопка *Gossypium hirsutum* [23]. RGI независимо от источника выделения близки по структуре, что свидетельствует о консервативности их строения [10]. В целом показано, что RGI-подобные полисахариды присутствуют в большинстве клеточных стенок высших растений, хотя природа и количество боковых цепей заметно варьируют [24].

Клеточные культуры по содержанию пектинов сравнимы с интактными растениями или значительно превосходят их. Выявлена значительная вариабельность каллусных линий смолевки по количественному содержанию полисахаридов. При этом более существенные различия отмечены в содержании пектинов, чем арабиногалактанов. Выход АГ в различных каллусах составляет от 3,6 до 8,5% от сухой массы, выход силенана в различ-

Таблица 1

Характеристика полисахаридов каллусных культур

Каллусная культура	Полисахарид	GalA, %	Нейтральные моносахариды, %							Белок, %
			Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Api	
<i>Silene vulgaris</i>	AG	10,8	46,5	7,7	2,1	4,1	5,6	1,6	0	12,9
	SV	75,4	3,0	1,7	1,1	2,3	0,8	0,9	0	14,8
<i>Lemna minor</i>	AG	7,8	22,3	8,0	0,5	3,4	10,7	1,1	0	25,5
	LMC	52,7	8,9	8,3	2,4	1,6	2,5	0,5	1,4	19,8
<i>Tanacetum vulgare</i>	AG	13,8	28,4	13,9	0	4,0	3,7	2,2	0	36,4
	TVB	80,3	4,4	5,2	1,5	1,4	1,1	0,4	0	6,4

Примечание: AG – кислый арабиногалактан, SV – силенан, LMC – лемнан, TVB – танацетан

ных линиях варьирует от 1,4 до 10,6%. Продуцирование арабиногалактана и силенана на литр среды составляет 0,18–0,44 г/л и 0,06–0,83 г/л, соответственно. Полисахариды, входящие в состав различных клеточных линий, близки по качественному моносахаридному составу и имеют отличия в количественном соотношении моносахаридных остатков.

Выход арабиногалактана в различных каллусных линиях ряски варьирует от 0,9 до 2,7%. Продуктивность каллусов по AG на литр питательной среды составляет 0,1–0,3 г/л. Процентное содержание пектина и продуктивность в различных каллусных линиях варьируют от 0,9 до 3,3% и от 0,10 до 0,31 г/л, соответственно. Выход AG и танацетана от сухого веса каллуса пижмы составляет 8 и 6%, соответственно.

Пектины каллусных культур смолевки, ряски и пижмы, отличаются строением боковых цепей, о чем свидетельствуют полученные нами данные (табл. 1). Показано, что для пектинов каллуса смолевки и пижмы характерно низкое содержание нейтральных моносахаридных остатков (10–12%) в сравнении с пектинами каллуса ряски (25–30%). Доминирующими нейтральными моносахаридами являются остатки галактозы и арабинозы. Выявлены клеточные линии ряски, полисахариды которых содержат остатки апиозы (1–5%).

Дедифференцированные клетки разных видов растений могут продуцировать образцы пектинов близкие (клетки смолевки и пижмы) или отличные (клетки ряски) от пектинов интактных растений. В образцах пектина, полученных из каллуса ряски, обнаружена галактуроновая кислота в том же количестве, что и в интактном растении. В то же время содержание остатков галактозы и арабинозы выше в два-три раза в образцах из каллуса, чем из растения. Содержание апиозы в лемнанах из

растения значительно выше, чем в пектине из каллуса. Отличия в содержании нейтральных моносахаридных остатков, вероятно, связаны с переходом клеток к дедифференцированному состоянию, а также с условиями культивирования каллусных культур и их генетическими особенностями.

Выявлена возможность физиологической регуляции процессов роста и биосинтеза полисахаридов в культуре клеток смолевки путем изменения содержания во внешней среде углеводов, кальция, азота или фосфата.

Показано, что такие источники углеводного питания, как сахароза, глюкоза и галактоза, за исключением арабинозы, положительно влияют на биосинтез полисахаридов в каллусной культуре смолевки обыкновенной. Галактоза оказывает стимулирующий эффект на выход и продуктивность арабиногалактана. Увеличение концентрации сахарозы в среде не оказывает существенного влияния на выход полисахаридов. Тем не менее продуктивность по полисахаридам на 1 л среды возрастает за счет повышения продуктивности культуры по биомассе. Варьирование источников углерода в питательных средах не оказывает существенного влияния на биохимические характеристики арабиногалактана и силенана, тогда как увеличение концентрации сахарозы до 50–100 г/л приводит к снижению содержания галактуроновой кислоты в силенане и изменению содержания нейтральных моносахаридных остатков в силенане и арабиногалактане (табл. 2).

Изменение минерального состава питательной среды (содержания азота, кальция и фосфора) влияет на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток смолевки обыкновенной. Отсутствие в среде одного из этих элементов подавляет рост клеток и биосинтез силенана. Оптимальной для роста каллуса является сре-

Характеристика полисахаридных фракций, выделенных из каллуса *S. vulgaris*, культивируемого в присутствии различных концентраций сахарозы

Содержание, %*	Концентрация сахарозы, г/л											
	20		30		40		50		75		100	
	AG	SV	AG	SV	AG	SV	AG	SV	AG	SV	AG	SV
GalA**	13,8	80,5	11,1	70,0	10,7	71,3	11,5	65,3	9,3	58,5	9,3	57,8
Gal	35,8	2,9	43,6	1,6	47,5	4,9	39,8	5,3	52,3	2,1	49,6	2,6
Ara	7,8	2,8	8,2	0,9	12,5	3,8	12,1	3,9	14,4	2,6	17,5	3,7
Rha	2,6	1,6	2,8	0,6	3,0	1,4	2,8	1,7	2,6	1,1	3,0	1,4
Glc	2,7	1,6	1,8	1,5	4,3	1,0	3,4	1,8	4,8	1,0	3,0	2,2
Xyl	2,6	1,1	2,0	0,5	3,4	0,6	2,8	0,7	6,1	0,5	6,2	0,9
Man	0,9	1,2	1,5	0,7	2,4	0,9	3,6	1,3	4,5	0,5	4,2	1,2
Белок**	22,4	15,7	8,7	12,9	17,2	17,2	16,8	19,9	18,8	21,5	24,0	21,5

Примечание: * приведены средние значения из серии экспериментов. ** приведены средние значения из трех экспериментов. AG — кислый арабиногалактан, SV — силенан; контроль — сахароза, 30 г/л

да, содержащая 30–90 мМ общего азота, для биосинтеза силенана — среда с 60 мМ азота, а для биосинтеза арабиногалактана — среда с 90 мМ азота при соотношении аммонийной и нитратной форм 1 : 2. Изменение азотного состава среды влияет на биохимические характеристики полисахаридов. Отсутствие кальция или азота в среде вызывает снижение содержания галактуронової кислоты в силенане до 20–37% (табл. 3). Оптимальной для роста каллуса является концентрация кальция 1,5–4,5 мМ, для биосинтеза силенана — 3,0–4,5 мМ, для биосинтеза арабиногалактана — 1,5–4,5 мМ. Увеличение концентрации кальция в среде не оказывает существенного влияния на моносахаридный состав арабиногалактана, тогда как способствует увеличению содержания галактуронової кислоты в пектине. Благоприятной для роста клеток является среда, содержащая 0,63–3,75 мМ фосфата, для биосинтеза силенана — среда с 1,25–3,75 мМ фосфата. Изменение концентрации фосфата в среде не оказывает существенного влияния на уровень биосинтеза арабиногалактана в клетках и на биохимические характеристики силенана и арабиногалактана.

При воздействии на каллус ультрафиолетового излучения С (254 нм) отмечено, что содержание остатков D галактуронової кислоты (70–78%) в силенане близко к контролю. Облучение оказывает влияние на биохимические характеристики пектинов клеточных стенок, вызывая в них снижение количества остатков арабинозы и галактозы, при этом соотношение арабиноза/галактоза не изменяется по сравнению с контролем и

составляет 1 : (1,4–1,7). Независимо от продолжительности облучения наблюдали снижение примерно в 2 раза содержания остатков арабинозы и менее существенное уменьшение остатков галактозы в арабиногалактане из облученного каллуса. Соотношение арабиноза/галактоза, по сравнению с контролем (1 : 4,2), изменяется в сторону увеличения галактозы (1 : 7,7), что, вероятно, связано с отщеплением остатков арабинозы от боковых цепей пектина и арабиногалактана. Кроме того, отмечено увеличение активности арабиназы в клетках, подвергнутых облучению, что сопровождается отщеплением остатков арабинозы. Полученные данные свидетельствуют о воздействии облучения на ферментную систему растительных клеток.

При исследовании полисахаридов каллусных культур смолевки, выращиваемых в течение семи пассажей после облучения ультрафиолетом С, показано, что изменения в моносахаридном составе полисахаридов (снижение содержания остатков арабинозы и галактозы) сохраняются, что может быть связано с необратимым, регулируемым на генном уровне, изменением структуры полисахаридов клеточных стенок.

Таким образом, углеводы, азот, кальций и ультрафиолетовое излучение могут использоваться как факторы, модифицирующие строение полисахаридов растительных клеток и стимулирующие рост клеток с увеличением содержания в них полисахаридов. Изменяя условия роста каллуса, можно влиять на состав продуцируемых полисахаридов, их структуру и свойства, что

Таблица 3

Влияние азота и кальция среды на характеристики силенана SV и арабиногалактана AG

Фактор	Концентрация, мМ	Полисахарид	GalA, %*	Нейтральные моносахариды, %						Белок, %*
				Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	
NH ₄ ⁺ + NO ₃ ⁻	0 + 0	AG	9,0	19,9	7,7	1,9	4,6	7,7	4,1	17,0
		SV		4,1	3,0	1,5	1,8	3,9	2,3	1,0
	10 + 20	AG	7,5	32,4	6,5	1,8	3,2	5,7	2,6	14,0
		SV	73,9	2,7	1,6	1,1	5,6	0,8	0,8	11,4
	30 + 60	AG	9,7	44,1	9,9	2,6	5,3	5,0	1,2	18,5
		SV		2,6	1,7	1,5	1,2	0,6	0,7	14,2
	Контроль***	AG	10,8	46,5	7,7	2,1	4,1	5,6	1,6	12,9
		SV	68,3	1,9	1,2	1,0	1,7	0,5	0,7	11,8
Ca ²⁺	0	AG	10,7	38,8	13,8	3,4	3,3	2,0	1,5	18,7
		SV		3,0	1,9	1,1	2,1	0,7	0,9	9,7
	1,5	AG	8,3	43,4	11,2	2,4	6,3	4,6	4,3	16,5
		SV	68,2	4,4	2,8	1,4	2,3	0,8	1,0	16,0
	4,5	AG	8,6	45,0	9,2	2,4	1,9	3,1	1,2	13,7
		SV		2,3	1,4	1,0	1,2	0,4	0,7	20,6

Примечание: * приведены средние значения из трех экспериментов;
 ** различия достоверны при P < 0,05;
 *** контроль – NH₄⁺ : NO₃⁻ = 20+40 мМ и 3,0 мМ кальция

может иметь существенное прикладное значение при производстве наиболее ценных биопрепаратов.

Культуры клеток растений являются удобной биологической системой для направленного продуцирования физиологически активных полисахаридов и для создания биотехнологических методов получения ценных растительных полисахаридов.

Клеточные линии с высоким содержанием полисахаридов могут служить перспективным исходным материалом для получения суспензионных культур и создания на их основе линий-продуцентов ценных соединений для медицины, косметики, для пищевой и других областей промышленности и для сельского хозяйства.

Работа поддержана грантом РФФИ № 03-04-48136, грантом поддержки ведущих научных школ № НШ-1260.2003.4, грантом «Фонд содействия отечественной науке», грантом Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантом УрО РАН для молодых ученых.

Литература

1. Popov S.V., Popova G.Yu., Ovodova R.G., Bushneva O.A., Ovodov Yu.S. // Int. J. Immunopharmacol. – 1999. – Vol. 21. – P. 614–622.
2. Полле А.Я., Оводова Р.Г., Попов С.В. // Химия раст. сырья. – 1999. – Т. 1. – С. 33–38.
3. Оводова Р.Г., Головченко В.В., Шашков А.С., Попов С.В., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. – 2000. – Т. 26. – С. 743–751.
4. Murashige T., Skoog S. // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–479.
5. Gjunter E.A., Ovodov Yu.S. // Phytochemistry. – 2002. – Vol. 59. – P. 703–708.
6. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. – 1995. – Vol. 38. – P. 43–51.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
8. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.

9. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P. // *Methods Enzymol.* – 1985. – Vol. 118. – P. 3–40.
10. Ishii T., Thomas J., Darvill A., Albersheim P. // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 89. – P. 421–428.
11. Lerouge P., O'Neil M.A., Darvill A.G., Albersheim P. // *Carbohydr. Res.* – 1993. – Vol. 243. – P. 359–371.
12. Kwan J.S., Morvan H. // *Carbohydr. Polym.* – 1995. – Vol. 26. – P. 99–107.
13. Hensel A., Schmidgall J., Kreis W. // *Planta medica.* – 1997. – Vol. 63. – P. 441–445.
14. Takeuchi Y., Komamine A., Aoyama K., Saito T., Watanabe K., Morikawa N. // *Physiol. Plant.* – 1980. – Vol. 48. – P. 536–541.
15. Wagner H., Stuppner H., Schaefer W., Zenk M. // *Phytochemistry.* – 1988. – Vol. 27. – P. 119–126.
16. Lozovaya V.V., Zabolina O.A., Widholm J.M. // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 111. – P. 921–929.
17. Thomas J.R., Darvill A.G., Albersheim P. // *Carbohydr. Res.* – 1989. – Vol. 185. – P. 261–277.
18. Edashige Y., Ishii T. // *Mokuzai Gakkaishi.* – 1996. – Vol. 42. – P. 895–900.
19. Pauly M., Scheller H.V. // *Planta.* – 2000. – Vol. 210. – P. 659–667.
20. Konno H., Nakashima S., Maitani T., Katoh K. // *Physiol. Plant.* – 1999. – Vol. 107. – P. 287–293.
21. Takeuchi Y., Nishiyachi M., Aoyama K., Sato A. // *Phytochemistry.* – 1996. – Vol. 41. – P. 461–463.
22. Maruyama K., Yamamoto H., Uchiyama T. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1998. – Vol. 62. – P. 2223–2225.
23. Xiaoyang Q., Behrens B.X., West P.R., Mort A.J. // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 108. – P. 1691–1701.
24. Darvill A.G., Albersheim P., McNeil M., Lau J.M., York W.S., Stevenson T.T., Thomas J., Doares S., Gollin D.J., Chelf P., Davis K. // *J. Cell Sci. Suppl.* – 1985. – Vol. 2. – P. 203–217.

CALLUS CULTURES AS PRODUCERS OF POLYSACCHARIDES

E.A. GJUNTER, O.V. POPEJKO, O.M. KAPUSTINA, Yu.S. OVODOV

Institute of Physiology, Komi Research Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

The qualitative and quantitative composition of polysaccharides at callus cultures of a campion, duckweed and tansy is studied. The various biosynthetic activity of callus lines is revealed. Alongside with pectinaceous polysaccharides, produced by native plants, callus cultures in vitro synthesize arabinogalactans. In comparison with native plants calluses produce equal or much greater quantity of polysaccharides. Pectins of cell cultures of the campion, duckweed and tansy differ by side chains. It is shown, that a low content of the neutral monosaccharides residua is characteristic for pectins of the campion and tansy callus (10–12%), in comparison with pectins of the duckweed callus (25–30%). Dedifferentiated cells of different kinds of plants can produce examples of pectins close to ones of the intact plant pectins (in cases of campion and tansy) or different (in case of duckweed). The duckweed cell lines are revealed, which contain apiose residua (1–5%). Carbohydrates, nitrogen, calcium and ultra-violet radiation can be used as the factors modifying a structure of polysaccharides in plant cells, stimulating a growth of cells and a maintenance of polysaccharides in them. The change of above mentioned factors causes a modification in monosaccharides composition of the produced polysaccharides. Varying conditions of callus growth, it is possible to influence on composition of the produced polysaccharides, their structure and properties that can have an essential applied value for manufacture of the most important biological products.

Keywords: *Lemna minor L., Silene vulgaris (M.) G., Tanacetum vulgare L., cell culture, callus, pectin, arabinogalactan, plant polysaccharides.*

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ АМФИФИЛЬНОГО БЛОК-СОПОЛИМЕРА И ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Д.Н. ПАВЛОВ*, Н.С. МЕЛИК-НУБАРОВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Амфифильные блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (плюроники, проксанола), встраиваясь в липидную мембрану, влияют на ее структуру и барьерные свойства. Изменения, производимые плюрониками в структуре мембран опухолевых клеток, позволяют снизить их устойчивость к противоопухолевым антибиотикам. Ранее в нашей лаборатории было показано, что эффект, вызываемый воздействием амфифильных блок-сополимеров на стабильность модельных мембран, зависит от объема их гидрофобного блока и его суммарной гидрофобности.

В настоящей работе была исследована взаимосвязь структуры амфифильного полимера и его влияния на проницаемость и стабильность липидных мембран. В качестве объекта исследований был выбран синтезированный нами полиметакрилоилпроксанол (ПМП), представляющий собой несколько цепей проксанола с $M_w = 3000$, привитых к относительно короткой (6–7 звеньев) полиметакрилатной основе. В качестве объектов сравнения были выбраны линейные проксанола с аналогичным соотношением гидрофильных и гидрофобных звеньев в цепи. Для количественной оценки архитектуры макромолекул использовался структурный фактор упаковки v/SI , определяемый как отношение объема макромолекулы к площади поверхности гидрофильного блока и длине макромолекулы в радиальном направлении (то есть расстоянию между гидрофильным и гидрофобным концами молекулы).

В работе были использованы следующие материалы: двублочные монобутокси-проксанола РРЕ ($M_w = 3000$) и РЕР ($M_w = 3300$) производства НИОПИК, любезно предоставленные профессором И.Н. Топчиевой; трехблочный плюроник L64 фирмы «Serva» (Германия); яичный лецитин фирмы «Биолек» (Харьков, Украина); 1М-[(7-нитробенз-2-окси-1,3-диазол-4-ил)-дипальмитоил]-фосфатидилэтанолламин (НБД-ФЭ), произведенный фирмой «Avanti» (США). Все коммерческие препараты использовались без дальнейшей очистки.

Проксанол РРЕ был модифицирован 3-кратным избытком метакрилоилхлорида (Sigma, США) в присутствии эквимольного количества триэтиламина. Полученный макромономер отделяли от низкомолекулярных соединений хроматографией на колонке с сефадексом LH-20, используя в качестве элюата этанол. Макромономер полимеризовали при 80 °С в 30%-ном растворе ДМФА в течение 14 часов. В качестве инициатора использовали азоизобутиронитрил (Sigma, США). Полимеризационную смесь разделяли элюированием в спирте на колонке, заполненной сефадексом LH-60.

По данным аналитической ГПХ, проведенной на жидкостном хроматографе Waters, с колонками, заполненными ультрастирогелем с диаметром пор 103 А и 105 А (хроматография проводилась при 35 °С в ТГФ), M_w полученного полиметакрилоилпроксанола составила приблизительно 20000, при очень узком для радикальной полимеризации молекулярно-массовом распределении (1,17). Таким образом, молекулы полимера представляли собой так называемые «полимерные щетки», объединяющие 6–7 цепей проксанола в одной макромолекуле. В составе молекулы можно выделить гидрофильную и гидрофобную области, составленные из звеньев этиленоксида и пропиленоксида, соответственно.

Объединение нескольких цепей проксанола существенно влияет на мицеллообразующие свойства полиме-

* Автор для переписки:

© 2005 г. Павлов Дмитрий Николаевич,

младший научный сотрудник

химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Адрес: 119992 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, ГСП-2,

МГУ, химический факультет

Тел.: (495) 9393114, E-mail: dmitrynpavlov@yandex.ru

ра. Критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) определяли по возгоранию флуоресценции дифенилгексатриена (Reanal, Венгрия) при солиобилизации в полимерные мицеллы ($A_{,ex} = 366$ нм, $A_{,ст} = 433$ нм). Для определения ККМ использовали водные растворы полимеров. Температура 25 °С. ДФГТ вносили в виде 1 мМ раствора в тетрагидрофуране, причем конечная концентрация ТГФ в образцах составляла 2% .

Было обнаружено, что ККМ полиметакрилоилпроксанола падает почти на два порядка по сравнению с исходным РРЕ.

Было также исследовано влияние полимеров на скорость рН-индуцированного транспорта доксорубина в липосомы. Липосомы получали с помощью ультразвукового диспергатора. рН внутреннего буферного раствора составлял $4,0$, внешнего — $7,0$. Внешний и внутренний буферы были изоосмотичны. Измерение скорости транспорта доксорубина внутрь липосом наблюдали по гашению его флуоресценции.

При низких концентрациях ПМП, в отличие от остальных исследованных полимеров, вызывает ускорение транспорта доксорубина в липосомы. При увеличении концентрации ПМП происходит размывание градиента рН, что можно объяснить образованием трансмембранных пор.

Для подтверждения этого предположения были проведены исследования вытекания карбоксифлуоресцеина (КФ, Sigma, США) из липосом. В растворе при рН 7 карбоксифлуоресцеин находится в депротонированной форме и не может проникать через липидный бислой по механизму «растворения-диффузии». Были приготовле-

ны липосомы, содержащие $0,1$ М КФ при рН $7,2$. Изучали вытекание флуоресценции карбоксифлуоресцеина при вытекании из липосом. Из полученных кинетических кривых определяли угловой коэффициент возгорания флуоресценции после добавления полимеров β -СФ.

Как и при исследовании ККМ, наибольший эффект оказывает ПМП. Результаты, полученные для двухблочных полимеров, сравнимы между собой, и наименьшее порообразование вызывает L64.

