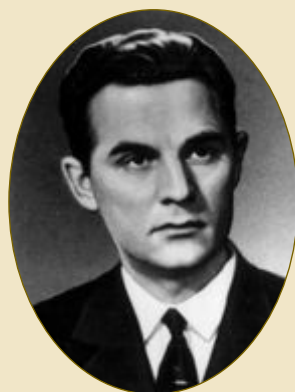


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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



**Т. 3, № 3**

**2007**

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

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2007, Т. 3, № 3

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

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василев

**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), М.С. Вонский (Санкт-Петербург),  
В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск), В.В. Зверев (Москва),  
А.И. Иваненко (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),  
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),  
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пушино), Е.Н. Орешкин (Москва),  
А.Н. Панин (Москва), Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва),  
К.Г. Скрябин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),  
В.И. Швець (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.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91  
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.: 8-926-470-22-00  
E-mail: raifvasilov@mail.ru

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

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем, 2007.

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Васильев* ..... 4

**Оригинальные статьи**

Каллусообразование и морфогенез у *Taraxacum officinale* Weber в культуре in vitro.

*А.В. Князев, А.В. Чемерис, В.А. Вахитов* ..... 5

Клональное микроразмножение и индукция каллусообразования олеандра (*Nerium oleander* L.) in vitro.

*Н.А. Ованесян* ..... 10

Биопрепарат для культивирования безвирусного картофеля.

*Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова, Э.А. Рафаилова, Ф.К. Алимова* ..... 18

Использование *Trichoderma* в процессе переработки отходов спиртового производства.

*Ф.К. Алимова, Е.В. Скворцов, Т.А. Мельникова, Р.И. Тухбатова, Д.И. Тазетдинова* ..... 22

Аффинное выделение связывающих инсулин сывороточных гликопротеидов человека и изучение их состава в норме и при сахарном диабете первого типа.

*М.И. Гарипова, Н.А. Киреева, Т.В. Моругова, О.Н. Елисеева, А.С. Першина* ..... 27

Хоминг-эндонуклеаза SegB бактериофага T4: биохимические свойства. *В.С. Брок-Волчанская* ..... 33

Бактериоферритин как биосенсор и наноструктура.

*С.С. Антипов, К.В. Курганов, К.С. Чемерис, О.Н. Озолинь* ..... 40

**Краткие сообщения**

Исследование подавления экспрессии бактериальных генов синтеза фитогормонов при агробактериальном заражении растений. *В.В. Алексеева, Е.Б. Рукавицova, Ю.С. Голубчикова, Я.И. Бурьянов* ..... 45

Аналитические и препаративные системы на основе ультразвуковых полей.

*Н.Н. Князьков, В.Е. Курочкин, Е.Д. Макарова, Т.Н. Пашовкин, Г.В. Шильников, А.И. Духин* ..... 46

Высокочувствительный метод определения тетрациклинов в биосубстратах.

*А.А. Комаров, Е.А. Пономарева, Е.С. Вылегжанина* ..... 48

Функциональные свойства иммобилизованных тетрамеров и субъединиц лактатдегидрогеназы в условиях

генерации синглетного молекулярного кислорода. *В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, Н.В. Агешева* ..... 49

Применение метода ПЦР в реальном времени для определения остаточных количеств ДНК клетки-хозяина

в фармацевтических субстанциях. *М.Ю. Скоблов, Ю.С. Скоблов, Е.Д. Шибанова, Д.И. Баирамашвили* ... 51

Твердофазная ферментация антагонистически активного штамма 19/97M *Streptomyces lateritius*. *Г.А. Сизых* .. 52

**Обзоры**

Перспективы развития производства биотоплива в России. Сообщение 3: биогаз.

*Р.Г. Васильев* ..... 54

**Страницы истории**

К 80-летию со дня рождения Маршалла Ниренберга: его вклад в разгадку триплетного кода

наследственности. *О.В. Воробьева, В.С. Воробьев* ..... 62

Юбилейные и знаменательные даты 2007 года ..... 68

**Хроника**

События второй половины 2007 года ..... 74

**Правила для авторов** ..... 79

**CONTENTS**

**Column of the editor-in-chief**

To readers. *R.G. Vasilov* .....4

**Original articles**

Callusogenesis and morphogenesis of *Taraxacum officinale* Weber in vitro culture.

*A.V. Knyazev, A.V. Chemeris, V.A. Vakhitov* ..... 5

Clonal micropropagation and an induction of the callus formation in oleander (*Nerium oleander* L.) in vitro.

*N.A. Ovanesyana*..... 10

Biopreparation for culture of non-virus potato.

*D.I. Tazetdinova, R.I. Tukhbatova, E.A. Rafailova, F.K. Alimova* ..... 18

The use of *Trichoderma* in the processing of alcohol production's waste.

*F.K. Alimova, E.V. Skvortsov, T.A. Melnikova, R.I. Tukhbatova, D.I. Tazetdinova* ..... 22

Human insulin-binding serum glycoprotein affinity preparation and investigation of its diversity in diabetic

and normal sera. *M.I. Garipova, N.A. Kireeva, T.V. Morugova, O.N. Eliseeva, A.S. Pershina,* ..... 27

Homing endonuclease SegB of bacteriophage T4: biochemical properties.