Встраивание полимеров в бислой вызывает возмущение его структуры, что можно оценить количественно по ускорению трансбислойной миграции липидов (флип-флоп). Изучение скорости флип-флопа проводили так называемым дитионитным методом. Липосомы, содержащие $0,5\%$ (по массе) НБД-ФЭ, восстанавливали дитионитом натрия. В мягких условиях ($0,05$ М $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, рН $7,0$) НБД восстанавливается только на внешней поверхности липосомы. Полученные таким образом липосомы инкубировали с полимерами и наблюдали гашение флуоресценции НБД.

При проведении исследований на модельных липидных везикулах было найдено, что ПМП сильнее повышает проницаемость и скорость флип-флопа, нежели его линейные аналоги.

При изучении влияния полиметакрилоилпроксанола на опухолевые клетки было показано, что ПМП обладает чрезвычайно низкой собственной токсичностью. При этом полиметакрилоилпроксанол не способствовал накоплению доксорубина в ядрах устойчивых опухолевых клеток, что можно было бы ожидать, исходя из результатов опытов на модельных мембранах.

КОНЦЕПЦИЯ, СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ «РАЗВИТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НА 2006–2015 гг.»

А.А. ВОРОБЬЕВ, Р.Г. ВАСИЛОВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

1. Введение

Биотехнология наряду с информатизацией стала одним из главных научно-практических направлений XXI века, определяющих уровень мировой цивилизации. В связи с этим развитие биотехнологии является стратегической задачей России, необходимой для обеспечения ее статуса великой державы.

Продукция, полученная с помощью методов промышленной биотехнологии, имеет выход практически во все отрасли народного хозяйства: медицину (антибиотики, гормоны, вакцины, ферменты, диагностические системы), сельское хозяйство (кормовой белок, аминокислоты, средства защиты растений и животных), пищевую промышленность (дрожжи, спирт, глюкозные сиропы), химическое производство (полисахариды, биодegradуемые полимеры, биокатализ), энергетику (биоэтанол, биогаз, биодизель), экологию (биоремедиация, сохранение биоразнообразия).

Помимо решения существующих и краткосрочных задач биотехнология имеет значение как средство решения долгосрочных проблем, а именно: переход от использования невозобновляемых ресурсов к возобновляемому сырью. Это сама по себе глобальная геополитическая задача в связи с истощением минеральных природных запасов, изменением климата планеты и ростом народонаселения, которую должно решать человечество в целом и отдельные государства, в частности. Ведущие страны мира (США, Великобритания, Китай и др.)

уже приняли на этот счет соответствующие программы. Россия пока ее не имеет.

Следует отметить, что мировые финансовые круги, руководители государств, ведущие ученые и эксперты, общественность уже давно осознали ключевую роль биотехнологии в наступившем столетии. Об этом свидетельствуют капиталовложения в эту отрасль, рост рынка биотехнологической продукции, совершенствование законодательной базы и т.д. Появился даже термин «биоэкономика», то есть экономика, основанная на биологии и промышленной биотехнологии («bio-based economy»).

К сожалению, Россия по всем формальным показателям занимает аутсайдерскую позицию в данном вопросе. Доля Российской Федерации в мировом объеме производства биотехнологической продукции в настоящее время составляет менее 0,2%, хотя четверть века назад была цифра 5%. При этом отмечается парадоксальный факт — сохранилась материальная база, кадры, научные работники отрасли, в те времена являвшейся самой передовой в нашей стране.

В последние годы такая ситуация стала адекватно оцениваться руководством государства, обществом и представителями бизнеса. В результате активности в данном направлении часть биотехнологической продукции является импортозамещающей (иммунобиологические препараты, препараты для ветеринарии). Однако в целом по всему спектру биотехнологических продуктов констатируется крайне неблагоприятное для России положение, когда существует почти 100%-ная зависимость от импорта (инсулин, антибиотики, аминокислоты и др.). Со стороны научного сообщества и министерств и ведомств, курирующих науки о жизни, в том числе биотехнологию, отмечается стабильный интерес и поддержка (имеются проекты в ФЦП, гранты, целевое бюджетное финансирование и др.), однако эффективность вкладыва-

* Автор для переписки:

© 2005 г. Василев Раиф Гаянович,

д.б.н., профессор,

вице-президент ОБР

Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9

Тел.: 8-916-640-76-18

E-mail: obr@biosinfo.ru

емых средств незначительна и не соответствует уровню стоящих перед отраслью задач.

Оценивая вышеуказанное положение дел в отечественной биотехнологии, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова выступило с инициативой создания долгосрочной общегосударственной комплексной программы, основанной на различных механизмах бюджетной и внебюджетной поддержки и направленной на ускоренное развитие биотехнологии в стране. На протяжении последних двух лет эксперты Общества биотехнологов России разрабатывали концепцию, структуру и методы осуществления этой программы, которая получила наименование Национальная программа «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» на основе государственно-частного партнерства.

2. Концепция программы

Главная идея программы состоит в интеграции возможностей государства, бизнеса и общества вокруг проблемы биотехнологии и реализации приоритетных проектов общегосударственного и регионального уровней, направленных на решение экономических и социальных задач.

Программа рассчитана на 10 лет и включает в себя перечень актуальных проектных предложений и подпрограмм, разделенных по степени приоритетности: от национального (общегосударственного) до регионального и обычного целевого проекта.

Программа построена по традиционному программно-целевому принципу, принятому в бюджетных государственных программах федерального или регионального уровней (ФЦП, ОЦП). Такой способ планирования и концентрации средств показал свою эффективность и в отдаленном прошлом, и в настоящее время. Основное, чего старались избежать разработчики, — это разобщенности, несогласованности и недостаточности целевой проработки программных мероприятий, свойственных большинству имеющихся программ.

В предлагаемой программе четко прописаны главная цель, древо целей и конкретных задач, количественные параметры, на которые требуется выйти в течение периода ее действия, а главное — к моменту окончания.

Программа состоит из набора взаимоувязанных проектов, каждый из которых перед включением в нее проходит экспертизу и получает соответствующую оценку по степени готовности и источникам финансирования. Для каждого проекта составляются бизнес-план,

техническое задание и др. За ним закрепляется ответственный координатор (менеджер). Предусматривается регулярная реэкспертиза и коррекция программы, вплоть до исключения неперспективных проектов и включения новых. Предполагается использование сетевого принципа интеграции проектов.

Важным моментом настоящей программы является специальное информационно-организационное сопровождение и взаимодействие с руководящими органами законодательной и исполнительной власти федерального и регионального уровней.

Одна из существенных особенностей программы заключается в наличии пакета региональных подпрограмм и проектов, которые позволят вовлечь в реальную работу большое число субъектов РФ, имеющих возможности для развития биотехнологии на местах. От федерального центра, заказчиков и координаторов программы потребуются обеспечение современной методологией, высокопрофессиональными кадрами и помощь в организации межрегионального сотрудничества и рынков сбыта.

3. Структура

В основу построения программы заложены следующие подходы:

- программа призвана стать системным интегратором существующих проектов и программ и саморазвивающимся механизмом генерации новых идей, проектных предложений и инвестиционных (инновационных) проектов разной степени готовности;
- программа носит индикативный характер, формулирует приоритетные цели и задачи, определяет возможные пути реализации (планируемая стоимость, предполагаемые источники финансирования, рынки сбыта, прогнозы, информационное сопровождение и т.д.);
- программа должна включать в себя региональные проекты с их специализацией, возможностями межрегиональной кооперации и решения задач федерального уровня; в этом отношении она может рассматриваться в качестве одного из элементов концепции пространственного развития России. Программа состоит из 4 разделов:
- национальные приоритетные проекты;
- федеральные проекты;
- региональные (межрегиональные, окружные) проекты (программы);
- целевые проекты (внебюджетные, международные и иные проекты).

В разделе «Национальные приоритетные проекты» экспертным путем отобраны 6 проектов, среди них такой сверхважный, как сохранение национальных биологических и микробиологических коллекций, а в перспективе — формирование Национальных биоресурсных центров. Сюда же входят такие проекты, как перевод энергетики и химической промышленности на возобновляемое сырье (проекты «Биодизель», «Биодеградируемые полимеры», «Биокатализ» и др.), широкомасштабное производство кормового белка для животноводства и птицеводства, развертывание крупнотоннажного производства глюкозных сиропов для пищевой промышленности.

Раздел «Федеральные проекты» включает в себя 10 направлений, в том числе фундаментальную биотехнологию, медицинскую, сельскохозяйственную, пищевую, промышленную биотехнологию и др., а также ФЦП «Приоритетные научно-практические направления биотехнологии (2009—2015)», которую планируется сформировать в течение ближайших двух-трех лет с обязательным включением в нее вопросов методологии, законодательного обеспечения и координации.

В разделе, посвященном региональным проектам, на первом этапе реализации планируется включить 5—7 регионов, а затем довести это число до 30.

Раздел «Целевые проекты» включает в себя готовые к реализации внебюджетные проекты, а также проекты международного сотрудничества в сфере биотехнологии с разными государствами (СНГ, ЕС, Китай, Индия, США, Латинская Америка).

Все разделы и направления содержат перечень проектов с указанием ориентировочной стоимости, возможных источников финансирования и степени готовности.

4. Механизмы реализации. Финансирование

Настоящая Программа фактически не имеет прецедентов — в ней ставится задача объединить государственные и негосударственные механизмы, направленные к единой цели: вывести отечественную биотехнологию из состояния кризиса и сделать ее эффективным средством обеспечения материального благополучия страны и создания общества, построенного на знаниях. По сути дела, создается опытная модель формирования и реализации междисциплинарной Программы на основе государственно-частного партнерства, необходимость которого неоднократно декларировалась руководителями государства.

Необходимость осуществления данной Программы диктуется и жесткими временными рамками. Если в течение 5—7 лет государство, бизнес и общество Российской Федерации не объединят усилия по развертыванию наиболее рентабельных высоких технологий, к которым относится биотехнология, то, по крайней мере, на ближайшие десятилетия нашей стране будет уготовано место абсолютного сырьевого придатка для транснациональных корпораций, которые целиком заполняют рынок собственной биотехнологической продукцией. Особенно это актуально в связи с предстоящим вступлением России в ВТО.

В связи с указанным в Программе отводятся первые места готовым инвестиционным проектам. Такие проекты уже подготовлены рядом организаций Союза предприятий биотехнологической отрасли (ОАО «Восток», ООО «Группа компаний «Биопроцесс», ЗАО «Медико-технологический холдинг», ОАО «Биопрепарат», ФГУП «НПО «Микроген» и др.). В случае проработки организационных вопросов, в том числе рынков сбыта, законодательного обеспечения налоговых преференций и льготного кредитования и др., эти предприятия могут обеспечить потребность в жизненно важных препаратах для медицины, сельского хозяйства и т.д. (соответствующие объемы приводятся в бизнес-планах).

Большие надежды Общество биотехнологов России как основной разработчик и координатор Программы возлагает на организации, работающие в нашей стране и применяющие новые высокие технологии, такие как ООО «ХимРар», ЗАО «Медицинский центр «Авиценна» и др., которые достаточно интегрированы в мировой рынок и могут быть полезны для развития биотехнологии в России.

Вхождение в Программу дает каждому ее участнику следующие преимущества: использование в полном объеме баз данных Общества биотехнологов России; возможность привлечения дополнительных инвестиционных ресурсов; помощь в кадровом обеспечении; выработка консолидированных государственно-частных позиций с целью совершенствования законодательных и экономических механизмов на федеральном и региональном уровнях.

Особое место в программе принадлежит поддержке высококлассных отечественных разработок. Речь идет, например, о запуске в производство генно-инженерного инсулина (ИБХ РАН), промышленном микробиологическом синтезе ряда биологически активных веществ (ГосНИИГенетика), производстве рекомбинантных

белков для медицины, в том числе для лечения вирусных гепатитов и СПИДа (ГНЦ «Вектор», НИИ ОЧБП), широкомасштабном выпуске терапевтических моноклональных антител (Российский кардиологический НПК) и др. Здесь вопрос о финансировании может решаться как по бюджетной линии, так и с помощью привлечения внебюджетных инвестиций.

Наибольший объем финансирования требует реализация раздела «Национальные приоритетные проекты». По предварительным оценкам, для осуществления реализации проектов этого раздела потребуется вложение более 60 млрд. рублей в течение 10 лет. Ясно, что речь идет о долгосрочном инвестировании, которое невозможно без ключевой роли государства. При этом активная позиция государства является залогом привлечения средств частных инвесторов. Реализация данного раздела Программы даже не в полном объеме, по сути, может вывести страну из кризисной ситуации в отношении биотехнологии.

Ключевым принципом финансирования Программы является создание эффективного механизма государственно-частного партнерства при гибком планировании проектов. Проекты для включения в Программу отбираются сугубо индивидуально, при всестороннем учете баланса интересов и долевого участия потенциальных исполнителей и заказчиков.

В целом финансирование Программы планируется в следующих пропорциях: общий объем финансирования Программы составляет 150000,0 млн. рублей, в том числе за счет средств федерального бюджета — 15000,0 млн. рублей (10%), за счет средств бюджетов субъектов Российской Федерации — 45000,0 млн. рублей (30%) и за счет средств внебюджетных источников — 90000,0 млн. рублей (60%). Эти плановые цифры являются оценочными, а реальное финансирование будет осуществляться по мере привлечения инвестиций.

В качестве одного из источников финансирования Программы планируется Фонд поддержки Национальной программы развития биотехнологии.

5. Ожидаемые результаты

Реализация Программы позволит решить следующие проблемы:

- создать статус России как государства с экономикой нового типа, основанной на знаниях;
- обеспечить массовое производство социально значимой отечественной биотехнологической продукции; сформировать перспективный, ста-

бильный, импортозамещающий рынок продукции и услуг повышенного спроса (питание, лекарства, диагностика) — по всем продуктам намечены плановые, реально достижимые цифры;

- обеспечить сохранение и рациональное использование генетических ресурсов России;
- решить проблемы биологической и экологической безопасности.

Социальный эффект от реализации программы при достижении намеченных показателей будет значительным (решение проблем трудоустройства, сохранение квалифицированных кадров и т.д.).

Проекты Программы в большинстве своем являются высококоррелябельными, в отдельных случаях на протяжении 10 лет возможно реинвестирование в отрасль. По расчетам специалистов, средний срок окупаемости промышленных проектов не превысит 5 лет. Кроме того, прогнозируется, что стоимость биотехнологической продукции, произведенной участниками Программы, к 2015 году составит около 300 млрд. руб.

6. Информационно-организационное сопровождение

Необычный характер Программы (имеется в виду реализация принципа государственно-частного партнерства) диктует особые условия ее организационного сопровождения. При этом возрастает роль информационного обеспечения в связи с тем, что потребуются анализ выполнения как собственных проектов Программы, так и оценка эффективности реализуемых проектов вне нее, а также постоянный мониторинг рынка биотехнологической продукции. Будут широко применяться методы экономико-математического моделирования, составления средне- и долгосрочных прогнозов.

Для обеспечения этих задач Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова располагает необходимыми кадрами экспертов, консультантов и информационной базой, включая новейшие серверные технологии.

Отбор проектов будет осуществляться группой сопровождения с двухуровневым экспертным советом.

Бюджетная составляющая Программы контролируется в соответствии с действующим законодательством и нормативными актами. В случае открытия финансирования из средств государственного бюджета создается соответствующая организационная форма (дирекция, координационный совет и др.).

Группа сопровождения Программы, Центральное Правление Общества биотехнологов России, Экспертный совет по биотехнологической промышленности Госдумы РФ как общественные структуры будут осуществлять постоянный мониторинг открытых отечественных и зарубежных конкурсов грантов в сфере биотехнологии. Будет также использован механизм получения информации на основе сотрудничества Общества биотехнологов России с другими общественными организациями, ассоциациями и академиями РФ и других стран (с некоторыми из них у Общества установлены договорные отношения — РАН, Европейская федерация биотехнологии).

7. Взаимодействие с органами государственной власти

Проекты национального, федерального и регионального уровней будут формироваться при тесном взаимодействии с соответствующими государственными структурами. Федеральный уровень будет реализовываться во взаимодействии с Государственной Думой РФ, Правительством РФ, профильными министерствами и ведомствами. С большинством из них к настоящему времени Обществом биотехнологов России установлены контакты. Региональный уровень обеспечивается взаимодействием с органами законодательной и исполнительной власти субъектов РФ.

8. Прогнозы (разные сценарии развития биотехнологии в России)

Общество биотехнологов России провело предварительные оценки прогностических сценариев в отношении перспектив развития биотехнологии и ее влияния на социально-экономический статус страны. Существуют 2 пути — позиция невмешательства или активная поддержка биотехнологии.

Возможный сценарий развития страны в случае недостаточной поддержки отечественной биотехнологии (в том числе непринятии специальной национальной программы):

- импортозависимость по жизненно важным лекарственным препаратам (антибиотики, гормоны — инсулин и др., онкологические и противовирусные препараты);
- дефицит обеспечения населения сбалансированным оптимальным питанием;

- снижение качества жизни основной массы населения и прогрессирующее его убывание;
- нарастание груза экологических и энергетических проблем;
- отсутствие базы противодействия биотерроризму и решения вопросов биобезопасности в целом;
- экономическое отставание и утеря квалифицированных кадров.

Альтернативный путь развития в случае поддержки отечественной биотехнологии (в том числе принятия специальной национальной программы):

- импортозамещение не менее 20% по жизненно важным медицинским препаратам;
- обеспечение населения качественными продуктами питания отечественного производства;
- повышение качества жизни в соответствии с современным уровнем науки и практики;
- решение проблем биодegradации, преобразования энергетики и химической промышленности на основе возобновляемого сырья (не менее 10%);
- внедрение новейших технологий в систему противодействия биотерроризму и обеспечения биобезопасности;
- повышение экономического благосостояния и решение проблем трудоузанятости.

9. Заключение

Таким образом, биотехнология является одним из мощных рычагов подъема национальных экономик. В мире возрастает конкуренция в области биотехнологии. Каждая страна пытается найти свое место в этой гонке, иметь свое лицо, получить свой «биотехнологический паспорт». По мнению экспертов, именно уровень и состояние развития биотехнологии будет являться одним из важных критериев оценки развития того или иного государства в XXI веке.

Развитие биотехнологии во многом обусловлено потребностями рынка в связи с увеличением спроса на продукты питания, медикаменты, энергоресурсы и т.д. На первый взгляд, в связи с высокой рентабельностью биотехнология не нуждается в особом регулировании. Тем не менее программно-целевой метод в современном мире далеко не исчерпал свои возможности. Достаточно сказать, что даже такая страна с рыночной экономикой, как США, приняла долгосрочную программу по биотехнологии до 2025 года с конечной целью доведения уровня продукции химической промышленности из возобновляемого сырья до 25% («Закон о биомассе», 2001 г.). В

связи с биотехнологией нельзя не упомянуть опыт Кубы, которая в настоящее время занимает 7-е место в мире по биотехнологическому рейтингу. Эта крошечная страна по сравнению с гигантской по ресурсам и кадрам Россией достигла столь впечатляющих успехов благодаря тому, что в 1985 году она приняла соответствующую программу подъема национальной биотехнологии при непосредственном участии и руководстве вице-президента АН СССР академика Ю.А. Овчинникова. Вряд ли стоит говорить о бурном росте биотехнологии в последние годы в таких государствах, как Китай, Индия, Бразилия и др. с их колоссальным потенциалом также благодаря целенаправленной поддержке правительств.

Реализация Программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» позволит ликвидировать отставание нашей страны в этой стратегически важной области, будет способствовать построению новой экономики, основанной на знаниях, обеспечит ее конкурентоспособность в условиях глобализации, даст возможность решить ряд важных проблем социально-экономического развития.

Данная статья представляет собой доклад, сделанный на III съезде Общества биотехнологов России 25 октября 2005 г.

ПУТИ РАЗВИТИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В.Г. ДЕБАБОВ*

Государственный научный центр РФ «ГосНИИгенетика», Москва

Российская Федерация представляет собой уникальное явление в современном мире. Есть страны развитые, страны развивающиеся и страны слабо развитые и застывшие на этом уровне, например, страны Африки. Российская Федерация — единственная страна в мире, которая в последние 15 лет уверенно двигалась от высокоразвитой страны с высокими стандартами образования, науки, культуры, здравоохранения к слабо развитой стране с разрушением высокотехнологических отраслей промышленности, сельского хозяйства, понижением образовательных стандартов, деградацией науки, здравоохранения. Обнищание значительной части населения вместе с разрушением социальной структуры имеет следствием тяжелый демографический кризис (ежегодная убыль населения России — от 0,8 до 1 млн. чел.).

Все это в полной мере относится к промышленной биотехнологии, которая является существенной частью биотехнологии. СССР занимал второе место в мире по производству антибиотиков после США, но с началом перестройки их производство неуклонно падало и, наконец, в 2005 г. было полностью прекращено. Наши комбинаты в Пензе, Кургане, Красноярске фасуют китайские и индийские субстанции. В СССР в 1989 году было произведено 40 тыс. тонн кормовой кислоты L-лизина — чрезвычайно эффективного вещества в свиноводстве и птицеводстве. В то время в США производили 20 тыс. тонн лизина. Сегодня в Российской Федерации лизин не производится, ввозится из-за рубежа около 5–6 тыс. тонн, а в США производят 220 тыс. тонн лизина, в Китае — 250 тыс. тонн, причем, все производство в этом государстве создано за последние 10 лет.

В России снижено производство ферментов в 3–4 раза, а рынок захвачен иностранными компаниями. Производство биологических средств борьбы с вредными насекомыми снижено с 15 тыс. тонн в год в СССР до приблизительно 0,5 тыс. тонн в нынешней Российской Федерации. На действующих предприятиях «Сиббиофарм» (г. Бердск Новосибирской обл.), АО «Восток» (Кировская обл.) ферментационные мощности используются на 30–40%. Оборудование физически и морально устарело. Отраслевая наука в значительной степени разрушена, так что уже и не способна создавать новые технологии, например, в области антибиотиков такой способности полностью лишен Государственный центр по антибиотикам. Государство не поддерживало отраслевую науку (кроме ГНЦ), а заказов от отечественной промышленности практически не было на протяжении всех 15 лет. Отечественные инвесторы вряд ли заинтересуются промышленной биотехнологией до тех пор, пока существуют области, где капиталы могут приносить 100–200% годовых или хотя бы 30–40% (как в строительном комплексе Москвы).

Строительство микробиологического завода довольно дорого, например, завод по производству 20 тыс. тонн лизина в год может стоить от 50 до 70 миллионов долларов. При себестоимости лизина около 1,5–2,0 доллара, а Российской Федерации это будет скорее 2 доллара и продажной цене около 2,5 долларов за 1 кг, годовая прибыль составит около 10 миллионов, чистая прибыль — 8 миллионов долларов, то есть окупаемость капложений составит от 6 до 8 лет. За 10 лет можно получить 20–40 миллионов долларов прибыли, то есть в лучшем случае 8% годовых. Под этот процент даже невозможно получить кредит.

Существуют трудности развития микробиологической индустрии в Российской Федерации, связанные с отсутствием дешевого и стандартного сырья. Во всем мире основным сырьем является сахар (Бразилия и другие страны, где растет сахарный тростник) или глю-

* Автор для переписки:

© 2005 г. Дебабов Владимир Георгиевич,
член-корреспондент РАН, академик РАСХН,
директор ГНЦ РФ «ГосНИИгенетика»
Адрес: 113545 Москва, 1-Дорожный проезд, 1,
Тел. (495) 3153747 E-mail: genetika@genetika.ru

козные сиропы (осахаренный крахмал). Источником крахмала в США является кукуруза, в Европе — кукуруза, пшеница и картофель. В Российской Федерации сахар намного дороже мирового уровня. У нас низкая агротехника и семеноводство, возделывание сахарной свеклы и плохая ее переработка, вследствие чего себестоимость отечественного сахара высока. Для защиты российского производителя устанавливаются таможенные барьеры, что приводит к ценам приблизительно 40 центов за 1 кг при мировых около 20–25 центов. Производство глюкозных сиропов в Российской Федерации в достаточных количествах не организовано. В мире глюкоза в сиропах стоит дешевле сахара (в США — около 19 центов за 1 кг, в Европе — около 25 центов за 1 кг). Правда, в последние годы интерес к получению глюкозных сиропов в нашей стране растет. Так, американская фирма «Cargill» приобрела завод в г. Ефремов Тульской области в 1995 г. Вложив около 60 миллионов долларов, фирма построила установку для получения глюкозных сиропов на базе зерна кукурузы мощностью приблизительно 30–50 тыс. тонн, став крупнейшим в Российской Федерации поставщиком этого продукта для кондитерской промышленности. Сейчас закончена вторая очередь (инвестиции около 100 млн. долларов) и построена установка для получения глюкозных сиропов из 300 тыс. тонн зерна пшеницы (это составляет около 120–150 тыс. тонн глюкозы). Цены на глюкозу в сиропах на 7–8% ниже, чем на сахар. Выше упоминалось, что сахар в Российской Федерации дороже мирового уровня приблизительно в 2 раза. Эти цены будут оставаться высокими, пока не появятся конкуренты и не насытится рынок заменителей сахара. Это может наступить не скоро, так как в США 70% всего сладкого, что едят их граждане, — это глюкозо-фруктозные сиропы, получаемые с помощью изомеризации глюкозы.

Для Российской Федерации переработка 8–10 млн. тонн зерна в глюкозо-фруктозные сиропы является государственной задачей, так как может стабилизировать рынок зерна, улучшить питание населения (фруктоза в 2,5 раза слаще сахара, то есть будет снижено потребление калорий), будет прекращен импорт сахара, будет создана база для микробиологической индустрии. Интерес к переработке зерна в крахмал, глюкозу и фруктозу проявляют предприятия Казахстана, Украины, но только Белоруссия ввела в действие реальное производство — завод по получению кристаллической глюкозы медицинского назначения мощностью 5 тыс. тонн в год на базе крахмала картофеля (переработка 25 тыс. тонн картофеля). Завод построен в период 1998–2002 гг.

Промышленная биотехнология в мире развивается более быстрыми темпами, чем остальные ветви биотехнологии. Сегодня говорят о третьей волне биотехнологической революции (первая волна — генно-инженерные лекарства на основе белков человека: инсулин, гормон роста, интерфероны, эритропоэтин и т.д.; вторая волна — генно-инженерные растения; третья волна — промышленная биотехнология). Конечно, медицинская и сельскохозяйственная биотехнологии будут продолжать развиваться, причем быстрыми темпами, но промышленная биотехнология по темпам будет впереди в ближайшие 15 лет. В области промышленной биотехнологии быстро растут объемы производства традиционных продуктов: аминокислот (лизин — 600 тыс. тонн, глутаминовая кислота — 1,3 млн. тонн), ферментов (рост — 7–10% в год). Растет производство витаминов, полисахаридов, но главным катализатором роста являются энергетика (топливный этанол, биодизель) и «белая химия», то есть производство химикалий, биоразлагаемых пластиков из возобновляемого сырья (в конечном счете все из той же глюкозы).

В США бурно растет производство топливного этанола. С 2000 по 2005 гг. производство возросло с 4,8 до 8,6 млн. тонн в год. Капитальные вложения составляют около 1 млрд. долларов на производство 1 млн. тонн в год. Себестоимость этанола в США приблизительно 350 долларов за тонну, но эта отрасль пользуется налоговыми льготами со стороны правительства США и льготами правительств штатов. Процветание отрасли основано на законе США, требующем добавлять в бензин кислородсодержащие вещества. Сегодня в бензин добавляют 10% этанола. В США сокращается производство и закрываются заводы по производству метилтретбутилового эфира (МТБЕ) (кислородсодержащая добавка), надо не допустить их строительство в Российской Федерации. В США данное вещество признано опасным для человека и окружающей среды. По прогнозам, к 2020 году производство топливного этанола может достигнуть в США 25–30 млн. тонн. Интересно, что весь этот рост может быть обеспечен за счет роста урожайности кукурузы. Сейчас используется 11% кукурузы для производства этанола. Рост урожайности ускоряется с 1996 года, когда начала широко внедряться на полях генно-инженерная кукуруза.

В США и Европе быстро растет производство биодизеля — это метиловые или этиловые эфиры жирных кислот, получаемых из растительных масел: в США — из соевого и кукурузного масла, в Европе — из рапсового. В 2005 году в Германии пущен завод мощностью 600

тыс. тонн биодизеля, а в целом в Европе производят уже 2 млн. тонн. Для расщепления растительных жиров и переэтерификации в перспективе будет использоваться липаза. Предполагается, что к 2025 году, а с ростом цен на нефть может быть и раньше, в США 25% всех органических химикалиев и полимеров будет производиться из возобновляемого сырья.

Яркий пример этого — производство 1,3-пропандиола клетками *E. coli*. Такое производство запущено в США. Природные организмы не могут синтезировать 1,3-пропандиол из глюкозы — это генно-инженерный штамм. Цена снижена в 2 раза по сравнению с химическим синтезом, от 7–8 до 3–4 долларов за 1 кг. Сополлимер 1,3-пропандиола с терефталевой кислотой широко используется для ковровых покрытий, обивки салонов автомобилей. Мировая потребность в 1,3-пропандиоле на ближайшие годы — 2,5 млн. тонн.

Наконец, появился биodeградируемый пластик — полилактид (полимер молочной кислоты), который имеет шансы конкурировать с химическими полимерами общего назначения, такими как полиэтилен и полипропилен, как по цене, так и по качеству. В 2002 г. фирмами Cargill и Dow Chemical в США пущено совместное предприятие по производству 140 тыс. тонн молочной кислоты и производства на ее основе полилактида. До этого во всем мире производилось около 60 тыс. тонн молочной кислоты, причем 50/50 химическим и ферментативным методом. К 2004 году завод работал на полную мощность, и полилактид нашел применение в пленках для упаковки продуктов и товаров, в производстве нитей, футболок и т.д. К 2007 году планируется увеличение мощности предприятия до 500 тыс. тонн. Цена молочной кислоты упала от 1 доллара за 1 кг в 2000 г. до 50 центов за кг — в 2004 г. Дальнейшее снижение возможно только при переходе к другому сырью, например, лигноцеллюлозе (солома, стержни от початков кукурузы).

В Российской Федерации существуют объективные предпосылки для развития микробиологической промышленности. Во-первых, имеется производство сырья — зерна по конкурентным мировым ценам. Кроме того, в Российской Федерации существуют традиции переработки остатков древесины в сахара (гидролизная промышленность). Эта промышленность на новой технологической базе есть надежда мировой биотехнологии.

В США, а теперь и в Европе созданы специальные государственные программы развития технологий по осахариванию лигноцеллюлозы. В 2004 году в Канаде запущен опытный завод по получению спирта на основе соломы злаковых (около 2 тонн в день). В 2005 г. в

США запускаются 2 опытные установки, использующие стержни кукурузы, мощностью приблизительно 10 тонн в день.

Кроме того, в Российской Федерации достаточно дешевой энергии, места и пресной воды, что необходимо для масштабного микробиологического производства. Наконец, в Российской Федерации изменились и экономические и политические условия. Президент и Правительство объявили о том, что страна должна от сырьевой экономики перейти к экономике знаний. Это, конечно, — длительный процесс. Мировые цены на нефть, газ также благоприятны для нашей страны.

В силу объективных причин Российская Федерация может претендовать на лидерство на Евро-Азиатском континенте в области производства биodeградируемых биополимеров, топливного этанола, химикалиев на базе органических кислот. Азии трудно будет выделить пищевые ресурсы для технических целей из-за высокой плотности населения, в Европе такое производство трудно разместить (мало воды, дорога энергия, дорогое сырье).

Можно только приветствовать реформу науки, начатую Минобрнауки в 2005 году. Эта реформа направлена на мобилизацию и развитие научного потенциала, а также создание инновационной инфраструктуры. Впервые после СССР на конкурсной основе для проектов выделяются реальные средства, достаточные для осуществления этих проектов. Так, в 2005–2006 гг. должны быть выполнены проекты по техническим промышленным ферментам и по биodeградируемому пластику — полигидроксibuтирату. Финансирование этих двух проектов составляет 240 млн. рублей (около 8,5 млн. долларов). К концу 2006 г. мы должны иметь готовые для внедрения технологии. Конечно, это дело новое и возможны издержки. Не совсем понятно, почему выбран полигидроксibuтират, а не лактат. Полигидроксibuтират под маркой «Biopol» разработан и выпускался с конца 70-х годов фирмой «ICI», и за это время его выпуск увеличился с 1 до приблизительно 4 тыс. тонн в год. Это — пластик специального назначения, главным образом, для медицины. Также неясно, правильно ли выбраны коллективы для осуществления этих проектов, которые относятся к РАН и МГУ. Это очень высококвалифицированные и авторитетные научные организации, но не имеющие опыта работы с технологиями и промышленностью. В любом случае создание крупных НИОКР-проектов — это правильное направление. Никто, кроме государства, не поддержит эти исследования на ранних стадиях развития. Кажется, новыми большими проектами

могут быть осахаривание зерна, лигноцеллюлозы, молочная кислота и полилактоиды, топливный этанол. Для всех перечисленных проектов и для огромного спектра других технологий требуется использование ферментов.

Таким образом, для Российской Федерации кажется перспективным создание производства ферментов, топливного спирта, биodeградируемых пластиков (полигидроксиалконатов, полилактатов).

Кроме того, перспективно развитие не крупнотоннажных производств — катализаторов для химической промышленности, биомассы для биodeградации ксенобиотиков в окружающей среде, обессеривания бензинов и дизельного топлива, производства средств защиты растений, процессов биотрансформации антибиотиков, стероидов. Для всех вышеперечисленных процессов в Российской Федерации имеется научный и технический потенциал.

Не следует сбрасывать со счетов и развитие биотехнологических производств на территории Российской Федерации иностранными компаниями. Выше уже приводился пример Cargill. Это надо приветствовать, но регулировать и направлять в нужном для Российской

Федерации направлении. Например, кажется, было бы хорошо, если бы иностранные компании в ближайшие годы построили на территории Российской Федерации завод по производству лизина и по производству антибиотиков (или купили и реконструировали бы один из наших комбинатов). Для этих целей надо правительству объявить приоритеты, гарантировать фирмам выделение земли, льготы по налогам, оградить от бюрократической волокиты и коррумпированных чиновников.

Все вышеизложенное относится к крупномасштабной микробиологической промышленности, которая производит десятки и сотни тысяч тонн продуктов достаточно низкой стоимости. Развитие малотоннажной индустрии, например, производство белков человека в качестве лекарств с использованием культивирования микроорганизмов или культур клеток животных, — это совсем другая проблема, возможно, не маловажная, но она должна быть рассмотрена отдельно.

Данная статья представляет собой доклад, сделанный на III съезде Общества биотехнологов России 25 октября 2005 г.

ГЕНЕРАЦИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ В БИОТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1*}, О.Н. ПОНАМОРЕВА², Т.А. РЕШЕТИЛОВА¹,
В.А. БОГДАНОВСКАЯ³

¹ *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино;*

² *Тульский государственный университет, Тула;*

³ *Институт электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва*

При окислении субстратов ферментами, находящимися в изолированном состоянии, как и ферментами, входящими в состав клеток микроорганизмов, простейших или теплокровных, энергия может выделяться в виде тепла, света; часть энергии сохраняется в виде новых соединений, продуктов реакции. Функционирование ферментов в составе клеток обеспечивает также сохранение энергии в виде электрохимического потенциала и ее расходование на поддержание клеточного метаболизма и клеточного деления. Как показали исследования последних лет, еще одной составляющей, в которую можно преобразовывать энергию, получаемую при окислении/трансформации органических соединений, является электрическая [2, 5, 26]. Для того чтобы получить электрическую энергию как продукт биохимической реакции, следует использовать специально разработанные электрохимические ячейки, называемые биотопливными элементами (БТЭ). БТЭ можно определить как устройство, преобразующее энергию, выделяющуюся в биохимических реакциях, в электрическую. По сути, БТЭ является элементом питания, в котором электрическая энергия генерируется при окислении молекул. Под окислением в данном случае понимается понижение уровня восстановленности трансформированной молекулы по сравнению с ее

исходным состоянием до протекания биохимической реакции. Преимущественно в описанных примерах БТЭ рассматривались примеры окисления органических соединений. Классифицируя БТЭ по типу используемого биоматериала, можно отметить, что в настоящее время известны топливные элементы, основанные на применении ферментов [10, 16], клеток микроорганизмов [23, 24], клеток теплокровных [13].

Получение электрической энергии с помощью БТЭ относится к перспективным технологиям по ряду соображений. Во-первых, электрическая энергия представляет собой один из универсальных видов, легко трансформируемый в другие виды энергии с наименьшими потерями. Второе связано с общей ситуацией, характеризующей положение с энергетическими ресурсами планеты, — запасы нефти и газа сокращаются с катастрофической скоростью, и требуется производить срочный поиск альтернативных видов топлива. При этом следует помнить, что энергия, выделяющаяся ежедневно в мире при окислении тысяч тонн органических соединений при очистке сточных вод, расходуется впустую, на подогрев атмосферы. В принципе, ее можно было бы эффективно использовать, применяя БТЭ, для получения электрической энергии.

Далее, как отмечают многие исследователи в области создания БТЭ, этот источник электрической энергии является в высшей степени «экологическим». В химических топливных элементах получение электрической энергии основано на химических реакциях, протекающих при высоких температурах и давлении, использовании щелочных или кислотных растворов, применении дорогостоящей платины в качестве катализатора. В БТЭ для выработки электроэнергии не требуются экстремальные

* Автор для переписки:

© 2005 г. Решетиллов Анатолий Николаевич,

д.х.н., профессор,

зав. лабораторией биосенсоров Института биохимии

и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Адрес: 142290 Пущино, Московская область

Тел.: (27) 73-16-66, факс: (495) 956-33-70.

E-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

условия. Разделение зарядов происходит в результате биохимических реакций при умеренных температурах и атмосферном давлении. Вместо платины катализатором являются экологически чистые материалы — ферменты или клетки микроорганизмов. Электрическая энергия генерируется при окислении органических соединений — сахаров, спиртов и т.д. [10, 15, 16].

Оценивая важность исследований в области создания БТЭ, следует упомянуть еще об одной особенности современной жизни — широкомасштабном использовании электрических источников питания (батареек) в портативных устройствах: мобильных телефонах, плеерах и т.д. Время непрерывной работы источников электрической энергии химического типа сравнительно невелико и уже давно возникла проблема их утилизации.

БТЭ может являться разумной альтернативой химическим источникам как экологически чистый источник электроэнергии, не загрязняющий окружающее [10, 14, 15, 33, 30]. В течение десятилетий о БТЭ говорили с большой долей скепсиса, которая в настоящее время значительно уменьшилась благодаря полученным результатам [21]. Анализ состояния исследований по БТЭ на основе ферментов и клеток микроорганизмов можно найти в обзорах [11, 2, 32, 16, 30].

Биотопливный элемент на основе клеток микроорганизмов. Принцип функционирования, конструкция. На рис. 1а схематически представлена схема биоэлектродкатализа — процесса окисления органического субстрата ферментом, происходящего при участии медиаторов — искусственных акцепторов электронов. Субстрат (S_B) окисляется ферментом (Φ), который переходит в восстановленное состояние Φ_B . Передача электронов на медиатор вновь переводит фермент в окисленное состояние, медиатор при этом восстанавливается (M_B). Восстановленный медиатор регенерируется на электроде, отдавая ему электрон. Редокс-пара $M_B/M_{ок}$ действует как эстафетный переносчик между ферментом и электродом, обеспечивая таким образом передачу заряда на рабочий электрод. Если данная реакция протекает при определенном заданном потенциале рабочего электрода относительно вспомогательного электрода, то во внешней цепи возникает ток, обусловленный происходящим окислением.

Рассмотренный процесс носит название биоэлектродкатализа и составляет основу функционирования биосенсоров амперометрического типа третьего поколения. Возможность производить детекцию искомого соединения основана на зависимости тока от концентрации субстрата [12]. Если на электроды не подается

разность потенциалов от внешнего источника и они разомкнуты (режим «холодного хода») или между ними включена некоторая нагрузка, то в системе генерируется напряжение. В этом случае система рассматривается как биотопливный элемент, генерирующий ЭДС при окислении субстрата [14].

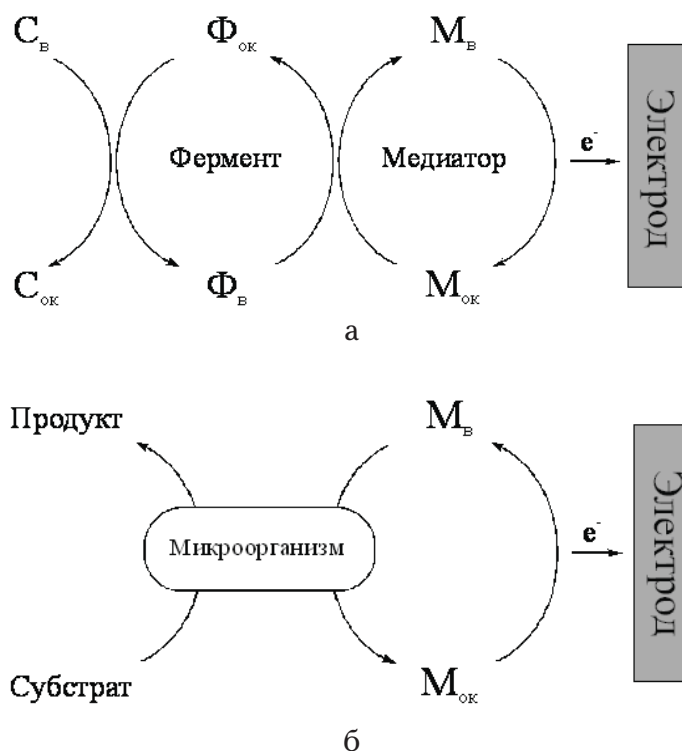


Рис. 1. Кинетическая схема процесса биоэлектродкатализа, происходящего в случае окисления субстратов: а) ферментами (иммобилизованными или находящимися в суспензии) или б) клетками микроорганизмов. Обозначения: «электрод» — рабочий электрод, на поверхности которого протекают процессы окисления медиатора; С — субстрат, Φ — фермент, М — медиатор, e^- — электрон. Нижние символы указывают на состояние — окисленное (ок) или восстановленное (в).

Принципиально картина переноса заряда на электрод не изменяется в случае, если фермент функционирует как составная часть микробной клетки — рисунок 1б. Субстрат проникает в микробную клетку и окисляется ферментами, локализованными в мембране или периплазматическом пространстве микроорганизма.

При наличии в непосредственной близости медиатора происходят окисление фермента и восстановление медиатора. Цикл завершается на электроде — восстановленный медиатор окисляется и снова получает возможность участвовать в процессе. Процесс окисления субстрата приводит к изменению потенциала рабочего электрода относительно электрода сравнения. Схема-

тически устройство биотопливного элемента на основе клеток микроорганизмов представлено на рисунке 2. Композиция является классической и рассматривается в ряде работ [2, 14, 23].

На рисунке 2 схематически показаны структура и процессы, происходящие в БТЭ. Анодное отделение содержит биокатализатор (микробные клетки), медиатор и субстрат (окисляемую органику — спирты, сахара и т.д.). Окисление субстрата (топлива) приводит к появлению заряженного состояния анода и генерации разности потенциалов между анодом и катодом. По внешней цепи электроны под действием ЭДС переносятся на катод. Все описанные процессы происходят в водной фазе — в анодном отсеке находится физиологический буфер, обеспечивающий жизнедеятельность микробных клеток, в катодном — буфер, стабилизирующий pH. Анод и катод БТЭ обычно изготавливают из инертных материалов — золота, платины, углерода. Результирующий ток, измеряемый по падению напряжения на внешнем сопротивлении (нагрузке), пропорционален концентрации компонента, скорость превращения которого определяет скорость биохимического окисления субстрата.