*V.S. Brok-Volchanskaya* ..... 33

Bacterioferritin as a biosensor and nanostructure.

*S.S. Antipov, K.V. Kurganov, K.S. Chemeris, O.N. Osolin*..... 40

**Short communications**

Study of suppression of bacterial genes synthesis phytohormones under agribacterial contamination in plants.

*V.V. Alekseeva, E.B. Rukavtsova, Yu.S. Golubchikova, Ya.I. Burianov* ..... 45

Analytical and preparative systems on the base of ultra sound devices.

*N.N. Knyazkov, V.E. Kurochkin, E.D. Makarova, T.N. Pashovkin, G.V. Shilnikov, A.I. Dukhin* ..... 46

High-sensitivity method of definition of the tetracyclins in biosubstrates.

*A.A. Komarov, E.A. Ponomareva, E.S. Vylegjanina* ..... 48

Functional properties of immobilized tetramers and subunits of lactate dehydrogenase in conditions of generation of

singlet molecular oxygen. *V.G. Artyukhov, M.A. Nakvasina, N.V. Agisheva* ..... 49

Application of real-time PCR to determine the quantity of residual DNA in the host cells of pharmaceutical

substances. *M.Yu. Skoblov, Yu.S. Skoblov, E.D. Shibanova, D.I. Bairamashvili* ..... 51

Solid fermentation of antagonistically active strain 19/97 M *Streptomyces lateritius*. *G.A. Sizykh* ..... 52

**Reviews**

Perspectives of development of biofuel production in Russia. The report 3: a biogas. *R.G. Vasilov* ..... 54

**Pages of history**

To Marshall Nirenberg's 80<sup>th</sup> birthday. His contribution to deciphering of the triplet code of heredity.

*O.V. Vorobyeva, V.S. Vorobyev*..... 62

Anniversary and significant dates 2007 ..... 68

**The chronicle**

Events of the second half-year 2007 ..... 74

**Rules for authors** ..... 79

## К читателям

В третьем номере 2007 г. сгруппирован ряд работ по биотехнологии растений. Надо сказать, что в России существуют научные школы, развивающие данное направление. Кроме Санкт-Петербурга, откуда уже поступали в наш журнал статьи по этому вопросу, активно работают специалисты в Уфе и Казани, которые представили в печать свои материалы. Очень интересную статью по указанной тематике прислали из Еревана, в которой исследовалась проблема культивирования каллусов олеандра с целью изучить этот объект применительно к последующим задачам поиска эффективных средств лечения рака.

Помещена также статья группы авторов из Башкирского университета, в которой исследованы транспортные белки в сыворотке человека, имеющие отношение к патогенезу инсулин-зависимого диабета.

Печатается работа сотрудников д.б.н. Ф.К. Алимовой и коллег из других учреждений г. Казани, посвященная биотехнологическим аспектам спиртового производства и получения дрожжевого кормового белка.

Очень важные две статьи представлены из Пушкино: О.Н. Озолин с соавторами из Института биофизики клетки РАН — о бактериоферритине и В.С. Брок-Волчанской из ИБФМ — о хоминг-эндонуклеазе SegV бактериофага T4. Последняя статья является прекрасным подарком к 70-летию руководителя учреждения — члена-корреспондента РАН Александра Михайловича Боронина, о котором в журнале помещен соответствующий юбилейный очерк. Аналогичная информация приведена и в связи с 70-летием со дня рождения директора Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Публикацией по биогазу завершается цикл обзорных статей о перспективах развития биотоплива в России.

По традиции подготовлен раздел юбилейных и знаменательных дат в физико-химической биологии и биотехнологии. Редколлегия откликнулась на 80-летие со дня рождения ныне здравствующего лауреата Нобелевской премии, первооткрывателя генетического кода М.У. Ниренберга. В связи со столетием со дня смерти Д.И. Менделеева дан материал из его публицистического произведения «Заветные мысли» о философских позициях ученого — статья «Мировоззрение».

Есть в номере и печальные страницы — некролог памяти скоропостижно скончавшегося в августе с.г. члена редколлегии нашего журнала Юрия Викторовича Махотина, который способствовал его становлению и развитию. Мы все скорбим об этой утрате.

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

## КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЕ И МОРФОГЕНЕЗ У *TARAXACUM OFFICINALE* WEBER В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.В. КНЯЗЕВ \*, А.В. ЧЕМЕРИС, В.А. ВАХИТОВ

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа*

Регенерация растений одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* Weber была осуществлена в культуре in vitro. Сегменты листовой пластинки и черешков были взяты от растений 3-месячного возраста и культивировались на среде В5, содержащей БАП с различными ауксинами (НУК, 2,4-D). Максимальная частота регенерации была получена на питательных средах, содержащих 1 мг/л (4,4 мкМ) БАП и 0,1 мг/л (0,5 мкМ) НУК. Хорошо развитые и укорененные растения-регенеранты успешно адаптировались к естественным условиям окружающей среды.

*Ключевые слова:* *Taraxacum officinale*, каллус, регенерация, культура тканей, in vitro.

Одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Weber) из семейства *Asteraceae* — всем известное растение, которое имеет широкое повсеместное распространение. Растения рода *Taraxacum* культивируют в некоторых странах Западной Европы, Азии, США и Китая для использования в качестве лекарственного средства и в пищевой промышленности. В лечебных целях высушенный или свежий экстракт корня одуванчика используют как тонизирующее и желчегонное средство, детоксикатор, диуретик, для облегчения ревматических болей и как противовоспалительное средство [1, 2, 3, 4]. Тритерпеноиды, полученные из корней одуванчика (таракастерол и тараксерол), обладают сильной противоопухолевой активностью [5].

Метаболическая инженерия путей биосинтеза вторичных метаболитов стала областью интереса биотехнологов в течение последнего десятилетия. Развитие методов интродукции чужеродных генов в растения привело к значительному прогрессу в области метаболической инженерии вторичных метаболитов растений. Наличие возможности внесения изменений в биосинтез вторичных метаболитов — путь к усилению их продукции.

Генетическая трансформация *Taraxacum* может быть полезна как метод для получения ценных вторичных метаболитов.

Одним из обязательных требований к системе переноса генов для получения трансгенных растений является наличие подходящей целевой ткани, содержащей клетки, компетентные для трансформации, и одновременно обладающей высокой способностью к регенерации адвентивных проростков. Работ по получению регенерации адвентивных проростков in vitro из эксплантов *Taraxacum officinale* мало. Booth & Satchuthananthavale [6] еще в 1974 году изучали влияние ряда фитогормонов (кинелина, ИУК, гибберелина) на регенерацию проростков и корней из корневых черенков у *T. officinale*. В. Bowes [7, 8] смог получить каллус *T. officinale* из эксплантов корней с аномальными проростками, но при этом количество проростков было очень незначительным. Lee et al. [9] исследовали влияние ауксинов и цитокининов на формирование адвентивных проростков у эксплантов семян *Taraxacum platycarpum*. Работы по получению адвентивного органогенеза из листовых эксплантов *Taraxacum officinale*, по нашим данным, отсутствуют.

Таким образом, целью данной работы является изучение возможностей получения адвентивного органогенеза и культивирования растений одуванчика in vitro в качестве основы для дальнейших экспериментов по опосредованной *Agrobacterium* генетической трансформации данного растения.

### Материалы и методы исследования

Семена растений одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Weber) естественной диплоидной популяции были собраны на территории Института био-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Князев Алексей Викторович,

кандидат сельскохозяйственных наук,

старший научный сотрудник Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра РАН,

450054 Уфа, проспект Октября, 71

Тел./факс: (347) 235-60-88

E-mail: knyazev@anrb.ru

химии и генетики УНЦ РАН. Для улучшения всхожести их стратифицировали, выдерживая 1,5–2 месяца при температуре около 4 °С. В опытах использовали тепличные растения 3-месячного возраста, растущие в горшках, заполненных смесью (1:1) почвы и вермикулита.

В качестве эксплантов использовали проксимальную часть листовых пластинок и черешки. Отрезанную листовую пластинку или черешок листа промывали в дистиллированной воде, разрезали на части и стерилизовали в 10% растворе отбеливателя с добавлением нескольких капель Tween 20 в течение 15 минут с периодическим перемешиванием, а затем ополаскивали 5 раз стерильной дистиллированной водой и разрезали на части размером 5×5 мм, а черешки — 5–7 мм длиной. Экспланты помещали на питательные среды в чашки Петри. В опытах использовали питательные среды В5 [10] и MS [11] с добавлением витаминов — среда В5. В среды добавляли цитокинин (БАП) и ауксины (НУК, 2,4-Д, ИУК) в различных концентрациях. Культивирование проводили в климатической камере KBW 240 (Binder) при температуре  $25 \pm 2$  °С, 16 ч фотопериоде и световой интенсивности 2–3 тыс. люкс (белые флуоресцентные лампы).

После культивирования эксплантов в течение 4 недель учитывали регенерационную способность эксплантов (отношение эксплантов, образующих регенеранты, к их общему числу, в процентах).

Средние значения определяли для каждого эксперимента отдельно, затем определяли средние значения для всех экспериментов. В каждом опыте для определения регенерационной способности эксплантов использовали 3–4 чашки Петри (по 8–10 эксплантов в каждой). В таблицах приведены средние из двух опытов и их стандартные ошибки.

### Результаты и их обсуждение

Через две недели культивирования в темноте эксплантов листовой пластинки и черешков на средах MS и В5 с добавлением 2 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП наблюдали образование слегка коричневатого рыхлого каллуса практически на всех эксплантах (рис. 1). Однако уже по прошествии 7–10 дней от начала культивирования происходило постепенное потемнение сред в результате выделения экссудатов. При дальнейшем пассивировании эксплантов с каллусами на свежие среды выделение экссудатов в среду продолжалось, и рост каллуса после двух пассажей постепенно прекращался. Культивирование каллусов, полученных из обоих типов эксплантов, при