Электрохимические реакции, происходящие на катоде, уже не относятся к биологической системе. Элементом, принимающим электроны, может являться кислород. Более эффективно процесс восстановления кислорода протекает при участии медиатора, в качестве которого может выступать гексацианоферрат калия (феррицианид калия) [2]. Ионселективная мембрана обеспечивает диффузию протонов в катодное отделение и предотвращает смешение основного содержимого отсеков — раствора субстрата в анодном отделении с раствором катодного, что привело бы к снижению эффективности генерации ЭДС.

В том случае, если в БТЭ используются иммобилизованные микроорганизмы, роль мембраны состоит в удерживании клеток в анодном отсеке. Кислород попадает в раствор катодного отделения за счет диффузии из воздуха или за счет активного насыщения раствора газообразным кислородом или воздухом. Анодное отделение может продуваться азотом для повышения транспортной эффективности медиаторов в процессе переноса электронов на анод. Для повышения КПД биотопливных элементов стремятся увеличить площадь анода и катода. Часто для этих целей в качестве материала используют графитовый войлок, имеющий высокое отношение «поверхность : объем» [24].

Медиатор должен обладать рядом необходимых качеств. Так, медиатор:

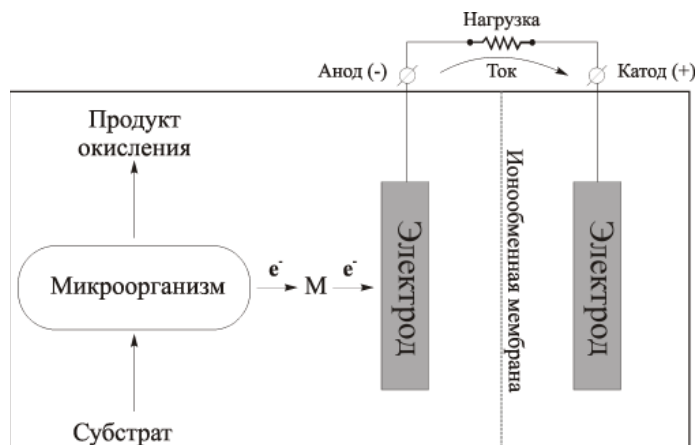


Рис.2. Схематическое представление структуры и процессов в БТЭ микробного типа. Субстрат (топливо) — окисляемое органическое соединение. Микроорганизмы — используемый тип биокатализатора. Медиатор (М) — низкомолекулярное соединение, обеспечивающее транспорт электронов от ферментов, содержащихся в клетках, к электроду. Ионообменная мембрана позволяет продуктам реакции (протонам), диффундировать из анодного отсека в катодный и предотвращает смешивание растворов анодного и катодного отсеков. Генерируемое напряжение возникает на электродах «анод» и «катод». (В соответствии с принятыми в данной области электрохимии обозначениями «анодом» является электрод, имеющий отрицательный потенциал относительно противоиэлектрода)

- должен обеспечивать быстрый и обратимый перенос электронов от биокатализатора на электрод;
- иметь окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), близкий к потенциалу биокатализатора;
- должен быть химически стабильным.

Большинство описанных в литературе вариантов БТЭ микробного типа основано на применении в анодном отделении различных медиаторов. Вместе с тем имеются примеры БТЭ, основанных на прямом переносе электронов без использования медиаторов [7, 18]; в этом случае, в соответствии со схемой на рисунке 1а, б, электрон переносится на электрод непосредственно восстановленным ферментом.

Устройство, представленное схематически на рисунке 2 и составляющее основу БТЭ, в принципе имеет двойную функцию — с одной стороны, его можно использовать как биохимический источник ЭДС, с другой стороны, оно является разновидностью биосенсора [2—4]. В последнем случае для его обозначения более применима терминология «ячейка с задаваемым потенциалом» (ЯЗП) [1]. При этом с помощью внешнего устройства (потенциостата) задается

требуемый потенциал рабочего электрода, а измеряемым параметром является протекающий между анодным и катодным отсеками ток. Ток обусловлен окислением субстрата в анодном отделении и переносом электронов с помощью медиатора на электрод.

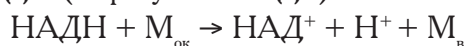
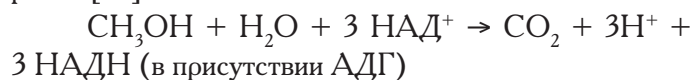
По сути, такой вариант измерений соответствует стандартно используемым схемам измерения в медиаторных биосенсорах [8, 29]. Измеряя стационарные токи с помощью ЯЗП, можно определять низкие концентрации субстратов. Для детекции низких концентраций субстрата вычисляют заряд, прошедший через систему, интегрируя площадь под кривой «ток-время». В примере, представленном в работе [1], показано, что ЯЗП-сенсор, в котором в качестве биокатализатора использовали неочищенный экстракт, полученный из микроорганизмов *Methylosinus trichosporium*, выращенных на метане как единственном источнике углерода и энергии, позволял детектировать низкие, вплоть до 0,02 мкМ, концентрации формальдегида и метилового спирта. Раствор в измерительной ячейке насыщали азотом. Измерения выполняли в присутствии медиатора феназинэтосульфата.

Механизм генерации ЭДС при биоэлектрокаталитическом окислении. Величина электрической энергии P , которая может быть получена в БТЭ, определяется произведением напряжения (V) на ток (I), то есть $P = I \times V$. Хотя в идеальном случае напряжение V , развиваемое топливным элементом, определяется разностью формальных потенциалов окислителя и окисляемого субстрата, $V = (E^0_{\text{окислителя}} - E^0_{\text{субстрата}})$, необратимые потери η приводят к снижению реального значения потенциала. Необратимые потери могут быть вызваны омическим сопротивлением электролита, наличием концентрационного градиента, кинетическими ограничениями реакций переноса электронов на электрод и т.д., что приводит к снижению генерируемого напряжения на величину η , то есть $V_{\text{реальное}} = (E^0_{\text{окислителя}} - E^0_{\text{субстрата}}) - \eta$ [16].

В БТЭ микробного типа биокатализатором служат клетки микроорганизмов, находящиеся в анодной камере и окисляющие присутствующие там субстраты. В биохимических реакциях окисления участвуют ферменты, входящие в состав микроорганизмов. Как упоминалось выше, принципиально характер процессов в БТЭ не отличается для ферментов и микробных клеток. В этой связи далее на примере окисления метанола дегидрогеназой рассмотрен механизм генерации ЭДС и его количественные характеристики. Метильный спирт относится к типам топлива (субстратам), достаточно часто применяемым в БТЭ микробного и ферментного видов.

Пример рассмотрен для фермента алкогольдегидрогеназы (АДГ), эффективно окисляющей метанол и входящей в состав ряда микроорганизмов [6, 25].

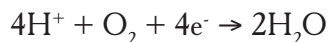
В присутствии окисленного НАД⁺ (никотинамидадениндинуклеотида) АДГ превращает метанол в двуокись углерода и ион водорода. В ходе реакции электрон захватывается НАД⁺ и формируется восстановленная форма НАДН. Затем электрон передается на медиатор, который переносит его на анод. Описанная схема процесса имеет место при использовании в анодной камере как клеток микроорганизмов, так и АДГ. Протоны, которые диффундируют в катодную камеру из анодной через катионообменную мембрану, соединяются в ней с кислородом, образуя воду. Таким образом, окисление метилового спирта в БТЭ происходит следующим образом [10]:



На аноде происходит окисление медиатора:



На катоде происходит восстановление кислорода:



В уравнениях использованы обозначения: CH_3OH – метильный спирт; e^- – электрон; $\text{M}_{\text{ок}}$, $\text{M}_{\text{в}}$ – окисленная и восстановленная форма медиатора, соответственно; n – количество электронов, перенесенных медиатором на электрод.

Полное окисление одной молекулы метилового спирта сопровождается образованием одной молекулы CO_2 , трех молекул H_2O и освобождением шести электронов на катоде. Изменение степени окисленности углерода в процессе окисления метанола представляется соотношением:

$\text{H}_3\text{C}^{-\text{II}}\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{C}^0\text{O} - \text{HC}^{+\text{II}}\text{OOH} \rightarrow \text{C}^{+\text{IV}}\text{O}_2$, где H_2CO и HCOOH – муравьиный альдегид и муравьиная кислота, соответственно, а $\text{C}^{-\text{II}}$ и C^0 – углерод в степени восстановленности два и ноль, соответственно. $\text{C}^{+\text{II}}$, $\text{C}^{+\text{IV}}$ обозначают углерод в степени окисленности два и четыре. Поскольку окисление одной молекулы метанола сопровождается генерацией шести электронов, химическая энергия, заключенная в одном грамме метанола, соответствует электрическому заряду в 18091 кулонов (К). Используя полученную оценку для величины заряда $Q = 18091 \text{ К}$, можно оценить токоотдачу, то есть электрическую емкость БТЭ при окислении 1 г метанола. Поскольку ток I равен количеству заряда, прошедшего в цепи, деленному на время, $I = Q/t$, то

данной величине заряда соответствует электрическая емкость 5025 мА×час (18091 К/3600 сек. = 5025 мА). В приведенном примере предполагалось, что эффективность процесса составляет 100%.

Таким образом, рассмотренный пример дает представление о механизме трансформации химической энергии при окислении молекулы метилового спирта в электрическую. Кроме того, он показывает, насколько эффективным теоретически может быть этот процесс — окисление 1 г метилового спирта обеспечивает электрическую емкость элемента, в 3–4 раз превышающую емкость бытовых химических аккумуляторов, выпускаемых для питания диктофонов, часов и т.д.

Сравнительная характеристика химических и биологических элементов. Характеристики двух типов топливных элементов — химического, основанного на катализируемом окислении метанола (катализатор — платина), и микробного, представлены в таблице 1.

Таблица 1

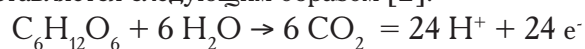
Свойства химического топливного элемента (ХТЭ) и биотопливного элемента на основе микробных клеток (по данным, приведенным в [10])

Параметр	Химический топливный элемент	Микробный биотопливный элемент
Тип топлива	Раствор метанола	Раствор глюкозы
Рабочая температура	90 °С	22–25 °С
рН	—	7,0–9,0
Выходная плотность тока	300 мА/см ² при напряжении 0,5 В	0,21 мА/см ² при напряжении 0,5 В
Размеры электрода	155 см ²	117 см ²
Пиковая токоотдача	600 мА/см ²	—
Катализатор	Платина	Бактериальные клетки
Время функционирования	1500	> 700 час

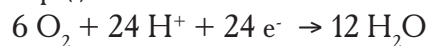
Данные, приведенные в таблице 1, говорят о том, что по некоторым показателям БТЭ уступает химической

топливной ячейке. Вместе с тем интенсивно ведущиеся исследования позволяют оптимистично относиться к возможности совершенствования характеристик БТЭ как источника ЭДС.

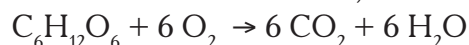
Одним из положительных качеств БТЭ микробного типа является возможность использования различных субстратов в виде топлива. При утилизации субстратов микробными клетками ферменты, входящие в их состав, на первой стадии окисления не используют кислород. Процесс окисления выражен переносом электронов с субстрата на фермент, а кислород является коллектором электронов лишь на завершающих стадиях окисления. Так, окисление глюкозы с точки зрения электрохимии представляется следующим образом [2]:



В дыхательной цепи клетки электроны передаются на кислород:



Результирующее уравнение, представляющее биологическое окисление глюкозы, имеет вид:



Следует учитывать, что энергетическая ценность у различных субстратов различна. Теоретически при использовании в биотопливном элементе одного и того же количества субстрата и соответствующего типа биокатализатора электрическая емкость при окислении метанола, этанола и глюкозы соотносятся как 17:12:1. Данные теоретические оценки получены из предположения, что происходит 100% конверсия химической энергии в электрическую [10].

Спектр исследуемых вопросов, достигнутые результаты. Интересен тот факт, что начало исследований, направленных на изучение генерации электрической энергии бактериальными клетками, относится к середине 60-х годов XX столетия. Таким образом, истоки данного направления хронологически близки ко времени зарождения биосенсорных исследований. В дальнейшем близость тематик и взаимное влияние проявились в том, что результаты, полученные для медиаторных биосенсоров, оказались применимы к БТЭ как микробного, так и ферментного типов, и наоборот. В середине 60-х годов появляются первые публикации, тематику которых можно определить как изучение процессов восстановления медиаторов различного типа растущими и покоящимися клетками бактерий. Так, было показано, что в анаэробных условиях бактерии *E.coli* восстанавливают феррицианид, действующий как акцептор водорода при окислении глюкозы; было найдено также, что рост бактерий в анаэробных условиях в присутствии медиатора был

ниже, чем в его отсутствие [9]. В дальнейшем к вопросу о росте бактериальных клеток в присутствии медиатора и в режиме генерации тока исследователи возвратились почти через 35 лет [23].

Важная информация о механизме и эффективности генерации ЭДС микробным биотопливным элементом была представлена в работах [5, 26]. Авторы получили сравнительную оценку скорости восстановления бактериальными клетками различных медиаторов в присутствии различных субстратов и скорости окисления этих же субстратов в анаэробных условиях. Целью исследования являлся поиск эффективных сочетаний «медиатор-микроорганизм». Указанная оценка было выполнена для бактерий *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*. Субстратами являлись глюкоза и сукцинат. Скорость восстановления медиаторов измеряли спектрофотометрически в анаэробных условиях [26]. В работе [5] изучали эффективность феноксазина, фенотиазина, феназина, индофенола и бипиридила, используемых как медиаторы. Параметры системы были исследованы при различных концентрациях микроорганизмов в ячейке, различных значениях внешней нагрузки и концентрации медиатора. Точный выход ячейки оценивали по количеству электричества, прошедшего по цепи, интегрируя зависимость «ток-время». Показали, что точный выход составляет около 30–60% от теоретически ожидаемого.

Общий прогресс в улучшении параметров БТЭ был в значительной степени связан с развитием биосенсорных исследований, направленных на разработку медиаторных электродов на основе ферментов и клеток микроорганизмов. Как упоминалось ранее, существует определенный дуализм — БТЭ рассматривают, с одной стороны, как источник ЭДС, с другой — как аналитические биосенсорные устройства. Общность некоторых процессов, связанных с генерацией потенциала в БТЭ и генерацией тока в биосенсорах, позволяет применять данные, полученные в биосенсорных исследованиях, для направленного изменения параметров БТЭ. Анализ механизмов переноса электронов в биосенсорах амперометрического типа, основанных на различных способах иммобилизации фермента на поверхности электрода, представлен в обзоре [8].

Анализ возможных стратегий формирования рецепторного элемента амперометрических электродов на основе материалов, катализирующих окисление NADH, выполнен в работе [20]. Пленочные структуры, полученные из таких материалов методом электроосаждения,

оказались эффективными для обеспечения высокой активности альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в биосенсорах для детекции альдегидов и этанола, соответственно. Полученные данные могут быть полезны при разработке БТЭ.

Механизм анодных биохимических реакций в БТЭ микробного типа является предметом многих исследований. Возможность получения высокой степени преобразования энергии в БТЭ на основе дрожжевых клеток и бактерий *E. coli* была описана в работе [4]. Авторы исследовали эффективность окисления глюкозы в присутствии медиаторов тионина и резорурфина.

Использование графитового электрода, модифицированного медиатором нейтральным красным, позволило увеличить токоотдачу микробного БТЭ на основе бактерий *E. coli*; топливом является ацетат. В контрольных замерах плотность тока и удельный потенциал составляли 1,41 мкА/см² и 1,44 мВ/см². Выполненная модификация увеличила эти значения до 3,1 мкА/см² и 3,12 мВ/см² [23, 24].

Представленные в работе [19] данные свидетельствуют о том, что эффективность микробного БТЭ может зависеть от типа источника углерода, который использовали при выращивании микроорганизмов. Так, БТЭ на основе бактерий *Proteus vulgaris* практически не утилизировали субстраты мальтозу и трегалозу. Вместе с тем эффективность БТЭ составляла около 63% в том случае, когда клетки выращивали на среде, содержащей трегалозу; топливом при этом являлась галактоза.

БТЭ на основе бактерий *Escherichia coli* и *Actinobacillus succinogenes*, в котором в качестве топлива была использована глюкоза, а медиатором являлся нейтральный красный, описаны в работе [24]. Нейтральный красный оказался в четыре раза эффективнее тионина. Количество электрической энергии, генерируемой БТЭ, содержащим *E. coli* и *A. succinogenes*, было в 10 и 2 раза, соответственно, больше в случае применения покоящихся клеток по сравнению с растущими. Кроме того, рост бактерий значительно тормозился, когда к БТЭ подключали внешнюю нагрузку. Окисленность продуктов реакции в этом случае была наиболее высокой. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования нейтрального красного в качестве медиатора в БТЭ данного типа.

БТЭ, основанный на эффектах фотосинтеза, представлен в работе [31]. В анодной камере находились цианобактерии *Synechococcus sp.* и 2,6-диметил-1,4-бензохинон, который был использован в качестве медиатора. Электроны, генерируемые бактериями при

освещении, медиатором передавались на анод. Анодная реакция состояла в окислении воды и генерации кислорода и протона. В целом назначение данной биотопливной системы состояло в преобразовании энергии света в электрическую энергию без использования химического топлива. Максимальная электрическая мощность БТЭ составляла 0,3–0,4 Вт/м² площади анода при эффективности преобразования световой энергии 2–2,5%.

Разработаны типы БТЭ, основанные на безмедиаторном способе передачи электрона на анод. Бактерии, восстанавливающие ионы металла, такие, например, как *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter metallireducens*, характеризуются высоким содержанием цитохромов во внешней мембране. При росте клеток в анаэробных условиях содержание этих белков возрастает. Бактерии *Shewanella putrefaciens* были использованы в анодной камере БТЭ в качестве биокатализатора. При поддержании анаэробных условий в анодной камере и использовании лактата в качестве топлива данный тип бактерий обеспечивает безмедиаторную генерацию тока и потенциала. Генерацию ЭДС получали только при использовании бактерий, выращенных в анаэробных условиях. Применение клеток, полученных в анаэробных условиях, не приводило к генерации потенциала. (Также нельзя было получить эффект генерации при использовании бактерий *E. coli*, выращенных как в аэробных, так и в анаэробных условиях). При использовании высокой концентрации бактерий в анодном отделении (0,47 г сух. веса/л) и площади электрода порядка 50 см² токоотдача составляла 3 К за 12 час [18].

В работе [7] исследовали зависимость параметров микробного безмедиаторного БТЭ от условий измерения, в частности, рН, величины внешней нагрузки, концентрации буфера, содержания кислорода в катодной камере. Показали, что ток БТЭ линейно зависит от концентрации топлива при его низком содержании; суммарная токоотдача удовлетворительно коррелировала с концентрацией субстрата вплоть до 400 мг/л ХПК (химического потребления кислорода). Авторы считают, что данная система может быть эффективно использована как БПК (биологическое потребление кислорода) сенсор.

Как упоминалось выше, способность бактериальных клеток генерировать ток или потенциал в присутствии медиаторов электронного транспорта может быть использована не только для создания «биологических батареек», но также и для решения аналитических задач. В этом случае система, содержащая микроорганизмы, является биосенсором, который производит детекцию определенного соединения. Такие биосенсоры могут быть

использованы для обнаружения микроорганизмов. Идея подобных измерений основана на том, что при добавлении в измерительную ячейку пробы, в которой присутствуют искомые микроорганизмы, сенсор генерирует ток, зависящий от их концентрации. Метод определения концентрации микроорганизмов при использовании амперометрического принципа детекции их активности в присутствии медиатора электронного транспорта представлена в [34]; время анализа образцов составляло 10 мин, нижний предел обнаружения находился на уровне 10⁵–10⁶ бактерий/мл.

Экспресс-метод обнаружения микроорганизмов в загрязненных водах, основанный на регистрации тока в присутствии медиатора 2,4-дихлорфенолиндофенола, представлен в работе [22]; время измерения составляло 10–20 мин при нижнем пределе детекции 10⁴ кг/мл.

Перспективы. Кратко коснемся перспектив практического использования БТЭ на основе клеток микроорганизмов и возможных направлений дальнейших исследований. В целом соображения о возможности применения БТЭ на практике можно найти во многих обзорах и публикациях [27, 17, 28, 10]. Обобщая различные оценки и точки зрения, можно прийти к заключению, что данное направление исследований и технологических разработок является высокоактуальным. Часть задач, с которыми сталкиваются исследователи, носит характер фундаментальных (к ним относятся, например, вопросы исследования механизма взаимодействия «субстрат — клетка — медиатор»). Другая часть задач носит технологический характер (оптимизация конструкций анода, катода, поиск материалов, обеспечивающих высокую токоотдачу систем, и т.д.). Считается, что из микробных БТЭ более перспективны элементы, использующие иммобилизованные микроорганизмы. В свою очередь, существует точка зрения, что применение иммобилизованных ферментов предпочтительнее по сравнению с микроорганизмами [10]. Ответы на многие вопросы будут получены, по-видимому, в недалеком будущем. В настоящее же время ценными являются концептуальные соображения, высказываемые специалистами, имеющими опыт в разработке топливных элементов. Интересная точка зрения представлена в обзоре [32]. Автор ввел в рассмотрение термин «Gastrobots» и изложил соображения относительно разработки новых интеллектуальных машин особого класса. Gastrobots — это роботы, которые снабжают себя энергией, получаемой из обычных пищевых продуктов. Определением сути таких роботов может являться следующее: гастробот — это робот с желудком (Gastrobot — «robot with a stomach»). Эти роботы долж-

ны представлять собой самодостаточные устройства, для функционирования которых требуются лишь натуральные пищевые продукты, вода и воздух. Такие машины-роботы могут быть использованы для решения задач, которые выполняются в полностью автоматизированном режиме. Они должны быть предназначены для выполнения поручений и работ на значительном удалении («living off the land»). Кроме того, для выполнения задач не будет требоваться дальнейшее управление роботами, то есть это задания типа «запустить и забыть» («start and forget»). Одним из основных моментов данной концепции является то, что источником электрической энергии в роботах будут служить БТЭ микробного типа, что подчеркивает их высокую перспективность.

Исследование было поддержано грантом РФФИ 03-03-32174 «Биоэлектрокатализ: исследование кинетики и механизма анодных реакций на наноструктурированных композитных материалах, включающих биокатализаторы», грантом 04-04-97253 «Особенности окисления субстратов бактериальными клетками при взаимодействии с искусственными акцепторами электронов» программы «Фундаментальная наука в наукоградах Московской области», грантом РИ-16.0/025/026 «Научно-организационное, методическое и техническое обеспечение организации и поддержки научно-образовательных центров в области науки о Земле и осуществление на основе комплексного использования материально-технических и кадровых возможностей совместных исследований и разработок» ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002–2006 годы».

Литература

1. Aston W.J. The construction of mediated amperometric biosensors, in Biosensor: fundamentals and applications / Turner A.P.F., Karube I., and Wilson G.S., Editors. — New York: Oxford University Press, 1987. — P. 276–290.
2. Bennetto H.P. // Biotechnology Education. — 1990. — Vol. 1. — P. 163–168.
3. Bennetto H.P., Box J., Delaney G.M., Mason J.R., Roller S.D., Stirling J.L., Thurston C.F. Redox-mediated electrochemistry of whole microorganisms: from fuel cells to biosensors, in Biosensor: fundamentals and applications / Turner A.P.F., Karube I., and Wilson G.S., Editors. — New York: Oxford University Press, 1987. — P. 291–314.
4. Bennetto H.P., Stirling J.L., Tanaka K., Vega C.A. // Biotechnology and Bioengineering. — 1983. — Vol. XXV. — P. 559–568.
5. Delaney G.M., Bennetto H.P., Mason J.R., Roller S.D., Stirling J.L., Thurston C.F. // J. Chem. Tech. Biotechnol. — 1984. — Vol. 34B. — P. 13–27.
6. Ghosh M., Anthony C., Harlos K., Goodwin M.G., Blake C. // Structure. — 1995. — Vol. 3. — P. 177–187.
7. Gil G.C., Chang I.S., Kim B.H., Kim M., Jang J.K., Park H.S., Kim H.J. // Biosens. Bioelectron. — 2003. — Vol. 18. — P. 327–334.
8. Habermuller K., Mosbach M., Schuhmann W. // Fresenius J. Anal. Chem. — 2000. — Vol. 366. — P. 560–568.
9. Hadjipetrou L.P., Gray-Young T., Lilly M.D. // J. gen. Microbiol. — 1966. — Vol. 45. — P. 479–488.
10. Halme A., Zhang X.-C., Ranta A. Study of biological fuel cells. Цит. по: <http://www.automation.hut.fi/research/bio/sfc00pos.htm>.
11. Higgins I.J., Hill H.A.O. Bioelectrochemistry, in Essays in biochemistry. — The Biochemical Society, 1985. — P. 119–145.
12. Ikeda T., Kano K. // Biochim. Biophys. Acta. — 2003. — Vol. 1647. — P. 121–126.
13. Justin G.A. Biofuel cells as a possible power source for implantable electronic devices. — Pittsburg, 2004. — P. 1–44.
14. Kano K., Ikeda T. // Analytical Sciences. — 2000. — Vol. 16. — P. 1013–1021.
15. Kano K., Ikeda T. // Electrochemistry. — 2003. — Vol. 71. — P. 86–99.
16. Katz E., Buckmann A.F., Willner I. // J. Am. Chem. Soc. — 2001. — Vol. 123. — P. 10752–10753.
17. Katz E., Willner I., Kotlyar A.B. // J. of Electroanalytical Chemistry. — 1999. — Vol. 479. — P. 64–68.
18. Kim H.J., Park H.S., Hyun M.S., Chang I.S., Kim M., Kim B.H. // Enzyme Microb. Technol. — 2002. — Vol. 30. — P. 145–152.
19. Kim N., Choi Y., Jung S., Kim S. // Biotechn. Bioeng. — 2000. — Vol. 70. — P. 109–114.
20. Lorenzo E., Pariente F., Hernandez L., Tobalina F., Darder M., Wu Q., Maskus M., Abruna H.D. // Biosens. Bioelectron. — 1998. — Vol. 13. — P. 319–332.
21. Madden D., Schollar J. // Bioscience explained. — 2001. — Vol. 1. — P. 1–4.
22. Nishikawa S., Sakai S., Karube I., Matsunaga T., Suzuki S. // Appl. Environ. Microbiol. — 1982. — Vol. 43. — P. 814–818.
23. Park D.H., Kim S.K., Shin I.H., Jeong Y.J. // Biotechnology Letters. — 2000. — Vol. 22. — P. 1301–1304.

24. *Park D.H., Zeikus J.G.* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 66. – P. 1292–1297.
25. *Park J.-K., Yee H.-J., Lee K.S., Lee W.-Y., Shin M.-C., Kim T.-H., Kim S.-R.* // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – Vol. 390. – P. 83–91.
26. *Roller S.D., Bennetto H.P., Delaney G.M., Mason J.R., Stirling J.L., Thurston C.F.* // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* – 1984. – Vol. 34B. – P. 3–12.
27. *Sasaki S., Karube I.* // *Nippon Rinsho*. – 1996. – Vol. 54. – P. 2813–2820.
28. *Sasaki S., Karube I.* // *Trends Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 50–52.
29. *Schuhmann W., Zimmermann H., Habermuller K., Laurinavicius V.* // *Faraday Discuss.* – 2000. – Vol. 116. – P. 245–255.
30. *Shukla A.K., Suresh P., Berchmans S., Rajendran A.* // *Current Science*. – 2004. – Vol. 87. – P. 455–468.
31. *Tsujimura S., Wadano A., Kano K., Ikeda T.* // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2001. – Vol. 29. – P. 225–231.
32. *Wilkinson S.* // *Autonomous Robots*. – 2000. – Vol. 9. – P. 99–111.
33. *Zhang X., Halme A.* // *Reports of the Automation Technology Laboratory. Series A: Research Reports*. – 1999. – Vol. 20. – P. 1–10.
34. *Хитченс Г.Д., Ходко Д., Миллер Д.Р., Мурфи О.Д., Роджерс Т.Д.* // *Электрохимия*. – 1993. – Т. 29. – С. 1534–1540.

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ

Л.Я. ТЕЛИШЕВСКАЯ*, А.А. КОМАРОВ, Ю.В. БОЛДЕНКО

*Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ), Москва*

Ферментные препараты в кормопроизводстве начали использовать относительно недавно. Ферменты пищеварительного тракта взрослых животных обеспечивают расщепление питательных компонентов сбалансированных кормов — жиров, белков, полисахаридов до легкоусвояемых низкомолекулярных соединений. Для молодняка животных со слабо развитой собственной ферментативной системой практиковалось внесение в корма протеолитических, амилолитических, пектолитических ферментов.

Начиная с 90-х годов прошлого столетия, появились ферментные препараты нового поколения. Они представляют собой мультиэнзимные композиции, способные расщеплять вещества, не подвергающиеся перевариванию ферментами желудочно-кишечного тракта высших животных.

Добавки таких ферментов стали практиковать в связи с широким применением в кормах веществ, которые всегда воспринимали как антипитательные. Эти вещества не потребляются высшими животными, препятствуют усвоению питательных веществ, вызывают различные осложнения и патологию, иногда дают токсический эффект.

К таковым относятся полисахариды клеточной стенки растений, фитат-связанный фосфор, некоторые ферменты (ингибитор трипсина, уреазы), гликозиды, лектины, антагонисты витаминов и т.п. [1].

Антипитательные вещества, содержащиеся в растениях, которые человек использует в корм животным и птице, вырабатываются для защиты растений от повреждений, заболеваний или выполняют другие функции.

Первая из названных функций — защитная — напрямую относится к структурным полисахаридам,

составляющим основу клеточной стенки: целлюлозе, гемицеллюлозам, лигнину, пектину.

Другим веществом из состава растительных кормов, которое также можно рассматривать как антипитательное, является фитин, или гексафосфат фитиновой кислоты. Это соединение обеспечивает резервирование фосфора в зерне для дальнейших синтетических реакций при его прорастании.

И структурные полисахариды, и фитин не расщепляются собственными ферментами животных, но подвержены действию микробных гидролаз.

У жвачных животных, имеющих в многокамерном желудке активно действующую симбиотическую микрофлору, эти вещества расщепляются ферментами микроорганизмов. В желудочно-кишечном тракте моногастральных животных (свиней, плотоядных, непарнокопытных), а также птицы расщепляются жиры, белки и резервные углеводы (в основном, крахмал). Частичное переваривание антипитательных веществ у моногастральных животных и птицы происходит в толстом отделе кишечника с помощью симбиотических микроорганизмов.

Симбиотная микрофлора населяет также слепые отростки и зоб у птицы. Однако этой микрофлоры недостаточно для переваривания больших количеств трудногидролизуемых соединений.

Поэтому при использовании растений в корм животным нужно учитывать его назначение, содержание в нем антипитательных веществ и применять методы, нейтрализующие или детоксицирующие неусвояемые компоненты.

Одним из методов расщепления и реализации антипитательных веществ является применение ферментных препаратов (Ferket P.R., Middelton T., 1999).

Из большого разнообразия ферментов, выпускаемых в настоящее время промышленностью, наибольшее применение в кормопроизводстве находят гидролитические ферменты: гликозидазы, протеазы, липазы и фитаза. Про-

* Автор для переписки:

© 2005 г. Телишевская Л.Я.

ФГУ ВГНКИ

Адрес: 123022 Москва, Звенигородское ш., 5

Тел.: (495) 253-14-91

мышленные препараты вводятся в корма для обеспечения животных лимитированными ферментативными активностями как экзогенные ферменты. Используются они путем внесения в премиксы, комбикорма и кормовые смеси.

Ферментные препараты вводятся в корма для лучшего усвоения питательных веществ (белков, жиров, резервных углеводов) и расщепления антипитательных (в том числе структурных — остовых углеводов).

Зерновые корма (кукуруза, пшеница, ячмень, овес, просо и т.д.) являются основными источниками углеводов для птицы (уровень углеводов составляет 80–85%). Из них уровень резервных углеводов — 70–90%; структурных, или остовых — 10–30%. При этом, если резервные углеводы используются птицей на 85–100%, то остовые — на 15–20%. Соответственно чем больше в используемом корме резервных и меньше остовых углеводов, тем выше его питательная и энергетическая ценность.

Остовый полисахарид целлюлоза — главный природный полимер в растительном мире: около половины углерода входит в состав целлюлозы. Содержание целлюлозы в стеблях растений составляет 20–40%, в зерне — до 10%, в зерне без оболочек у разных культур — от 1 до 5%. Целлюлоза имеет структуру молекулы, которая обеспечивает высокую устойчивость этого соединения к внешним воздействиям. Она представляет собой линейный полимер глюкозы высокой степени полимеризации (от 500 до 2000 глюкозных единиц), с плотной упаковкой отдельных волокон, нерастворимый в воде.

Как типичное антипитательное вещество, целлюлоза не только является одним из наиболее трудно гидролизующихся природных полимеров, но помимо этого, она физически препятствует перевариванию питательных веществ. Хотя в определенных количествах клетчатка

необходима птице любого возраста в качестве механического средства для поддержания тонуса мышц кишечника и усвоения более ценных питательных соединений, ее избыток может привести к закупорке пищеварительного тракта и другим нежелательным явлениям.

Другие структурные элементы клеточных стенок растений — гемицеллюлозы — щелочерастворимые разветвленные полисахариды, содержащие различные моносахара: глюкозу, галактозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, фукозу, остатки урсонных кислот. В растениях гемицеллюлозы составляют от 5 до 48% сухой массы: в зерне пшеницы — от 8 до 14%.

В сравнении с целлюлозой гемицеллюлозы имеют более высокую растворимость; в присутствии воды ведут себя подобно губке. В связи с этой особенностью высокое содержание гемицеллюлоз (пентозанов, глюканов) вызывает повышение вязкости содержимого кишечника. Образование высоковязких растворов в пищеварительном тракте птицы приводит к увеличению объема и массы химуса, замедлению скорости прохождения корма через пищеварительный тракт, ухудшению его перемешивания и расщепления. Возможны размножение патогенных микроорганизмов, развитие воспалений желудка и кишечника, нарушение процесса всасывания и другие патологические процессы. Избыток водорастворимых некрахмалистых полисахаридов вызывает водянистый помет у птицы (Bedford M., 2000).

Содержание некрахмалистых полисахаридов зависит от вида зерновых, сорта зерна одного вида, времени хранения, способа обработки зерна (дробление, обрушивание, экспандирование, проращивание), а также природных условий при сборе.

Таблица 1

Содержание некрахмалистых полисахаридов в зерновых кормах, г/кг [3]

Корма	Сырая клетчатка	Гемицеллюлоза			Сумма НКП
		β -глюканы	Пентозаны	Сумма	
Овес	80–123	30–66	55–69	85–135	120–296
Ячмень	42–93	15–107	57–70	72–177	135–172
Рожь	22–32	2–30	75–91	77–121	107–128
Пшеница	20–34	2–15	56–95	58–110	75–106
Тритикале	30	2–20	54–69	56–89	74–103
Кукуруза	19–30	1–2	40–43	41–45	55–117
Отруби пшеничные	106	—	150–250	150–250	220–337

Повышенное содержание некрахмалистых структурных полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлоз) характерно для рационов с использованием зерновых типа ячменя, овса, ржи, пшеницы, тритикале взамен кукурузы, что иллюстрируют данные таблицы 1.

Как следует из приведенных в таблице 1 данных, разные виды зерна значительно различаются по содержанию некрахмалистых полисахаридов: минимальное количество имеет кукуруза, максимальное — ячмень и овес. Еще большие количества этих соединений содержат отруби, жмыхи и шроты. Зерно разных видов отличается также по соотношению растворимых и нерастворимых некрахмалистых углеводов. Так, ячмень имеет наиболее высокое содержание β -глюканов, рожь — пентозанов, что определяет повышенную вязкость кормов их содержащих.

В процессе созревания зерна соотношение между растворимыми и нерастворимыми полисахаридами меняется в пользу последних. Вязкость зерна стабилизируется через три месяца хранения. Созревание дробленого зерна происходит быстрее, но хранить его в дробленном виде не рекомендуется.

Зерно, полученное в засушливые годы, содержит больше пентозанов и бета-глюканов, что обуславливает более высокую вязкость в пищеварительном тракте птицы и липкость помета.

Неприятных явлений, связанных с потреблением остовых углеводов, можно избежать путем внесения в корма экзогенных ферментов: для расщепления целлюлозы — целлюлаз, растворимых некрахмалистых полисахаридов — ксиланазы и β -глюканазы.

Так, гистологические изменения кишечника цыплят-бройлеров, наблюдаемые при высоком уровне пшеницы в их рационе (изменения бокаловидных клеток, выделение большого количества слизи, уменьшение количества ворсинок и соответственно ухудшение всасывающей способности стенок кишечника) нивелировали путем применения ксиланазы в составе комбикорма (Околелова Т., 2001).

Одной из проблем в области кормления животных с использованием растительных кормов является обеспечение в рационах усвояемого фосфора.

В семенах ряда кормов растительного происхождения (пшеницы, подсолнечника и т.п.) до 2/3 фосфора представлено в виде связанного с фитином соединения. В семенах содержится примерно 1–3% фитина. В белковых кормах растительного происхождения уровень фитинового фосфора ниже.

Моногастральные животные и птица не могут в достаточных количествах использовать фитиновый

фосфор, поскольку у них нет необходимых энзимов для расщепления фитина. Поэтому обычно при составлении рационов для них включают неорганические фосфаты, что в конечном итоге приводит к большому выбросу фосфатов в окружающую среду [2].

Фитин не только не усваивается сам, но, связывая белки, пищеварительные ферменты, кальций, цинк, железо и марганец, может делать их также недоступными, что подтверждает мнение о нем как об антипитательном факторе. Использование экзогенной фитазы решает все эти вопросы.

Добавки фитазы обеспечивают освобождение не только фитат-связанного фосфора, но также белков, макро- и микроэлементов.

Таким образом, показаниями для применения экзогенных ферментов являются:

- цитолитических — высокое содержание некрахмалистых полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина, пектина);
- гликолитических — повышенное содержание растворимых некрахмалистых полисахаридов — глюканов и ксиланов — в кормах с ячменем, рожью, овсом, низкосортной пшеницей;
- амилитических — повышенное содержание крахмала в кормах с высоким содержанием зерна и крахмала;
- пектинрасщепляющих — высокое содержание пектина корнеплодов, плодовоовощных отходов, зеленой массы;
- фитазы — высокое содержание фитин-связанного фосфора.

Для лучшего усвоения кормов кукурузно-соевой рецептуры используют протеазы; кормов пшеничного и пшенично-ячменного типов — ксиланазы, бета-глюканазы, целлюлазы; для молодняка сельскохозяйственных животных (телят, поросят) возможны добавки протеазы, амилазы, липазы.

Ферментные препараты получают как метаболиты при искусственном культивировании микроорганизмов — микробов (преимущественно, бациллярных) и грибов: актиномицетов (*Actinomyces*, *Streptomyces*) или мицелиальных (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium* и др.).

В настоящее время на российском рынке представлены ферментные препараты для кормопроизводства как отечественных производителей, так и зарубежных фирм, преимущественно стран Западной Европы и Америки. В таблице 2 приведены сводные данные по ферментным препаратам производства разных фирм и их активностям.

Таблица 2

Ферментные препараты отечественного и зарубежного производства

Наименование препарата	Фирма и страна-производитель	Основные ферментативные активности
МЭК СХ-1 (2 группы) МЭК СХ-2 (2 группы) МЭК СХ-3 (2 группы) МЭК ЦГАП МЭК Вилзим (4)	ООО «Сиббиофарм», г. Бердск, ОАО «Восток», Кировская обл., Россия; АО «Биосинтезе», Литва	ЦА, АА ЦА, ГЛА, АА КсА, ГЛА, Пектин-лиазная ЦА, АА, ГЛА, ПА ЦА, КсА, ГЛА, ПА
Ксиланаза (2 группы)	ОАО «Восток»	Ксиланазная активность
Целловиридин (4 группы)	ООО «Сиббиофарм», ОАО «Восток», Россия; АО «Биовет», Болгария	Целлюлазная активность
Протосубтилин (2 группы)	ООО «Сиббиофарм», ОАО «Восток», Россия; АО «Биосинтезе», Литва	Протеазная активность
Амилосубтилин (2 группы)	ООО «Сиббиофарм», ОАО «Восток», Россия; АО «Биосинтезе», Литва	Амилолитическая активность
Фансет Нист Гимизим	ООО «Агрфен», г. Казань, Россия	АА, ПА АА, ПА ЦА, КсА, АА
Фекорд (добавки жидкие) (7 вариантов)	НФЦ АО «Белмед-препараты», Беларусь	ЦА, КсА, ГЛА, (АА)
КСИБЕТЕН	АО «Биовет», Болгария	ЦА, КсА, ГЛА
Авизим (9 вариантов) Порзим (5 вариантов)	«Финнфидс ОУ», Финляндия	КсА, ГЛА, ПА, (АА) КсА, ГЛА, (ПА), (АА)
Эконаза (5 вариантов)	«Рехм Энзайм Финлянд ОУ», Финляндия	(КсА), ГЛА
Натургрэйн Нт (6 вариантов) Натуфос (2 варианта)	БАСФ, Германия	КсА, (ГЛА) ФитА
Финаза Р	«АВ Энзаймс ГмбХ», Германия	ФитА
Кемзайм (6 вариантов – сухие и жидкие)	Кемин Европа НВ, Бельгия	ЦА, КсА, ГЛА
Белфид	Белдем С.А., Бельгия	Ксиланазная активность
Биозим (2 варианта – сухой и жидкий) Экозим (2 варианта – сухой и жидкий) Хостазимы (2 вар.)	Франклин Продактс Интер- нейшенл ВУ, Нидерланды	КсА, ГЛА
Био Фид плюс (2) Энерджекс (2)	Ново Нордиск, Дания	КсА, ГЛА, Пентозаназа ГЛА, Пектиназа
Ронозим А (4 варианта) Ронозим Р	«Рош Витамины Лтд», Швейцария; «Новозаймс А/С», Дания	ЦА, КсА, ГЛА ЦА, КсА, ГЛА, α -А Фитаза
Роксазим Г2	Хоффманн Ла Рош АГ, Швейцария	ЦА, КсА, ГЛА

Ровабио Эксель (2 варианта) Ровабио Ксилан	Авентис Анимал Нутришн Рон Пуленк СА, Франция	КсА, ГЛА Ксиланазная активность
Оллзайм (4 варианта) Веппро (2 варианта)	Оллтек ИНК, США	Глюканазная активность ЦА, КсА, ПА

Примечание: ЦА – целлюлазная активность; КсА – ксиланазная активность;
 ПА – протеолитическая активность; АА – амилазная активность;
 ГЛА – β -глюканазная активность; ПекА – пектиназная активность;
 ФитА – фитазная активность

Литература

1. Ferket P.R., Middleton T. // Poultry International, USA. – 1999.
2. Bedrord M.R. // Animal Feed Science and Technology. – 2000. – Vol. 86. – P. 1–13.
3. Буряков Н., Васильева Ю. // Комбикорма. – 2004. – Т. 2. – С. 56.