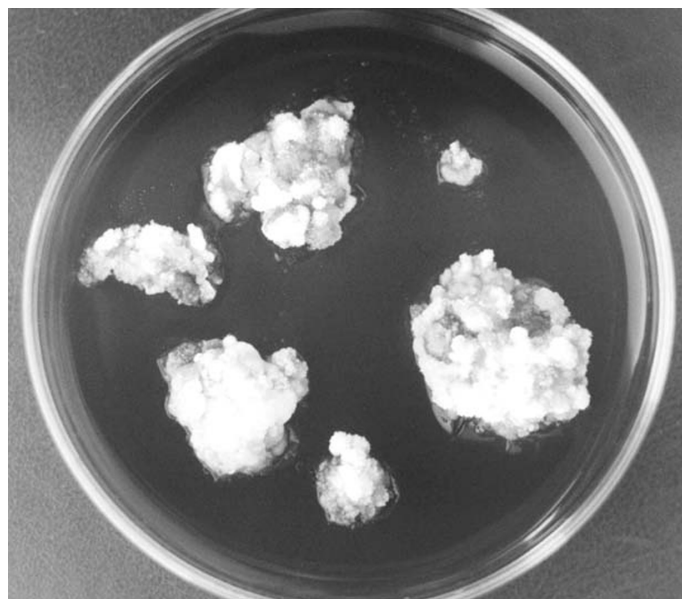


Рис. 1. Калусообразование на эксплантах листовых пластинок через 4 недели культивирования на среде В5

слабом освещении уменьшало потемнение сред и улучшало рост каллусов. На средах с добавлением в качестве ауксина 2,4-Д (2 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП) также наблюдался калусогенез, однако полученный каллус отличался очень слабой жизнеспособностью и погибал уже после второго пассажа.

**Таблица 1**  
Влияние типа экспланта и концентрации регуляторов роста в среде В5 на частоту регенерации побегов *Taraxacum officinale* (% органогенных эксплантов)

Тип экспланта	Содержание регуляторов роста, мг/л		Частота регенерации, %
	БАП	НУК	
Листовая пластинка	1,0	0,1	95±5
	0,5	0,1	72±15
	0,3	0,03	27±7
Черешок	1,0	0,1	90±6
	0,5	0,1	44±11
	0,3	0,03	89±11

После культивирования в течение 2 недель эксплантов листовой пластинки и черешков на средах, содержащих 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК, на них появлялся первичный каллус, на котором можно было наблюдать постепенное появление меристематических зон. В дальнейшем начинался органогенез на 95±5 и 90±6% эксплантов, соответственно (табл.1, рис. 2).

Первичный каллус и почки появлялись, как правило, в области листовых жилок. Как и в случае каллусогенеза, в результате выделения экссудатов среда MS быстро темнела и становилась токсичной для проростков-регенерантов. Использование среды В5, а также частое пассивирование эксплантов на свежие среды давали лучшие результаты: выделение экссудатов было значительно слабее. Кроме того, этот процесс был менее выражен при интенсивном освещении. Культивирование эксплантов листьев на питательных средах с пониженными концентрациями цитокинина и ауксина приводило к снижению числа органогенных эксплантов (см. табл. 1).



Рис. 2. Адвентивный органогенез на регенерационной среде через 4 недели культивирования

Культивирование эксплантов листовой пластинки и черешков на питательных средах с увеличенным содержанием экзогенных регуляторов роста (2 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК) через 3–4 недели также приводило к органогенезу практически на 100% эксплантов, но полученные растения-регенеранты оказывались полностью гидратированными, и дальнейшего их развития не наблюдалось. При последующих перемещениях их на питательные среды того же состава рост полученных витрифицированных растений-регенерантов полностью прекращался, и они погибали.

Таким образом, можно считать средой, подходящей для инициации органогенеза из эксплантов листовой пластинки и черешков одуванчика, среду В5 с добавле-

нием 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК. При этом необходим частый перенос эксплантов с появляющимися побегами на свежие среды.

Все полученные в опытах регенеранты пересаживали на среду для укоренения. В качестве таковой была взята среда В5, содержащая только ауксин (ИУК или НУК). Перенос полученных растений-регенерантов на среду В5 с различными концентрациями ИУК (0,2–0,8 мг/л) приводил лишь к дальнейшей усиленной пролиферации листьев, но не к ризогенезу. Поэтому получаемые регенеранты в дальнейшем переносили на среду В5, содержащую НУК в различных концентрациях (0,2–1,0 мг/л). Ризогенез наблюдали обычно через 2–3 недели после пересадки (рис. 3). Оптимальной оказалась концентрация НУК в среде около 0,8–1,0 мг/л (табл. 2.). В дальнейшем полученные укорененные растения пересаживались в смесь почвы и вермикулита (1:1) и культивировали сначала при высокой влажности, а затем ее постепенно снижали. Фенотипических отклонений у растений, полученных в культуре *in vitro*, не выявлено (рис. 4).



Рис. 3. Ризогенез растения-регенеранта через две недели культивирования на среде В5 с добавлением НУК



Таблица 2

**Влияние концентрации НУК в среде В5 на частоту укоренения растений-регенерантов *Taraxacum officinale* Weber после 3 недель культивирования**

Ауксин	Концентрация, мг/л	Частота укоренения, %
ИУК	0,2	отсутствует (10)
	0,6	отсутствует (13)
	0,8	отсутствует (14)
	-	-
НУК	0,2	40 (10)
	0,6	60 (12)
	0,8	92 (15)
	1,0	83 (12)

*Примечание:* в скобках — общее число регенерантов на вариант

Мы полагаем, что методику регенерации адвентивных проростков у *Taraxacum officinale* Weber из эксплантов листовых пластинок и черешков, о которой сообщается в этой статье, можно применять при опосредованной *Agrobacterium* трансформации этого растения, так как листья часто используются в качестве эксплантов при получении трансформированных растений. Эта методика достаточно эффективна и воспроизводима, и поэтому мы намерены использовать ее в дальнейших экспериментах по опосредованной *Agrobacterium* генетической трансформации этого растения.

### Заключение

1. Изучение возможности получения прямого морфогенеза из эксплантов листовых пластинок и черешков *Taraxacum officinale* Weber в зависимости от состава сред и концентрации регуляторов роста показало, что оба типа эксплантов обладают достаточно высокой способностью к регенерации адвентивных проростков *in vitro*.

2. Выявлено, что средой, подходящей для регенерации почек из эксплантов листовых пластинок и черешков, является среда В5 с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,1 мг/л НУК.

3. Найдено, что ризогенез легко индуцируется после переноса полученных регенерантов на среду В5 с добавлением 0,8–1,0 мг/л НУК.



Рис. 4. Регенерировавшее растение *Taraxacum officinale* после переноса в почвенную смесь

Проведение данной работы частично финансировалось за счет средств гранта НШ-1003.2006.4 Программы поддержки ведущих научных школ Российской Федерации.

### Литература

1. Yang D.S., Whang W.K., Kim I.H. The constituents of *Taraxacum hallaisanensis* roots // Arch. Pharmacol. Res. — 1996. — Vol. 19. — P. 507–513.
2. Ahmad V.U., Yasmeen S., Ali Z., Khan M.A., Choudhary M.I., Akhtar F., Miana G.A., Zahid M. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii* // J. Nat. Prod. — 2000. — Vol. 63. — P. 1010–1011.
3. Choi J.H., Shin K.M., Kim N.Y., Lee Y.S., Kim H.J., Park H.J., Lee K.T. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum* Nakai, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells // Biol. Pharm. Bull. — 2002. — Vol. 25. — P. 1446–1450.
4. Yun S.I., Cho H.R., Choi H.S. Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum* // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2002. — Vol. 66. — P. 1859–1864.

5. Takasaki M., Konoshima T., Tokuda H., Masuda K., Arai Y., Shiojima K., Ageta H. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II // Biol. Pharm. Bull. – 1999. – Vol. 22. – P. 606–610.
6. Booth A., Satchuthananthavale R. Regeneration in root cuttings in *Taraxacum officinale*. 2. Effects of exogenous hormones on root segments and root callus cultures // New Phytol. – 1974. – Vol. 73. – P. 453–460.
7. Bowes B.G. Preliminary observations on organogenesis in *Taraxacum officinale* tissue cultures // Protoplasma. – 1970. – Vol. 71. – P. 197–202.
8. Bowes B.G. The occurrence of shoot teratomata in tissue cultures of *Taraxacum officinale* // Planta. – 1971. – Vol. 100. – P. 272–276.
9. Lee M.H., Yoon E.S., Jung S.J., Bae K.H., Seo J.W., Choi Y.E. Plant regeneration and effect of auxin and cytokinin on adventitious shoot formation from seedling explant of *Taraxacum platycarpum* // Korean J. Plant Biotech. – 2002. – Vol. 29. – P. 111–115.
10. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50. – P. 151–158.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

Список сокращений

НУК – нафтилуксусная кислота;

БАП – 6-бензиламинопурин;

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксисуксусная кислота;

ИУК – индолилуксусная кислота.

## CALLUSOGENESIS AND MORPHOGENESIS OF *TARAXACUM OFFICINALE* WEBER IN VITRO CULTURE

A.V. KNYAZEVA, A.V. CHEMERIS, V.A. VAKHITOV

*Institute of Biochemistry and Genetics RAS, Ufa*

Regeneration of whole plants of dandelion *Taraxacum officinale* Weber was achieved by organogenesis using leaf and petiole explants. Leaf and petiole segments were taken from 3-month old plants and cultured on B5 basal medium containing BA with different auxins (NAA, 2,4-D). The highest values for regeneration were obtained with 1 mg/l (4.4  $\mu$ M) BA and 0.1 mg/l (0.5  $\mu$ M) NAA. Well developed and extensively rooted plantlets were acclimatized to natural environmental conditions.

*Keywords:* *Taraxacum officinale*, callus, regeneration, tissue culture, in vitro.

## КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСО-ОБРАЗОВАНИЯ ОЛЕАНДРА (*NERIUM OLEANDER L.*) IN VITRO

Н.А. ОВАНЕСЯН\*

Биологический факультет Ереванского государственного университета, Ереван, Армения

В настоящей работе изучена возможность получения стабильно растущей каллусной культуры и клонального микро-размножения олеандра в условиях *in vitro*. Изучены ростовые показатели каллусной культуры олеандра. Показано, что индекс роста полученной каллусной ткани на модифицированной среде МС 24 в экспоненциальной фазе роста составляет  $11,4 \pm 0,3$ , а митотический индекс —  $0,17\%$ . Выявлено, что наибольшая выживаемость клеток приходится на экспоненциальную фазу роста и составляет  $75,97\%$ . Обсуждается возможность применения изолированной культуры олеандра как альтернативного источника хемотерапевтических агентов, сходных с известным препаратом Anvirzel.