СЕВЕРО ОЧОА – ИСПАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ГЕНИЙ НОМЕР ДВА: К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ

В.С. ВОРОБЬЕВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



Испанский гений всегда отличался своей оригинальностью. В отношении художественных гениев это общепризнано: Сервантес и Лопе де Вега — в литературе, Веласкес, Гойя, Гауди и Сальвадор Дали — в живописи и архитектуре. На грани философии и искусства искрится талант Мигеля де Унамуно. А вот научный гений Испании более редок, но зато какой! Первым мировое признание получил величайший исследователь микроскопического строения мозга Сантьяго Рамон-и-Кахаль, удостоенный Нобелевской премии в 1906 году, а на втором месте стоит знаменитый биохимик Северо Очоа, также получивший Нобелевскую премию, но уже через 50 лет, в 1959 году за первый в мире синтез РНК в пробирке с помощью открытого им фермента.

Это событие по значимости сопоставимо с открытием Э. Бухнером бесклеточного брожения в 1897 г. Что интересно: в науку С. Очоа привело чтение автобиографии С. Рамон-и-Кахаля «Воспоминания о моей жизни» — так что духовная эстафета замкнулась, соединив двух выдающихся испанцев разных поколений. Больше того, Очоа всю свою жизнь выстроил «по Кахалю»: обожал его, восхищался им, старался подражать ему, особенно в плане преданности науке.

В 2005 году исполняется 100 лет со дня рождения Северо Очоа, в связи с чем уместно упомянуть о его вкладе в науку и тем самым почтить память тонкого, самобытного ученого. Вначале — биографические сведения о нем.

Северо Очоа де Альборнос (полное имя) родился 24 сентября 1905 г. в Луарке (Астурия). Он был самым младшим — седьмым ребенком в семье. Его отец — баск Северо Мануэль Очоа, судья и предприниматель, мать — Кармен де Альборнос. Отец умер, когда мальчику было 7 лет, и он с матерью переехал на юг Испании, в Малагу, где посещал среднюю школу. По окончании школы он поступил и в 1921 г. окончил колледж (по-испански «*Instituto de Bachillerato*») в Малаге, получив степень бакалавра. Здесь учитель химии — Эдуардо Гарсиа Родеха — заинтересовал его естественными науками. Но, самое главное, его интерес к биологии, как уже упоминалось, пробудила яркая, искренняя, эмоциональная, высокохудожественная автобиография легендарного испанского нейробиолога С. Рамон-и-Кахаля, под влиянием которой многие молодые испанцы (да и не только они) зажигались страстью к науке. Безусловно, загорелся и такой одаренный юноша, как С. Очоа. В 1923 году он поступил на медицинский факультет Мадридского университета (Сан Карлос), надеясь работать с Кахалем, но тот уже был на пенсии. В университете Очоа работал лаборантом у профессора кафедры физиологии Хуана Негрина (будущего премьер-министра

* Автор для переписки:

© 2005 г. Воробьев В.С.,

к.м.н., член Центрального Правления ОБР

119296 Москва, Университетский пр-т, 9

E-mail: obr@biorosinfo.ru

Второй республики — с 1937 г. вплоть до 1945 г., когда он возглавлял республиканское правительство Испании в эмиграции). В 1927 г., будучи студентом, во время летних каникул практиковался в Университете Глазго у профессора Д. Ноэля Патона. Уже в студенческие годы к нему пришла слава упорного исследователя. В 1929 г. С. Очоа окончил университет со степенью доктора медицины с отличием. В 1931 г. он женился на Кармен Гарсиа Кобиан, дочери судьи и бизнесмена, с которой они прошли вместе жизненный путь 57 лет, до ее смерти в 1988 г. (детей от брака не было).

В 1929—1931 гг. Очоа стажировался как стипендиат Испанского совета научных исследований в лаборатории Отто Мейергофа (лауреата Нобелевской премии 1922 г.) в Институте медицинских исследований кайзера Вильгельма сначала в Берлине, затем в Гейдельберге (это была его первая командировка в данное научное учреждение). У Мейергофа он занимался биохимическими и физиологическими исследованиями мышц. Надо подчеркнуть, что С. Очоа в молодом возрасте (по сути, почти все 30-е годы) трудился, осваивая самые разнообразные методы, в ведущих европейских лабораториях биохимии и физиологии. Были тому и субъективные причины — огромная мотивация к работе на высоком уровне (в Испании методический уровень был сравнительно низок) — и объективные — нестабильная политическая обстановка и, наконец, гражданская война 1936—1939 гг.

В 1931 г. Очоа назначают лектором по физиологии в Мадридском университете — должность, которую он занимал до 1935 г.

С 1932 по 1934 гг. он работал в Национальном институте медицинских исследований в Лондоне (тогда его возглавлял прославленный исследователь медиаторов Генри Дейл). Здесь в 1932 г. испанский стажер выполнил свое первое исследование по энзимологии (совместно с Х.У. Дадли).

В 1934 году он вернулся в Испанию, где получил назначение на должность лектора по физиологии и биохимии, а в 1935 г. возглавил отделение физиологии Института медицинских исследований, основанного Хименес Диасом.

Когда в Испании разразилась гражданская война, они с супругой эмигрировали и направились в Германию. Надо отметить, что Очоа отрицательно относился к режиму Франко. Так началась вторая, вынужденная «командировка» Очоа в лабораторию Мейергофа в Гейдельберге, во время которой он занимался изучением действия козимазы (позднее ее называли дифосфопиридиннуклеотидом, ныне — НАД). Но длилась она недол-

го, поскольку в 1938 г. сам Мейергоф был вынужден покинуть Германию в связи с неарийским происхождением. По рекомендательному письму Мейергофа А.В. Хилл (известный английский физиолог, лауреат Нобелевской премии) устроил Очоа на год в Морскую биологическую лабораторию в Плимуте. Затем он поступил на работу в биохимическую лабораторию Оксфордского университета к Рудольфу А. Питерсу, где трудился до 1941 г., занимаясь исследованием ферментативных механизмов окислительного метаболизма. В 1941 г. он переехал в США.

В Америке он вначале работал (до 1942 г.) в Медицинской школе университета Дж. Вашингтона в Сент-Луисе (Миссури), а затем был назначен исследователем в Медицинскую школу Нью-Йоркского университета. Там он последовательно занимал должности адъюнкт-профессора биохимии (1945), профессора фармакологии (1946), профессора биохимии (1954) и заведующего кафедрой биохимии. В 1949 г. он был приглашенным профессором биохимии в Калифорнийском университете в Беркли. С 1954 г. Очоа являлся руководителем биохимического отделения Медицинского колледжа Нью-Йоркского университета — вплоть до 1974 г., когда он ушел в отставку. В 1956 г. он принял американское подданство. В 1974—1985 гг. Очоа работал в Институте молекулярной биологии Рош в Натли (штат Нью-Джерси).

В 1985 г. С. Очоа возвратился в Испанию, где стал преподавать в Автономном университете Мадрида. Скончался ученый в Мадриде от пневмонии 1 ноября 1993 г., в возрасте 88 лет. В его честь в Мадриде был создан Центр молекулярной биологии «Северо Очоа», запланированный еще в 70-е годы (до этого в Испании был только один мемориальный научный центр — Институт Кахалья).

Вполне понятно, что исследователь такого ранга, тем более Нобелевский лауреат, был удостоен всевозможных почестей, принятых в научном мире. Он был избран иностранным членом Лондонского королевского общества, удостоен почетных степеней университетов Вашингтона, Оксфорда, Глазго и др. Очоа был награжден медалью Карла Нойберга Американского общества европейских химиков (1951), ему была присуждена премия Шарля Леопольда Майера Французского общества биохимиков (1955). Он состоял членом Нью-Йоркской академии наук, Биохимического общества Великобритании, Королевских академий Мадрида и Барселоны и т.д. Был он и президентом Международного биохимического союза (1961—1967). В честь 70-летнего юбилея Северо Очоа в 1975 г. были проведены специальные симпози-

умы в Барселоне и Мадриде. Его ученик и дольщик по Нобелевской премии А. Корнберг с соавторами в 1976 г. выпустили трехтомную книгу («Reflections on biochemistry»), содержащую все написанные юбиляром вместе с коллегами труды. Аналогичную акцию осуществило и испанское издательство.

Нужно сказать о том, что 8 февраля 1966 г. он был избран иностранным членом АН СССР по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений (специальность — биохимия). Известно, что в 1969 году на VI конференции ФЕБО в Мадриде Северо Очоа встречался с советской делегацией. Есть также сведения, что вице-президент АН СССР и президент Общества «СССР — Испания» академик Ю.А. Овчинников общался с Очоа.

Что видно из послужного списка ученого? За свою долгую жизнь странника он поработал в 9 европейских и 3 американских лабораториях. Но везде в числе прочих важных направлений всегда активно занимался энзимологией, причем работал в лабораториях выдающихся биохимиков: в молодые годы — у Мейергофа в Гейдельберге (этот знаменитый исследователь открыл гексокиназу в 1927 г. и в целом досконально изучил гликолиз, именуемый и как путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса), в зрелые годы — уже в США трудился в Университете Вашингтона в Сент-Луисе вместе с супругами Кори, которые известны своими открытиями ферментов углеводного обмена в цикле Кори (в том числе гликогенфосфорилазы и ряда других ферментов гликогенолиза — недаром их лабораторию называли «Меккой энзимологии»; по-видимому, не случайно из нее вышли 6 Нобелевских лауреатов, не считая самих руководителей). То есть Очоа получил секреты из первых рук от самых известных энзимологов мира. Благодаря этому он сделал ряд существенных открытий в энзимологии, особенно в области окислительного фосфорилирования (в цикле трикарбоновых кислот) — им выделены цитратсинтетаза, изоцитратдегидрогеназа и др. Он исследовал также роль коферментов в синтезе углеводов и ферментов в окислении жирных кислот. Все это в конечном итоге и привело его к знаковому событию в мировой молекулярной биологии — выделению фермента синтеза РНК. Надо подчеркнуть, что у Очоа проявлялся особый пиетет к ферментам, он любил и понимал их, и они открывали ему свои тайны. Такое же восторженное чувство по отношению к ферментам он привил и своему ученику А. Корнбергу и другим воспитанникам и последователям. Корнберг говорил об этом сам, неизменно подчеркивая, что «энзимология — самый эффективный

путь к пониманию явлений жизни». Интересно, что основатель экспериментальной физиологии Клод Бернар также придавал особое значение ферментам: «Можно не греша смелостью сказать, что ферменты именно и хранят в себе тайну жизни» (1875).

Проанализировать вклад Очоа в биохимическую науку в полном объеме — крайне сложная задача, и она не ставилась автором настоящей мемориальной статьи. Поэтому акцент будет сделан на главном открытии ученого. Суть его сводится к следующему. В 1955 году он вместе с аспиранткой Марианной Грюнберг-Маного (уроженкой России, впоследствии известным биохимиком, работавшей во Франции, иностранным членом АН СССР с 27 декабря 1988 г.) выделил из микроорганизма *Azotobacter vinelandii* новый фермент, который катализировал синтез *in vitro* сходной с РНК молекулы, состоящей из 4, 3, 2 и даже одного азотистого основания. Ферменту было дано название «полинуклеотидфосфорилаза». Тщательные эксперименты показали, что синтетический полирибонуклеотид напоминает собой натуральную РНК по размеру. Его молекулярная масса варьировала от 30000 до $1-2 \times 10^6$ Да. Были сходны и константы седиментации. Для проведения надежной реакции синтеза РНК требовался высокоочищенный фермент, для чего использовали хроматографию. Кроме того, для инициации синтеза необходимо было добавление в раствор небольшого количества олигомера — тогда происходит наращивание полимерной цепочки. При обработке синтезированного РНК-подобного полимера панкреатической рибонуклеазой получается смесь олигонуклеотидов такая же, как и при расщеплении натуральной РНК в сходных условиях. В опытах с гидролизом синтезированного полимера с помощью фосфодиэстеразы, выделенной из змеиного яда и ткани селезенки, было показано, что полученная экспериментально РНК представляет собой линейную цепочку, нуклеозидные единицы которой связаны 3,5'-фосфодиэфирными мостиками.

Через два года Артур Корнберг выделил из кишечной палочки фермент ДНК-полимеразу и с его помощью осуществил синтез ДНК. В 1959 г. обоим ученым была вручена Нобелевская премия.

Интересен факт оценки самого ученого своего открытия. В Нобелевской речи «Ферментативный синтез рибонуклеиновой кислоты» Очоа сказал, что с помощью выделенного им с сотрудниками фермента полинуклеотидфосфорилазы удалось синтезировать РНК вне клеток из «простых естественных предшественников»! Да, все кажется ясным и простым после открытия — таков

непреложный закон движения человечества к познанию истины.

В отношении открытий в молекулярной генетике природа отдавала свои тайны медленно, дозированно, как бы квантовала их. Ошеломляющий успех Уотсона и Крика она позволила один раз в 100 лет (как и монаху Менделю она открыла, но уже тихо, законы расщепления 100 лет назад и тоже 1 раз в столетие). Все остальные молекулярные биологи шли методически и спокойно, как будто по плану, причем часто одно и то же выдающееся открытие совершалось несколькими лицами одновременно: триплетный код — Ниренберг, а параллельно Корана и Холли, обратная транскриптаза — Темин и независимо от него Балтимор и т.д. Но в этом ряду сравнительно без блеска и излишнего шума с интервалом в два года в середине 50-х годов XX века сделали свои элегантные синтезы РНК и ДНК *in vitro* С. Очоа и А. Корнберг. Особенно удивителен тот факт, что это сделали учитель и ученик — Корнберг учился у Очоа в 1946–1947 гг. на кафедре фармакологии Медицинской школы Нью-Йоркского университета. Этот дуэт, по сути дела, заложил основы будущей геной инженерии и создал базу для расшифровки генетического кода. В научном мире сразу и по достоинству оценили их открытия, и, по-видимому, не случайно они были удостоены Нобелевской премии немедленно, 2–4 года спустя, даже раньше Уотсона и Крика, получивших ее тремя годами позже, в 1962 г. (то есть через 9 лет после публикации в «Nature»).

Практически во многих энциклопедиях (особенно кратких) дается лаконичное сообщение о существовании Очоа в науку: выделил фермент, с помощью которого синтезировал РНК, за что был удостоен Нобелевской премии вместе с Корнбергом. Гораздо реже говорится о другом, не менее важном цикле работ, выполненном после открытия в 1961 г. Ниренбергом и Маттеи кодирования полиурацилом синтеза фенилаланина и подтверждающем, что обнаруженный Очоа фермент полинуклеотидфосфорилаза не только синтезирует РНК, но и в тестовой системе деградирует ее (то есть это фермент, катализирующий реакции синтеза и распада РНК), в результате чего с нее как с матрицы транслируется генетическая информация и получают белковые молекулы с известной последовательностью аминокислот. То есть это также были пионерские работы по расшифровке генетического кода (Очоа раскрыл триплетный код для 11 аминокислот). И как выразился его ученик А. Корнберг в одной из лучших биографий своего учителя (2001), «Очоа мог бы разделить Нобелевскую премию 1968 года с Р.В.

Холли, Х.Г. Кораной и М. Ниренбергом «за объяснение генетического кода и его функции в синтезе белков».

Ясно, что если бы не С. Очоа и А. Корнберг осуществили синтез нуклеиновых кислот в бесклеточной среде, то это сделали бы другие, не менее талантливые люди. Высокая биохимическая культура во многих лабораториях послевоенного мира уже набирала инерцию, и открытия в молекулярной биологии посыпались, как из рога изобилия, о чем свидетельствуют особенно 60–80-е годы. Однако истина открылась впервые им, и в год 100-летия одного из них и, пожалуй, главного (хотя бы по долгу учителя) — Северо Очоа — мы должны вспомнить его и отдать дань благодарности и восхищения его умом и талантом.

Литература

1. Академия наук СССР. 250 лет: 1724–1974. Персональный состав. Книга 2. — М.: Наука, 1974. — С. 425.
2. Бернар Клод. Об отношениях функциональных и питательных явлений: Публичные лекции, читанные в Париже летом 1875 года / Пер. под ред. И. Тарханова. — СПб.: Издание Русской Скоропечатни, 1875. — С. 14.
3. Кахаль С.Р. Автобиография (воспоминания о моей жизни) / Под ред. А.В. Смольяникова и Д.С. Саркисова. Пер. с англ. В.С. Воробьева. — М.: Медицина, 1985. — 272 с.
4. Корнберг А. Синтез ДНК: Пер. с англ. — М., 1977.
5. Лауреаты Нобелевской премии. Энциклопедия: Пер. с англ. В 2-х т. — М.: Прогресс, 1992. — 775 + 861 с.
6. Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002. — СПб.: Издательство ДЕАН, 2003. — 800 с.
7. Очоа С. Синтез полинуклеотидов / В кн.: Химические основы наследственности. Пер. с англ. Под ред. И.Л. Кнунянца и Б.Н. Сидорова. — М., 1960. — С. 500 (соавт. Л. Хепелл).
8. Очоа С. Трансляция генетической информации / В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. Под ред. А.И. Опарина. — М., 1970. — С. 238.
9. Очоа С. Ферментативные механизмы передачи генетической информации / В кн.: Горизонты биохимии. Пер. с англ. Под ред. Л.А. Гумермана. — М., 1964. — С. 120.
10. Очоа Северо / БМЭ. 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия. — 1982. — Т. 18. — С. 216.
11. Чолаков В. Нобелевские премии. Ученые и открытия: Пер. с болг. / Под ред. и с предисл. А.Н. Шамина. — М.: Мир, 1986. — 368 с.

12. *Candela R.B.* Severo Ochoa. — Med. esp. — 1978. — Vol. 77. — P. 121.
 13. *Gomez-Santos Marino y Gomez Santos Marino.* Severo Ochoa y Espana. — Editorial Trotta, S.A. Lengua: Castellano, 2005. — 336 p.
 14. *Kornberg A., Horecker B.L., Cornudella L., Orro J. (eds).* Reflections on biochemistry. In honour of Severo Ochoa. Essays by participants in the celebration of his 70th birthday. — Pergamon Press, 1976.
 15. *Kornberg A.* Remembering our teachers // J. Biol. Chem. — 2001, January 5. — Vol. 276. — Issue 1. — P. 3–11.
 16. *Nobel Lectures in Molecular Biology 1933–1975.* — N.-Y.: Elsevier, 1977. — 534 p.
 17. *Ochoa S.* Regulation of protein synthesis in eukariotes // Ann. Rev. Biochem. — 1979. — Vol. 48. — P. 549.
 18. *Severo Ochoa.* Enzymatic synthesis of ribonucleic acid: Nobel Lecture, December 11, 1959 / In: Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942–1962. — Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964. — P. 645–662.
 19. *Severo Ochoa (1905–1993)* // Nature. — 1993, December 2. — Vol. 366. — P. 408.
 20. *Sols A. and Estrevez C. (eds).* Trabajos reunidos de Severo Ochoa 1928–1975. — Published by Servicio de Publicaciones, Ministerio de Educacion y Ciencia Cuidad Universitaria, Madrid-3, Spain, 1975.
 21. *Sourkes T.L.* Nobel prize winners in medicine and physiology 1901–1965. — London etc.: Aberland — Schuman, 1966. — 464 p.
- Были использованы Интернет-материалы, в том числе <http://nobelprize.org>; <http://britannica.com>; <http://www.nobel.se>.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2005 г.

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1865 — обнаружение Грегором Менделем (Gregor Johann Mendel, 1822–1884) своего открытия — принципов наследования признаков («законы Менделя»). Он доложил данные своих опытов на горохе Обществу естествоиспытателей г. Брюнна (Австрия) — ныне Брно (Чехия). Публикация результатов работы была осуществлена в 1866 г. в Трудах Общества естествоиспытателей под названием «Опыты над растительными гибридами» (перепечатка — в 1901 г.).

1900 — «переоткрытие» законов Менделя независимыми исследователями: Г. де Фризом (Hugo de Vries, 1848–1935) — в Нидерландах, К. Корренсом (Carl Erich Correns, 1864–1933) — в Германии, Э. Чермаком (Erich Tschermak von Seysenegg, 1871–1962) — в Австро-Венгрии. Общеизвестная точка отсчета рождения генетики как науки.

1905 — открытие половых хромосом (X и Y) Э. Вильсоном (Edmund Beecher Wilson, 1856–1939) и Н. Стивенсом (Nettie Marie Stevens, 1861–1912) независимо друг от друга.

1910 — гипотеза линейного расположения генов в хромосомах (Морган Т.).

1925 — первая экспедиция Н.И. Вавилова с целью изучения мировых растительных ресурсов.

1935 — публикация основополагающей статьи Н.В. Тимофеева-Ресовского, К.Г. Циммера, М. Дельбрюка «О природе генных мутаций и структуре гена» (Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbrueck M. Ueber die Natur der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Gess. Wiss. Goettingen, 6, N. F. — 1935. — Bd. 1. — N 13. — S. 189–245). В статье изложены принципы мутагенеза — попадания и мишени. В ней также представлен матричный принцип воспроизведения наследственных молекул, предложенный в 1928 г. Н.К. Кольцовым — учителем Н.В. Тимофеева-Ресовского. Но самое главное — статья стала базой, на которой была построена логика популярной в 40-е годы книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?»,

давшей толчок к прогрессу генетики и молекулярной биологии. Выдающийся физик сумел придать ассоциативный блеск фактам и идеям талантливых авторов (один из них — Макс Дельбрюк — впоследствии станет лауреатом Нобелевской премии) и пойти дальше в своих обобщениях и прогнозах. Русский перевод статьи на сайте [http://www.jinr.ru/~drrr/Timofeeff/auto/pdf/mut\(i-ii\)_r.pdf](http://www.jinr.ru/~drrr/Timofeeff/auto/pdf/mut(i-ii)_r.pdf)

1935 — первая публикация А.Н. Белозерским (1905–1972) на русском языке о биохимическом выявлении ДНК (тимонуклеиновой кислоты по терминологии того времени) в растениях — в ростках семян гороха. На иностранном языке эта статья появилась на год ранее в 1934 г. (совместно с А.Р. Кизелем).