**Ключевые слова:** каллусная культура, олеандр, *Nerium oleander*, клональное микроразмножение, индекс роста, митотический индекс, выживаемость клеток.

### Введение

В настоящее время клеточная биотехнология представляет значительный интерес в области поиска и получения новых биологически активных соединений. Подобно нативным растениям клеточные культуры синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов, таких как сердечные гликозиды, алкалоиды, сапонины, экдистероиды и т.д. Культура растительных клеток, имея ряд преимуществ перед традиционным сырьем (отсутствие организменного контроля, независимость от климатических условий, возможность оптимизации и стандартизации процессов, гомогенность системы), служит удобной модельной системой для изучения структуры, биосинтеза и биологической активности целевых метаболитов. Кроме того, культуры клеток и тканей в перспективе могут иметь практическое значение для промышленного получения физиологически активных вторичных метаболитов.

Среди большого разнообразия фармакологических средств растительного происхождения особое место занимают препараты, полученные из олеандра (*Nerium oleander L.*). Его липидные и водные экстракты применяются для лечения таких заболеваний, как астма, экзема, псориаз, эпилепсия, герпес, малярия, а сейчас также новообразований (Manna S.K. et al., 2000; McConkey D.J. et al., 2000; Duke J.A., 1985; Муравьева Д.А., 1981). Водные экстракты олеандра, запатентованные как Anvirzel (Ozel H.Z., 2000), обнаружили цитотоксическую активность по отношению к раковым клеткам *in vitro*, что предположительно обусловлено действием цитотоксических метаболитов растения, в частности, сердечным гликозидом олеандрином. Нами была изучена цитотоксическая и про-апоптозная активность водных экстрактов полученной нами каллусной культуры *Nerium oleander* (Ованесян Н.А. и др., 2007).

Интактное растение олеандра является гипераккумулятором тяжелых металлов, и введение олеандра в изолированную культуру имеет немаловажное значение для дальнейшего получения экологически чистых, соответствующих требованиям ВОЗ (WHO — World health organization, 1999) лекарственных препаратов (Mingorance M.D., 2006; Rossini S.O., 2006).

Настоящая работа посвящена получению и клональному микроразмножению растения олеандра *in vitro*, индукции стабильно растущей каллусной культуры, изучению ее динамики роста с целью дальнейшей оп-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Ованесян Нелли Александровна,  
научный сотрудник кафедры экологии и охраны природы  
биологического факультета Ереванского государственного  
университета

0025 Армения, Ереван, ул. Алека Манукяна, 1

Тел: (+37410) 57 21 19

Моб: (+37493) 30 82 18

Fax: (+37410) 55 46 41

E-mail: bionelli@bk.ru, bionellibiotech@yahoo.com

тимизации питательных сред и увеличения биосинтеза целевых биологически активных соединений.

## Материалы и методы

Введение в культуру *in vitro* проводили по общепринятой методике (Бутенко Р.Г., 1986; Dixon R. et al., 1996). Для получения стерильных проростков олеандра использовали пазушные и верхушечные почки вегетативного растения. Экспланты (пазушные и верхушечные почки) предварительно обрабатывали 70° этанолом в течение 60 секунд, затем стерилизовали диацидом (0,1% раствор этанолртути хлорида и цетилпиридиний хлорида) в течение 15–20 минут с последующей трехкратной промывкой стерильной водой. Для получения стерильных проростков из пазушных и верхушечных почек растения *Nerium oleander* были использованы:

1. Среда Мурасиге и Скуга (МС) (Калинин Г.Л. и др., 1980).
2. Модифицированная нами среда МС, содержащая бензиламинопуридин (БАП) – 0,5 мг/л и индолуксусную кислоту (ИУК) – 0,1 мг/л и условно обозначенная МС N2.
3. Модифицированная нами среда МС с исключением гормонов и половинным содержанием остальных компонентов, условно обозначенная 1/2МС.

Обработанные почки в асептических условиях помещали на вышеописанные агаризованные питательные среды.

Полученные асептические проростки микроклонально размножали посредством черенкования, для чего была использована жидкая среда 1/2МС. Мериклоны олеандра культивировали в климатической камере при освещении 1000 люкс, влажности 60–70%, температуре  $26 \pm 2$  °С.

Для инициации роста первичных каллусных тканей были использованы:

1. Среда Мурасиге и Скуга (МС);
2. Среда Гамборга и Эвелега (В5);
3. Среда Шенка и Хильдебранта (Калинин Г.Л. и др., 1980).;
4. 16 вариантов модифицированных нами сред МС, отличающихся от обычной МС содержанием дрожжевого экстракта – 50 мг/л, гидролизата казеина 100 мг/л, а также сочетанием и содержанием ауксинов (дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), ИУК) и цитокининов (БАП, кинетин).

Молодые листочки, верхушки побегов стерильных проростков использовали для получения каллусной

ткани. На агаризованные питательные среды асептически помещали кусочки листьев с раневыми поверхностями, на которых образовывался первичный каллус. Его отделяли и переносили в 100 мл конические колбы с 40 мл агаризованной питательной среды и выращивали в темноте при температуре 26–28 °С. Для дальнейшего роста каллусных тканей была использована модифицированная нами среда МС, содержащая гормоны: 2,4-Д – 1,0 мг/л, кинетин – 1,0 мг/л, и условно обозначенная N24.

Каллусную ткань поддерживали в культуре, периодически пересаживая ее фрагменты на свежую питательную среду. Пассирование проводили через 20 дней.

Для характеристики ростовой активности определялись: сырая и сухая массы ткани в г, индекс роста, митотический индекс, жизнеспособность клеток. Для определения сырой и сухой массы каллусы отделяли от питательной среды и взвешивали до и после высушивания при температуре 60 °С до постоянной массы. Индекс роста рассчитывали по отношению веса полученной сырой биомассы к первоначальному весу (Березнеговская Л.Н. и др., 1975; Dixon R. et al., 1996).

Для определения митотического индекса отбирали каллусную ткань олеандра в экспоненциальной фазе роста. Каллусные ткани фиксировали согласно методике Карнуа в смеси этанол – ледяная уксусная кислота (3:1) (Паушева Э.П., 1980). Для приготовления давленных препаратов ткань предварительно мацерировали 1 N раствором HCl и окрашивали ацетокармином в течение 12–16 часов, после чего переносили на чистое предметное стекло в каплю 45%-ного раствора уксусной кислоты и помещали под покровное стекло. Микроскопирование проводили при увеличении в 200 раз.

Жизнеспособность клеток определяли по стандартной методике, разработанной для каллусных тканей, после окрашивания 0,1%-ным раствором эозина. Живыми считали клетки, цитоплазма которых не прокрашивалась в течение 2 мин. (Паушева Э.П., 1980).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по программе Excel.

## Результаты и обсуждение

Как показали полученные результаты, на среде МС с обычным гормональным составом, в условиях освещения пазушные и верхушечные почки интактного растения пробуждались быстро, давая начало новым

проросткам с мелкими листочками. У сформированных побегов расстояния между междоузлиями были велики, и проростки за 20 дней достигали высоты 4–5 см (рис. 1).



Рис. 1. Асептические проростки олеандра на среде МС

Рост растений происходил в основном за счет увеличения расстояния между междоузлиями. На среде МС проростки укоренялись, однако корневая система оказывалась слабо развитой (табл. 1). Полученные нами результаты коррелируют с данными литературы, в которых на примере яблони, герберы, земляники и других растений приводятся данные о том, что наличие в среде цитокининов тормозит корнеобразование (Хасси Г., 1987).

На модифицированной нами среде МС-2 пазушные почки также пробуждались быстро. Образовавшиеся побеги с мелкими листочками были укорочены (1–1,5 см) и разветвлены. Такой характер роста объясняется повышенным содержанием в среде цитокининов, которые снимают апикальное доминирование и стимулируют развитие пазушных почек (Атанасов А.И., 1993) (Табл. 2). Наши результаты сходны с результатами, полученными во многих других лабораториях. Так, было показано, что введение в питательную среду кинетина в концентрации 46,2 мкМ индуцировало максимальную пролиферацию пазушных почек побега герберы (Бутенко Р.Г., 1999; Катаева Н.В. и др., 1983). На этой среде корневая система была очень слабо развита.

Как видно из таблиц 1 и 2, на половинной среде  $\frac{1}{2}$  МС пазушные почки не пробуждались, однако наблюдалось интенсивное корнеобразование и укоренение черенков, выращенных на средах МС и МС-2. На половинной среде  $\frac{1}{2}$  МС увеличивались размеры листьев и формировались нормальные растения олеандра (рис. 2).

Эти результаты противоречат общепринятой модели Скуга и Миллера о закономерностях регуляции микроразмножения растений, согласно которой образование побегов стимулируется при наличии преобладающих концентраций цитокинина по отношению к ауксину, тогда как обратное соотношение способствует корнеобразованию (Skoog F. et al., 1957). В нашем случае побеги образовывались в условиях как преобладания ауксинов, так и цитокининов, а интенсивное корнеобразование происходило на безгормональной среде. Полученные нами результаты можно объяснить, основываясь на наблюдениях Уолкера и др. (Walker K.A. et al., 1972), которые показали, что предварительное культивирование каллуса

Таблица 1

**Влияние гормонального и минерального состава питательной среды МС на пробуждение почек и рост черенков *N. oleander***

Первичные экспланты	Число эксплантов	Время пробуждения почек (дни)	Количество пробудившихся почек (%)	Расстояние между междоузлиями к концу пассажа (см)	Среднее число корней у проростков	Гормоны (мг/л)
Пазушные и верхушечные почки	57	19	76	4–5	7,33	МС (2ИУК+0,2 кинетин)
		15	81	1–1,5	1,12	МС-2 (0,5 БАП + 0,1 ИУК)
		25	2	0	0	$\frac{1}{2}$ МС (0)