1935 — Г. Меллер (в период работы в Москве) и А.А. Прокофьева-Бельговская определили размер генов у дрозофилы.

1940 — О. Эйвери (O.Th. Avery, 1877–1955) изолировал чистую ДНК

1955 — открытие цитокинов (нового класса фитогормонов) американскими физиологами растений Ф. Скугом (Folke Karl Skoog, 1908–2001) и К. Миллером (Carlos Miller).

1965 — основание Межфакультетской лаборатории биоорганической химии при МГУ им. М.В. Ломоносова. Первым директором был академик АН СССР А.Н. Белозерский (до конца своей жизни — 1972 г.). Ныне — это крупнейшее научно-образовательное учреждение по молекулярной биологии, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

1980 — изобретение полимеразной цепной реакции — ПЦР (polymerase chain reaction, PCR). Дала мощный толчок для развития молекулярной биологии в методическом плане. Автор — К. Мюллис (Kary Banks Mullis, род. в 1944 г.), удостоен за это Нобелевской премии (1993). Корпорация «Сетус» запатентовала данный способ, а в 1991 г. продала патенты на права фирме «Хоффман — Ла Рош».

1985 — первые полевые испытания трансгенных растений, устойчивых к насекомым, вирусам и бактериям.

1990 — начало реализации Международной программы «Геном человека» в США.

ПЕРСОНАЛИИ

115 лет со дня рождения Германа Меллера (Herman Joseph Muller, 1890—1967), американского генетика. Лауреат Нобелевской премии (1946) за открытие мутаций, возникающих под действием рентгеновского облучения. Разрабатывал хромосомную теорию наследственности (вместе с Т. Морганом, А. Стертевантом и К. Бриджесом). С 1933 по 1937 гг. работал в Советском Союзе по приглашению Н.И. Вавилова в руководимом им Институте генетики АН СССР, возглавляя лабораторию. В 30-е годы увлекался евгеникой и безуспешно пытался пропагандировать ее в стране победившего социализма. Иностраный член АН СССР. В 1948 г. после политизированной сессии ВАСХНИЛ, осудившей генетику, в знак протеста вышел из состава Академии.

105 лет со дня рождения Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского (1900—1981), отечественного генетика, ученика Н.К. Кольцова. В 1925—1945 гг. трудился в Германии, где в 1935 г. опубликовал вместе с К.Г. Циммером и М. Дельбрюком статью «О природе генных мутаций и структуре гена», основываясь на которой, Э. Шредингер строил свои взгляды на организацию гена в книге «Что такое жизнь с точки зрения физики» (1945). После войны был подвергнут 10-летнему заключению как «невозвращенец», продолжая работать по специальности на закрытом объекте в Сунгуле (Южный Урал). В последующем работал в различных учреждениях, в том числе в Обнинске, в Институте медицинской радиологии АМН СССР (1964—1969), исследуя проблемы радиационного мутагенеза, радиационной биогеоценологии, популяционной генетики и др. Организовывал летние школы для молодых биологов (Миассово и др.), что способствовало ликвидации последствий «антиобразования» в области биологии и генетики, даваемого в школах и вузах страны во времена лысенковщины.

105 лет со дня рождения Хуана Хуановича Плanelьеса (1900—1972), российского микробиолога (испанца по происхождению). Академик АМН СССР, член-корреспондент Академии медицины Испании. В 1945—1971 гг. заведовал отделом инфекционной патологии и экспериментальной терапии Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР (ныне РАМН). Труды посвящены исследованию

лекарственной устойчивости микроорганизмов, проблем патогенеза и терапии бактериальных инфекций.

100 лет со дня рождения Андрея Николаевича Белозерского (1905—1972), крупного биохимика, академика АН СССР, вице-президента АН СССР (1971—1972), одного из основателей молекулярной биологии в нашей стране. В течение 40 лет трудился на кафедре физиологии растений МГУ, совмещая это с деятельностью в НИИ АН и АМН СССР, а также другими научно-организационными обязанностями, в том числе руководящими должностями в Президиуме АН СССР. В 1965 г. он основал и возглавил Межфакультетскую лабораторию биорганической химии при МГУ, которая в настоящее время превратилась в подлинную кузницу отечественных кадров молекулярных биологов (ныне она преобразована в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова). Им сделан ряд принципиальных открытий в биохимии и сопредельных науках (микробиология, цитология и др.). В 1934 г. им в соавторстве с Р.А. Кизелем была напечатана на иностранном языке первая в мире работа о выявлении ДНК у растений (в 1935 г. она вышла на русском языке). В 1936 г. он совместно с И.И. Дубровской выделил ДНК из семени конского каштана. По сути, им был положен конец разделению нуклеиновых кислот на животную и растительную. Кроме того, было показано, что в одной и той же клетке содержатся и ДНК и РНК. Важен также многолетний цикл работ А.Н. Белозерского по изучению ДНК и РНК у микроорганизмов. В частности, было найдено, что у молодых бактерий содержание РНК в несколько раз больше, чем у старых. Он является автором одних из первых в стране исследований антибиотиков. Так, вместе с Г.Ф. Гаузе и др. в 40-е годы им был изучен новый советский антибиотик грамицидин С. После работ Чаргаффа в 50-е годы под руководством А.Н. Белозерского в МГУ и Институте биохимии им. А.Н. Баха АН СССР были развернуты широкие исследования видовой специфичности ДНК бактерий. Кроме того, внимание было уделено и изучению РНК у микроорганизмов. В результате он вместе с А.С. Спириным в 1957 г. предсказал существование иРНК — за 4 года до ее реального открытия западными учеными Ф. Жакобом и Ж.Л. Моно. Среди учеников А.Н. Белозерского — академик РАН А.С. Спирин, член-корреспондент РАН Г.И. Абелев и др. (Развернутая биография А.Н. Белозерского и анализ его творческого пути будут представлены в следующем номере).

100 лет со дня рождения Владимира Дмитриевича Тимакова (1905–1977), известного отечественного микробиолога, академика АН и АМН СССР, президента АМН СССР (1968–1977). Своей научной и организационной деятельностью способствовал развитию микробиологии и эпидемиологии в нашей стране. Внес существенный вклад в изучение латентных инфекций и разработку проблемы персистенции инфекционных агентов в целом. Большое внимание уделял исследованию L-форм бактерий и микоплазм. В 50-е годы последовательно выступал против лжеидей в биологии и медицине, в частности, против скандально известного Г.М. Бошьяна с его теорией самозарождения микроорганизмов из неживого вещества, который в течение 5 лет возглавлял лабораторию в руководимом В.Д. Тимаковым Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. В 60–70-е годы активно внедрял генетические методы в микробиологию, создавал соответствующие лаборатории и выдвигал перспективных исследователей. Так, например, в 1964 г. им была организована лаборатория эписом (плазмид), которую вначале возглавлял Д.Г. Кудлай, а затем — Г.Б. Смирнов (ныне член-корреспондент РАМН). В бытность его президентом АМН СССР был основан Институт медицинской генетики в структуре Академии.

100 лет со дня рождения Василия Николаевича Ореховича (1905–1997), отечественного биохимика, академика АМН СССР, вице-президента АМН СССР (1960–1963). Разрабатывал проблемы биохимии и патохимии белков и протеолитических ферментов. Им с сотрудниками открыты ферменты карбоксикацепсин и нейтральная тканевая протеиназа. Занимался вопросами синтеза аминокислот.

95 лет со дня рождения Дороти Мэри Кроуфут-Ходжкин (Dorothy Mary Crowfoot Hodgkin, 1910–1994), известного английского химика, лауреата Нобелевской премии (1964) за рентгеноструктурное исследование структуры биологически активных веществ (холестерина, пеницилина, витамина В₁₂, инсулина). Иностраный член АН СССР (1976). Награждена золотой медалью им. М.В. Ломоносова за выдающиеся достижения в области биохимии и кристаллохимии (1982). Она активно взаимодействовала со специалистами СССР, в частности, с академиком Ю.А. Овчинниковым, приезжала на конференции, посещала Институт биоорганической химии РАН и т.д.

85 лет со дня рождения Отара Георгиевича Анджапаридзе (1920–1996), академика АМН СССР. Академик-секретарь Отделения гигиены, микробиологии и эпидемиологии АМН СССР (1976–1990). В течение многих лет был директором НИИ вирусных препаратов. Разрабатывал научные основы производства вирусных препаратов (гамма-глобулина против клещевого энцефалита, живой коревой вакцины и др.).

70 лет со дня смерти Дж. МакЛеода (1876–1935), лауреата Нобелевской премии (1923) за открытие инсулина (совместно с Ф. Бантингом).

65 лет со дня смерти Николая Константиновича Кольцова (1872–1940), выдающегося исследователя, основоположника экспериментальной биологии в России. С 1916 г. — член-корреспондент Петербургской академии наук (после революции — АН СССР), академик ВАСХНИЛ (1935). Профессор ряда московских высших учебных заведений до и после революции (университет, Высшие женские курсы, университет им. А.Л. Шанявского и др.). Основатель и директор Института экспериментальной биологии (1917–1938), директор Центральной станции по генетике сельскохозяйственных животных (1919–1929). Ранние работы посвящены сравнительной анатомии позвоночных (метамерии головы). Плановмерно и обстоятельно изучал цитоскелетные структуры клетки, в том числе на объектах биостанций в Неаполе, Виллафранке и др. (одноклеточные и спермии беспозвоночных и т.д.). Предложил теорию матричной репродукции наследственной молекулы (1928) — он считал ее белком. Тем не менее приоритет идеи репликации, принципа самоудвоения генетического материала — остается за ним, и это повсеместно признается (имеется его публикация 1928 г. на этот счет на иностранном языке и ссылка на нее в статье на немецком языке Н.В. Тимофеева-Ресовского с соавт., 1935). Организатор ряда журналов, в их числе «Успехи экспериментальной биологии» (1922–1929), «Биологический журнал» (1932–1938) и др. Был соредактором журнала «Природа» (1914–1930). Итоговый труд — «Организация клетки» (1936). Воспитал большую научную школу: среди его учеников такие имена, как А.С. Серебровский, Н.В. Тимофеев-Ресовский, М.М. Завадовский, Б.Л. Астауров, В.А. Энгельгардт, Н.П. Дубинин, В.В. Сахаров, П.Ф. Рокицкий и др. В период гонений на генетику подвергся незаслуженному давлению со стороны властей, предательству некоторых коллег и учеников,

критике за евгенические взгляды 20-х годов, от которых он самостоятельно отошел в начале 30-х. Скончался в Ленинграде от сердечного приступа 2 декабря 1940 г. Похоронен в Москве, на Немецком кладбище Лефортова после кремации, одновременно вместе с супругой Марией Полиевктовной, не перенесшей смерти мужа.

65 лет со дня смерти Фибуса Левина (Phoebus A.Th. Levene, 1869–1940), американского исследователя (Рокфеллеровский институт, Нью-Йорк), выходца из России, автора тетрауклеотидной гипотезы строения ДНК.

60 лет со дня смерти Т. Морган (Thomas Hunt Morgan, 1866–1945), создателя хромосомной теории наследственности, за что он был удостоен Нобелевской премии по медицине в 1933 г.

25 лет со дня смерти Александра Николаевича Несмеянова (1899–1980), основоположника элементоорганической химии, академика АН СССР, президента АН СССР (1951–1961). После Великой Отечественной войны был ректором МГУ им. М.В. Ломоносова, при нем возводились его новые корпуса на Воробьевых горах. Его личный вклад в науку огромен и общеизвестен — открытие явления металлтропии, изучение химии ферроцена, синтез новых элементоорганических полимеров, создание синтетической и искусственной пищи и др. Однако не менее значимо для нашего государства и его президентство в большой Академии. С его участием было организовано Сибирское отделение АН СССР, выстроен Новосибирский Академгородок. Трудно переоценить то, что он сделал для сохранения и укрепления

отечественной биологии. Он официально выступил против Т.Д. Лысенко, поддерживаемого в 50-е годы (как и при И.В. Сталине) руководителем государства, не имевшим высшего образования и продвигавшим ученого-самоучку из народа. В результате А.Н. Несмеянов лишился поста президента АН СССР, но все-таки успел до этого сделать много для вывода российской биологии из периода стагнации и мракобесия. Им создан Научный центр биологических исследований в Пушкино, открыты новые НИИ — Институт молекулярной биологии и Институт биоорганической химии (ныне носящие имена своих директоров — В.А. Энгельгардта, М.М. Шемякина, Ю.А. Овчинникова), осуществлен специальный выпуск студентов химфака МГУ для работы в Пушкино и других биологических лабораториях (знаменитый «несмеяновский набор») и т.д.

25 лет со дня смерти Александра Ивановича Опарина (1894–1980), отечественного биохимика, академика АН СССР, автора гипотезы возникновения живых структур из неорганических предшественников (неоднозначно оцениваемой ныне «теории происхождения жизни»). Академик-секретарь Отделения биологических наук АН СССР (1948–1955), то есть в самые трудные для нашей биологии годы — сессии ВАСХНИЛ 1948 г. и Павловской сессии 1950 г. Формально он не находился в оппозиции Т.Д. Лысенко, однако сумел дать возможность работать в 50-е годы А.Н. Белозерскому и его сотрудникам по тематике нуклеиновых кислот в учреждениях, которыми руководил сам: на кафедре биохимии растений МГУ и в Институте биохимии им. А.Н. Баха АН СССР.

СОБЫТИЯ ВТОРОГО ПОЛУГОДИЯ 2005 г.

ХII Европейский биотехнологический конгресс*

21–24 августа 2005 г. в Копенгагене (Дания) состоялись Генеральная ассамблея Европейской федерации биотехнологии (ЕФБ) и ХII Европейский биотехнологический конгресс. От России в работе Ассамблеи и Конгресса принял участие профессор Р.Г. Васильев, представлявший Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова как члена Европейской федерации биотехнологии.

Ассамблея рассмотрела важные организационные вопросы — отчет Исполкома ЕФБ, выборы новых членов руководящих органов. Была представлена информация о переносе штаб-квартиры ЕФБ в Барселону и других организационных событиях ЕФБ.

Программа Конгресса, озаглавленная «Приведение генома в жизнь», отличалась насыщенностью и охватывала все разделы фундаментальной и прикладной биотехнологии.

Прошло 5 лет после исторического события — полной расшифровки генома человека. За это время расшифровано еще более 100 геномов животных, растений и микроорганизмов. Появились целые новые направления науки — протеомика, транскриптомика, метаболомика, флюксомика и другие «омики».

Наконец, возникла системная биология — совершенно новая интегральная область науки, меняющая саму суть биологии и представляющая собой синтез современной биологии, техники и информатики. Биология сегодняшнего дня уже не является описательной наукой (как это было еще 10–15 лет назад), а превращается в важнейший раздел информационных наук. Недаром основной алгоритм нынешней биологии: от геномики к *in silico* и обратно.

На данном этапе развития биологии главной задачей является применение обширной информации, полученной при изучении геномики (и последующих «омик») в практических исследованиях. Поэтому звучали доклады с названиями, немислимыми еще несколько лет назад: «Геномика в науке о пище», «Омики в пищевой биотехнологии», «Использование геномики для улучшения качества жизни» (свиней!), «Геномика и протеомика в решении проблемы биотоплива» и т.д.

Центральными событиями фундаментального блока были выступления Л. Худа (L. Hood, Институт системной биологии, Сиэтл, США) «Системная биология: преобразуя биологию и медицину» и Р. Уотерстона (R. Waterston, Вашингтонский университет, США) «Интерпретируя геномы человека и *Caenorhabditis elegans*». На состоявшихся симпозиумах «Системная биология», «Интегральный анализ», «Геномика и метаболизм», «Геномика в микробной экологии и медицинской микробиологии», «Структура и функция белка», «Протеомика», «Белковая инженерия и структура белка», «Прикладная протеомика» были представлены результаты работ ведущих лабораторий Европы, США, Японии и других стран в области постгеномных исследований.

Развитие знаний в этой области идет настолько стремительно, что ключевой задачей сейчас является сохранение единого понятийного пространства. Уже не кажутся фантастическими представления о нанобиотехнологии как о науке, изучающей поведение единичной молекулы в отдельной клетке, и прогноз о том, что уже через 10 лет основой медицины будет служить полный интегральный анализ человека (геном — транскриптом — протеом — метаболом — флюксом) с идентификацией состояния его функциональных систем и их индивидуальной коррекцией. Это совсем другая медицина, медицина XXI века.

Мероприятия Конгресса, посвященные прикладным аспектам, охватывали все направления биотехнологии: «красную» (медицинскую), «зеленую» (сельское хозяйство и пищевая промышленность), «белую» (промышленная биотехнология, главным образом, биокатализ и производство биотоплива из возобновляемого сырья), «синюю» (окружающая среда).

Состоялась обширная постерная сессия.

В рамках Конгресса были проведены рабочие совещания (workshops), посвященные наиболее актуальным проблемам развития биотехнологии: подготовке кадров, вопросам законодательного регулирования, защите интеллектуальной собственности, проблемам научной миграции и участия молодежи в биотехнологических исследованиях, общественному восприятию биотехнологии, глобализации и международному сотрудничеству в сфере биотехнологии.

Общее впечатление — это мероприятие, в ходе которого на глазах меняется мир. Характерно высказывание одного из участников: сегодня геномика изменила биотехнологию, завтра биотехнология изменит весь мир. Жаль, что эти события (по крайней мере, в масштабе данного форума) проходят практически без участия России.

* Материал подготовлен Р.Г. Васильевым

12–14 сентября 2005 года в г. Анапа прошла Вторая научно-практическая конференция «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии». Конференция собрала известных специалистов в данной области (академики РАМН А.Л. Гинцбург, В.В. Зверев, А.А. Воробьев и др.). В ее работе принимал участие начальник Управления Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, член-корреспондент РАМН С.Б. Ткаченко.

16–17 сентября 2005 г. в Белгороде состоялась Вторая научно-практическая конференция «Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии». На конференции обсужден ряд вопросов, имеющих отношение к развитию современного сельского хозяйства с использованием биотехнологии на федеральном уровне. Кроме того, были затронуты региональные аспекты сельскохозяйственной биотехнологии на примере Белгородской области и сопредельных регионов (Брянск, Воронеж). Мероприятие было активно поддержано Администрацией Белгородской области.

18–20 октября 2005 г. в Ганновере (Германия) состоялась 14-я Международная выставка «БИО-ТЕХНИКА» («14. Internationale Fachmesse fuer Biotechnologie»). Тематика — биотехнология, биотехнологическое оборудование, биоинформатика. На выставке была представлена российская экспозиция, организованная под патронатом Федерального агентства по науке и инновациям.

III Съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

25–27 октября 2005 г. в Москве состоялся Третий съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Он проходил в помещении Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Съезд проходил при поддержке Министерства образования и науки РФ, Министерства промышленности и энергетики РФ, Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Министерства сельского хозяйства РФ, РАН, РАМН, РАСХН, Партии «Единая Россия». В работе съезда приняли участие около 1300 представителей из 43 субъектов РФ, а также гости из Беларуси, Украины, Узбекистана и Казахстана. Среди них — ученые и практики, государственные и общественные деятели, биологи, биотехнологи, медики, агрономы,

руководители государственных органов, бизнесмены и др. В работе съезда принял участие вице-президент Европейской федерации биотехнологии Ч. Брайс. Делегатов и участников съезда приветствовали первый заместитель Председателя Государственной Думы РФ О.В. Морозов и Главный ученый секретарь Президиума РАМН В.А. Тутельян. В адрес съезда поступили также приветствия от министра Правительства Москвы Е.А. Пантелеева и президента РАН Ю.С. Осипова.

Научная часть съезда состояла из 2 пленарных заседаний, 8 симпозиумов, 6 круглых столов, на которых было заслушано более 150 докладов. Была проведена школа-семинар по иммунобиологии. Состоялся конкурс молодых ученых, на котором победителю впервые была вручена медаль имени Ю.А. Овчинникова. В период работы съезда функционировала выставка более 40 компаний биотехнологического профиля.

Одной из главных задач съезда было обсуждение проекта Национальной программы «Развития биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.». Решение о ее формировании было принято на предыдущем съезде, и за 2004–2005 гг. концепция и структура программы были подготовлены. В результате всестороннего обсуждения проекта программы на съезде было констатировано, что и по форме, и по содержанию этот документ может быть принят как основа для создания окончательно варианта программы.

На съезде был сделан ряд докладов по новым методам в биотехнологии и физико-химической биологии, аналитических обзоров о состоянии важных разделов биотехнологии, по проблемам подготовки кадров в этой отрасли и др. Значительное внимание было уделено роли биотехнологии в решении жизненно важных экономических и социальных задач, в том числе развитии биоэнергетики на возобновляемом сырье, борьбе с опасными вирусными инфекциями, решении вопросов здорового питания и т.д.

В рамках организационной части съезда был заслушан отчетный доклад Центрального Правления Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова за 2004–2005 гг. В нем было сообщено об изменениях в структуре Общества (увеличении числа членов — организации новых региональных отделений в Пермской, Астраханской и Мурманской областях); присвоении Обществу имени Ю.А. Овчинникова; о проделанной научно-организационной работе — круглый стол в Государственной Думе, конференции в Калининграде, Анапе, Белгороде; об установлении контактов с Европейской федерацией биотехнологии и др.