**Влияние гормонального и минерального состава питательной среды исследованных вариантов МС на корнеобразование черенков *N. oleander***

Вариант среды	Среднее число корней	Средняя длина корней (мм)	Средняя длина между междоузлиями мериклонов (см)
МС	6,22	9,34	3,5–4
МС-2	1,31	7,25	0,5–1
1/2 МС	13,65	14,2	2–2,5

люцерны (*Medicago sativa*) на среде с высоким уровнем ауксина стимулирует дифференцировку побегов даже при последующем содержании тканей на среде без фитогормонов. Возможно, проявившаяся в наших экспериментах способность черенков к корнеобразованию и росту на среде без гормонов обусловлена именно подобным эффектом «последствия» гормонов при предварительном культивировании растений на полной среде.

Таким образом, для индукции и пробуждения стерильных почек олеандра оптимальной является среда МС, а для клонального микроразмножения полученных черенков — безгормональная жидкая среда 1/2 МС с половинным составом остальных компонентов.

Как было описано выше, эксплантами для получения изолированной культуры исследуемого нами растения служили молодые листочки, верхушки побегов стерильных проростков с раневыми поверхностями, которые асептически помещали на агаризованные питательные среды.

Первые признаки каллусообразования у эксплантов при росте на средах Шенка и Хильдебранта и модифицированной нами среде МС 24 наблюдались на 10–13-е сутки культивирования (рис. 3). Каллусообразование на средах Шенка и Хильдебранта и МС 24 происходило намного быстрее (10–13 дней), чем на среде МС (20–22 дней). Образовавшиеся на среде Шенка и Хильдебранта каллусы были сероватого цвета и имели

рыхлую консистенцию, а на среде МС 24 каллусы были твердыми, зернистой консистенции, легко распадались на отдельные крупные куски и имели бежевый цвет.

При культивировании на среде Гамборга и Эвелега каллусная ткань появлялась только через 25–27 дней на поврежденных участках эксплантов в виде тонкого налета. Эта ткань быстро бурела и погибала. Полученные нами результаты свидетельствуют о непригодности среды Гамборга и Эвелега для индукции каллусообразования у *Nerium oleander* (табл. 3). Как известно, индукция каллусообразования или регенерации растений при культивировании изолированных тканей *in vitro* зависит от взаимодействия таких факторов, как генотип исследуемого объекта, состав питательной среды и тип экспланта. Из химических индукторов, способствующих каллусообразованию, наиболее известны и изучены фитогормоны и углеводы.

Среда Шенка и Хильдебранта отличается высоким содержанием мезо-инозита (1000 мг/л) и сахарозы (30 г/л). Модифицированная нами среда МС 24, кроме мезо-инозита (80 мг/л) и сахарозы (30 г/л), содержит также гидролизат казеина 100 г/л и дрожжевой экстракт (50 мг/л) в качестве дополнительных источников углеводов. На среде Гамборга и Эвелега (В6), при росте на которой у *Nerium oleander* не наблюдалось образования каллусной ткани, в качестве источников углеводов содержатся только сахароза в концентрации 20 г/л и мезо-инозит —

Таблица 3

**Время каллусообразования эксплантов олеандра на различных средах**

Тип экспланта	Индукция каллусообразования (дни)			
	Среда Мурасиге и Скуга 24 (МС 24)	Среда Мурасиге и Скуга (МС)	Среда Шенка и Хильдебранта	Среда Гамборга и Эвелега В5
Листья	10–13	20–22	10–13	—
Побеги	15–17	28–31	16–19	—



Рис. 2. Укорененные черенки на половинной жидкой среде 1/2МС без гормонов

100 мг/л. Как показывают наши результаты, оптимальными условиями для индукции калусообразования у олеандра являются повышенное содержание в среде разнообразных источников углеводов. При сравнении листьев и побегов в качестве источника калусной ткани было установлено, что при использовании листьев достигается более высокая скорость нарастания биомассы (табл. 4).

**Таблица 4**  
**Скорость нарастания биомассы калусов из побегов и листьев**

Тип экспланта	Скорость нарастания биомассы (индекс роста)	
	Среда МС 24	Среда Шенка и Хильдебранта
Листья	11,5±0,3	10,4±0,2
Побеги	7,5±0,1	6,7±0,1

Обязательным условием для использования растительных клеток в качестве продуцентов биологически активных соединений является получение калусной ткани, имеющей стабильные ростовые характеристики, так как в этом случае ее можно наращивать непрерывно и вне зависимости от сезонов года. Для достижения этой цели нами были испытаны питательные среды с различными сочетаниями и концентрациями фитогормонов.

Было обнаружено, что на питательных средах с содержанием 2,4-Д (0,5–1 мг/л) процесс дифференцировки тканей подавляется и каллусы остаются рыхлыми. Наличие же в среде БАП и ИУК в соотношении 2:1 приводит к образованию плотного морфогенного каллуса. Показано также, что для поддержания недифференцированного состояния культивируемой калусной ткани олеандра применение 2,4-Д более эффективно, чем ИУК и НУК. Согласно литературным источникам, 2,4-Д усваивается медленнее и является более