В результате обсуждения научных, практических и организационных аспектов развития отечественной биотехнологии съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова **ПРИНЯЛ РЕШЕНИЕ:**

1. Одобрить деятельность Центрального Правления и Исполнительной дирекции Общества за прошедший после второго съезда период.
2. Обратиться в Государственную Думу ФС РФ с предложением о необходимости разработки федерального закона о биотехнологии, имея в виду ее растущее влияние на развитие народного хозяйства и обеспечение национальной безопасности.
3. Ходатайствовать перед Правительством Российской Федерации о разработке долгосрочной государственной политики, направленной на развитие отечественной биотехнологии.
4. Утвердить проект Национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» и поручить Центральному Правлению внести в нее все предложения и уточнения, данные делегатами и участниками съезда.
5. Предложить Правительственной комиссии по биологической и химической безопасности использовать наработки указанной программы для включения в ФЦП «Создание единой системы биологической и химической безопасности РФ на 2006–2010 гг.», предусмотрев при этом создание рабочей группы «Биотехнология и обеспечение биологической безопасности биосферы и техносферы страны».
6. Обратиться к Президенту РФ, Правительству РФ и в Государственную Думу ФС РФ с ходатайством о срочном внесении поправок, изменений и дополнений в Федеральный закон «О техническом регулировании» от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ в связи с накопившейся правоприменительной практикой.
7. Обратиться в Правительство РФ с просьбой принять Постановление о сохранении общегосударственных коллекций микроорганизмов с утверждением соответствующего Положения и создании на их основе национальных биоресурсных центров как жизненно важной базы для развития отечественной биотехнологии.
8. Обратиться к руководству Партии «Единая Россия» с ходатайством о включении биотехнологии в перечень формируемых национальных проектов и определении данного научно-практического направления как приоритета деятельности Партии.
9. Обратиться к руководителям федеральных округов и администраций субъектов РФ с предложением о

разработке региональных программ и целевых проектов по биотехнологии.

10. Продолжить работу по объединению биотехнологов России и стран СНГ, а также расширению сотрудничества с Европейской федерацией биотехнологии. При осуществлении международной кооперации обратить особое внимание на формирование 7-й рамочной программы с Евросоюзом и взаимодействие с Международным научно-техническим центром.
11. Издать труды съезда и предоставить информацию о съезде руководящим органам законодательной и исполнительной власти, научным ассоциациям, общественным организациям, СМИ.
12. Провести очередной Четвертый съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова в Москве в октябре 2006 года.

Конкурс молодых ученых 2005 г., проведенный Обществом биотехнологов России*

В рамках съезда состоялся конкурс молодых ученых. В конкурсе приняли участие 15 человек из различных городов России (Москва – 7, Санкт-Петербург – 1, Великий Новгород – 1, Калининград – 1, Брянск – 1, Иваново – 1, Нижний Новгород – 1, Уфа – 1, Владивосток – 1). В результате публичного обсуждения стендовых докладов и устных сообщений конкурсантов комиссией, утвержденной Центральным Правлением ОБР, принято решение:

1. Победителем конкурса молодых ученых считать:
Баландина Сергея Владимировича (аспирант Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) за работу «Структурно-функциональные исследования антимикробных пептидов морских беспозвоночных». Вручить победителю медаль имени Ю.А. Овчинникова и денежную премию.
2. Второе место разделили:
Власенко Мария Александровна (студентка биологического факультета Санкт-Петербургского университета, Санкт-Петербург) за работу «Трансформация инбредных линий редиса генами T-ДНК агробактерий как моделирование горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям».
Павлов Дмитрий Николаевич (младший научный сотрудник химического факультета МГУ им. М.В.

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

Ломоносова, Москва) за работу «Взаимосвязь структуры амфифильного блок-сополимера и его воздействия на динамические свойства липидных мембран».

Вручить им дипломы 2-й степени и денежные премии.

3. Третье место разделили:

Финкина Екатерина Ивановна (аспирант Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) за работу «Выделение и структурная характеристика новых РР-белков из семян чечевицы обыкновенной *Lens culinaris*»

Соболев Владимир Васильевич (научный сотрудник Брянской государственной сельскохозяйственной академии, Брянск) за работу «Разработка системы регенерации люпина».

Чемерис Дмитрий Алексеевич (младший научный сотрудник Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа) за работу «Гибридная цепная реакция в реальном времени».

Буреева Светлана Владимировна (сотрудник Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва) за работу «Комплемент-модулирующие свойства структур нанодиапазона»

Вручить им дипломы 3-й степени и денежные премии.

Международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и генетические ресурсы России: методологические, правовые и экономические аспекты»

15–16 ноября 2005 г. в Москве, в Палеонтологическом музее РАН была проведена Международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и генетические ресурсы России: методологические, правовые и экономические аспекты».

Она была организована Обществом биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и Отделением биологических наук РАН при поддержке Государственной Думы РФ, Министерства образования и науки РФ, Министерства природных ресурсов РФ, Министерства сельского хозяйства РФ, Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Министерства промышленности и энергетики РФ, РАН, РАСХН.

В работе конференции приняли участие более 100 специалистов в области биологии, биотехнологии,

медицины, сельского хозяйства, представители органов исполнительной власти, предприниматели из различных субъектов РФ, стран ближнего и дальнего зарубежья, в том числе Украины, Германии, США, Колумбии. Участников конференции приветствовали представитель Минприроды России А.М. Амирханов и от Президиума РАН академик РАН А.А. Воробьев.

Кроме научных лидеров России в данной области (член-корреспондент РАН Л.В. Калакуцкий, академик РАСХН Л.Н. Андреев и др.) в работе конференции приняли участие известные зарубежные специалисты: Т.Р. Янг (Германия), С. Каризоса (США) и др. Такой состав обеспечил высокопрофессиональный уровень обсуждения.

Главная цель конференции состояла в выработке консолидированной обоснованной позиции по проблеме биологического разнообразия и генетических ресурсов России, имея в виду все более возрастающее стратегическое и народнохозяйственное значение биоресурсов в национальных и глобальных масштабах. Данная проблема требует проработки по всем аспектам: фундаментальным, образовательным, правовым, экономическим, политическим, международным и т.д.

Участники конференции констатировали, что генетические ресурсы являются основой для сбалансированной средообразующей функции экологических систем, успешного развития современной биотехнологии, фармацевтической промышленности, сельского хозяйства и других отраслей экономики, определяющих устойчивое социально-экономическое развитие страны, повышение качества жизни населения, обеспечение ее продовольственной и биологической безопасности. Между тем вопросы сохранения национальных генетических ресурсов и создания условий для их рационального использования еще недостаточно осознаются как органами государственной власти, так и обществом.

Особенно серьезный дефицит ощущается в законодательном обеспечении деятельности в сфере биоразнообразия. В связи с этим участники конференции отметили как приоритет необходимость выработки современных правовых и организационных механизмов эффективной реализации возможностей, предоставляемых Конвенцией о биологическом разнообразии по обеспечению легитимного доступа к генетическим ресурсам и получению выгод от их использования.

К предмету специального внимания был отнесен вопрос о гарантированном сохранении и развитии уникальных отечественных коллекций в области биологии, в том числе Вавиловской коллекции генетических ресурсов

растений ВНИИР РАСХН, коллекций микробиологических штаммов ИБФМ РАН, ГосНИИгенетика и др., являющихся национальным достоянием России. Решение данного вопроса возможно только при активной поддержке со стороны государства.

Была высоко оценена деятельность биологов России по сохранению редких и исчезающих видов, по поддержанию особо охраняемых природных территорий, созданию «Красной книги» и др. В качестве существенных достижений ученых и государственных органов было отмечено создание «Национальной стратегии сохранения биоразнообразия России», Экологической доктрины РФ.

В результате всестороннего обсуждения научных, практических, организационных и иных аспектов проблемы биоразнообразия и генетических ресурсов России конференция **ПРИНЯЛА РЕШЕНИЕ:**

1. Считать целесообразным и актуальным регулярное обсуждение проблемы биоразнообразия, генетических ресурсов и других связанных с ней вопросов с привлечением отечественных и зарубежных экспертов.
2. Рассматривать в качестве приоритетной общегосударственной задачи сохранение уникальных биологических коллекций, в том числе путем формирования на их основе Национальных биоресурсных центров.
3. Рассмотреть возможность создания экспертной группы для разработки положения о статусе уникальных *ex situ* коллекций генетических ресурсов в ранге «Национального достояния России» с выделением целенаправленного финансирования на их содержание, независимо от ведомственной принадлежности.
4. Поддерживать инициативу ряда ведущих институтов, ботанических садов и биологических музеев о создании на их базе государственных депозитариев биологических видов с соответствующей правовой и экономической проработкой данного вопроса.
5. Участникам конференции направить в адрес Центрального Правления Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова предложения по улучшению законодательства в сфере биоразнообразия и смежных областей. Просить Общество собрать и обобщить эти предложения для последующего представления в соответствующие государственные структуры.
6. Поручить Обществу биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова обратиться в Государственную Думу Федерального Собрания РФ с ходатайством о совершенствовании существующего законодательства в области биоразнообразия и генетических ресурсов,

разработке и принятии новых законов, соответствующих современным условиям развития общества и международным юридическим нормам, а также в качестве практического шага в данном направлении о проведении в 2006 году парламентских слушаний по вопросам законодательного обеспечения сохранения биоразнообразия и оборота генетических ресурсов.

7. Обратиться к Правительству Российской Федерации с предложением о разработке долгосрочной государственной политики в области биоразнообразия и сохранения генетических ресурсов страны, имея в виду комплексное межведомственное решение организационных, юридических, экономических и иных вопросов на федеральном и региональном уровнях, с учетом международных нормативно-правовых актов.
8. Просить Отделение биологических наук РАН о целевой поддержке научных исследований в области биоразнообразия и сохранения генетических ресурсов.
9. Поручить Центральному Правлению Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова создать с участием заинтересованных специалистов и экспертов рабочую группу по научно-организационному сопровождению деятельности в сфере биоразнообразия и смежных вопросов. Поддерживать инициативу Общества по реализации комплексной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» и включению в нее качестве важнейших приоритетов создание Национальных биоресурсных центров и специального блока по агробиоразнообразию.
10. Обобщить и издать материалы Конференции и широко известить о ее решении государственные органы, научные общества, СМИ.

18–19 ноября 2005 года в г. Пущино состоялась 8-й Международный семинар-презентация инновационных научно-технических проектов «Биотехнология-2005». Организаторы: РАН, Федеральное агентство по науке и инновациям, Министерство промышленности и науки Московской области, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, некоммерческое партнерство «Консорциум «Биомак», Администрация г. Пущино, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (организация-устроитель). На семинаре выступили Е.Н. Орешкин и другие специалисты. Состоялась презентация биотехнологических проектов, постерная сессия. Издан сборник материалов.

1–2 декабря 2005 года в г. Пущино состоялась Вторая международная научно-практическая конференция МЕДБИОТЕК «Перспективы развития биотехнологии в России». Организаторы: Федеральное агентство по науке и инновациям, Отделение биологических наук РАН, Пущинский научный центр РАН, Инновационно-технологический центр «Биологически активные соединения и их применение» РАН, некоммерческое партнерство «Консорциум «Биомак», Агентство научных и деловых коммуникаций при РАН, ООО «Единые национальные технологии», Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Спонсор – DELTA Private Equity Partners. Состоялись 2 пленарных заседания, 6 секционных заседаний и 2 круглых стола, на которых были обсуждены вопросы теоретической и практической биотехнологии, в том числе ее медицинские, сельскохозяйственные, пищевые и промышленные аспекты.

5 декабря 2005 г. в Москве состоялось XXI Энгельгардтовское чтение. С докладом «Опухолевый супрессор р53 – гарант стабильности генома» выступил профессор М.П. Чумаков. Организаторы: Отделение биологических наук РАН, Научный совет по молекулярной биологии и генетике РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Чтения проводятся ежегодно после смерти ученого (1984 г.).

ПУБЛИКАЦИИ

Недавно вышли в свет:

Труды Второго съезда Общества биотехнологов России. Москва, 13–15 октября 2004 г. / Под ред. Р.Г. Василовой. – М.: Дельта, 2005. – 495 с.

Аннотация. Книга содержит труды Второго съезда Общества биотехнологов России, распределенные по трем блокам: научная часть, мемориальная часть (к 70-летию академика Ю.А. Овчинникова) и организационная часть. Ранее отдельной брошюрой вышли тезисы съезда, а в настоящем издании публикуются полные тексты докладов, выступлений и иные материалы и информационные сообщения. Книга предназначена для специалистов в области теоретической и практической биотехнологии, биологов, медиков, ветеринаров, агрономов, производственников.

Материалы конференции VI Международного форума «Высокие технологии XXI века». – М., 2005. – 496 с.

В сборнике представлены материалы конференции, прошедшей в рамках VI Международного форума «Высокие технологии XXI века». Специальный раздел посвящен работам по биотехнологии (с. 412–439).

Материалы научно-практической конференции – 8-го Международного семинара-презентации инновационных научно-технических проектов «Биотехнология-2005». Пущино, 18–19 ноября 2005 г. / Под ред. Т.А. Решетиловой, Е.Н. Музафарова. – ЗАО «А-Принт», 2005. – 188 с.

Аннотация. Сборник содержит тезисы устных и постерных сообщений участников 8-го Международного семинара-презентации инновационных научно-технических проектов в области биотехнологии, организованного Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Представлены научно-практические работы в области биотехнологии для медицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности, защиты и восстановления окружающей среды, аналитического, медицинского и биотехнологического приборостроения. Сборник предназначен для специалистов, работающих в соответствующих областях науки, а также для производственных, коммерческих и инвестиционных структур, заинтересованных во внедрении представленных разработок. Тезисы сообщений издаются в авторской редакции.

J. of Biotechnology. – 2005 Aug. – Vol. 118. – Suppl. 1. – S. 1 – S. 189. Bringing genomes to Life. Abstracts of the 12th European Congress on Biotechnology. August 21–24, 2005. Copenhagen, Denmark.

Тезисы 12-го Европейского конгресса по биотехнологии, состоявшегося 21–24 августа 2005 г. в Копенгагене (Дания). Они объединены под девизом «Приведение генома в жизнь». Тезисы помещены в виде приложения к тому 118 Journal of Biotechnology (2005). См. также: www.elsevier.com/locate/jbiotec.

Рыбалкина М.А. Нанотехнологии для всех. – М.: Nanotechnology News Network, 2005. – 444 с.

Научно-популярная книга по нанотехнологиям. Охвачены все основные направления современных

нанотехнологий с учетом российской действительности и приведением информации ведущего аналитического агентства Nanotechnology News Network.

Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. — М.: Техносфера, 2005. — 256 с.

Аннотация. Книга охватывает широкий круг методов, таких как молекулярная динамика, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ, инфракрасная спектроскопия, просвечивающая и растровая электронная микроскопия, биофизические нанотехнологии, протеомика. Монография насыщена новейшими примерами применения этих методов: дистанционный контроль состояния атмосферы и лесов, определение вредных веществ в окружающей среде, токсичных (и нетоксичных) биоматериалов и агентов (вирусы, бактерии, отдельные молекулы), диагностика болезней, управление качеством в пищевой и фармацевтической промышленности, поиски внеземной жизни, определение мутаций на уровне ДНК, секвенирование ДНК и белков, идентификация белков, изучение конформационных превращений молекул ферментов и выявление роли отдельных аминокислотных остатков и степени гидратации в процессе образования их комплексов с субстратами и в ходе ферментационного катализа, исследования процесса сворачивания молекул белка, белок-белковых взаимодействий и самосборки надмолекулярных комплексов и т.п. Книга будет полезна студентам и преподавателям вузов, медикам и биологам, физикам и химикам, токсикологам, экологам, физиологам, биофизикам, биохимикам.

Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. — М.: Академия, 2005. — 208 с.

В книге изложены и обобщены традиционные и новейшие технологии, основанные на достижениях биохимии, молекулярной и клеточной биологии, рассмотрены социально-экономические проблемы и перспективы развития биотехнологии в третьем тысячелетии.

Для студентов высших педагогических учебных заведений, обучающихся по специальности «Биология».

Smith J.E. Biotechnology. 4th Ed. — Cambridge University Press, 2004. — 284 p.

Разноплановое руководство для студентов, входящее в современный круг проблем общей и частной биотехнологии. В книге 15 глав, в которых обстоятельно изложены актуальные вопросы теории, методологии и практики биотехнологии.

Мелик-Саркисов С.О. Биотехнология в аграрном секторе США: Экономика развития. — М.: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, 2005. — 288 с.

Аннотация. Настоящая монография является первым в отечественной литературе комплексным исследованием вопросов экономического развития биотехнологии в аграрном секторе США. В отдельных разделах книги дан анализ исторического развития, сферы инновационной деятельности, отраслевой организации и особенностей развития рынка агrobiотехнологий США. Показаны наиболее важные факторы и результаты интенсификации сельскохозяйственного производства, роль и функции федеральных и местных контролирующих органов, механизмы их практической реализации. Монография является научно-практическим пособием и предназначена для широкого круга читателей, занятых или интересующихся настоящей проблемой.

Книги по биотехнологии последних лет:

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир, 2002.

Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В.С. Шевелухи. — М.: Высшая школа, 2003. — 469 с.

Антипова Л.В., Глотова И.А., Жаринов А.И. Прикладная биотехнология: УИРС для специальности 270900. — М.: Издательство «ГИОРД», 2003. — 284 с.

Рогов И.А., Антипова Л.В., Шуваева Г.П. Пищевая биотехнология. Книга 1. Основы пищевой биотехнологии. — М.: Изд. «КолосС», 2004. — 440 с.

Максимов Г.В. и др. Использование биотехнологии и геной инженерии. — М.: Издательство «Вузовская книга», 2004. — 208 с.

Современная биотехнология: мифы и реальность. — М., 2004.

Гены, клонирование, происхождение человека / Под ред. Л.И. Корочкина. — М.: Век 2, 2004. — 224 с.

Готовится к изданию:

Basic Biotechnology. 3rd Ed. / Ed. by C. Ratledge, B. Kristiansen. — Cambridge University Press, 2005.

Книга представляет собой третье издание известного руководства по фундаментальным основам биотехнологии. Второе издание было опубликовано в 2001 г. Выпуск третьего издания ожидается в середине 2006 г.

E-PUBS В БИОТЕХНОЛОГИИ:

<http://www.snow.ocad.on.ca/library/ejournals.html>

<http://www.library.ucsb.edu/eresources/epubs/books.html>

<http://faculty.kgi.edu/niemz/REUwebsite/reu/program.htm>

[http://www.axelis.com/index.php?index=news.
inc&hlns=biotechnology.inc](http://www.axelis.com/index.php?index=news.inc&hlns=biotechnology.inc)

[http://bioresearch.ac.uk/nb/
0e7c46db908336c8fa2fcde132ad6f44.html](http://bioresearch.ac.uk/nb/0e7c46db908336c8fa2fcde132ad6f44.html)

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2006 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

14–17 марта 2006 г. в Москве пройдет Международная специализированная выставка «Мир биотехнологии 2006». Информация: тел./факс: (495) 124 56 68; E-mail: bio@biotechworld.ru.

28–30 марта 2006 г. в Москве состоится Международная конференция «Биологические мишени для действия лекарственных препаратов нового поколения. Перспективы интеграции российских ученых в международную кооперацию». Организаторы: Исследовательский институт химического разнообразия, Международный научно-технический центр, ГНЦА, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Справки: Тел.: (495) 995-49-41, доб. 525. E-mail: kb@ihr.ru.

24–27 апреля 2006 г. в Москве состоится VII Международный форум «Высокие технологии XXI века». В работе форума примут участие лидеры основных научных и технологических направлений, ученые и специалисты, известные как у нас в стране, так и за рубежом. В рамках мероприятия будут работать салоны «Нанотехнология», «Робототехника», «Высокотехнологичные товары народного потребления». Свою продукцию на выставку представят более 400 предприятий из 36 регионов России. Среди них необходимо отметить ММПП «Салют», ММЗ «Вымпел», НИИ Vsbcbkbnkmys, комплексов им. М.А. Карцева, НПО «Химавтоматика», РНИИ Космического приборостроения, ФГУП ЦНИИ конструкционных материалов «Прометей», «Интермех» (г. Минск, Беларусь), ГНЦ ВИАМ, корпорацию «Фазотрон-НИИР», КНААПО им. Ю.А. Гагарина, «Аскон», «Содидворкс Р.» и многие другие. В работе Форума принимает участие Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Информация: Тел./факс: (495) 331-05-01; E-mail: vt21@vt21.ru; www.exproecos.com.

1–2 июня 2006 г. в Санкт-Петербурге состоится Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биобезопасности». Организаторы: Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Российское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Российское общество гигиенистов, Национальный союз медико-биологической защиты, Автономная некоммерческая образовательная и просветительская организация «Жизнь без инфекций», Ассоциация врачей-инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Цель конференции — привлечь внимание общественности к проблеме обеспечения биобезопасности и противодействия биотерроризму, а также принятия меморандума-обращения по данному вопросу к главам государств — участников совещания Большой Восьмерки.

Сентябрь 2006 г. — планируется круглый стол в Государственной Думе Федерального Собрания РФ по вопросам совершенствования существующего законодательства в области биоразнообразия и генетических ресурсов.

24–26 октября 2006 г. в Москве состоится Четвертый съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. В рамках съезда будет проведена научно-практическая конференция, на которой будут обсуждены проблемы фундаментальной и прикладной биотехнологии. Будут обсуждены также перспективные проекты, включенные в национальную программу развития биотехнологии на ближайшие 10 лет. В соответствии с Уставом Общества будет заслушан отчет Центрального Правления ОБР за 3 года. Информация: тел.: 8-916-640-76-18; E-mail: obr@biorosinfo.ru; <http://www.biorosinfo.ru>.

28 ноября – 1 декабря 2006 г. в г. Москва — Пушкино пройдет Международная школа-конференция по генетике микроорганизмов и биотехнологии, посвященная 100-летию со дня рождения профессора С.И. Алиханяна. Организаторы: Государственный научный центр РФ «ГосНИИГенетика» совместно с Обществом биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. <http://www.genetika.ru/conference/index.htm>.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются краткие сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адрес для переписки и факсимильной и электронной связи).
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12 — 14 стр. (в среднем 22000 знаков без пробела), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20 — 24 стр. (в среднем 40000 знаков без пробела), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

-
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
 8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
 9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
 10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
 11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
 12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию. Подписка на журнал в течение 2005–2006 гг. проводиться не будет.

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом РФ.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Ежегодно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 50 регионах России и объединяет свыше 1000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и Фондом развития биотехнологии.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9

Тел.: 8-916-640-76-18

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru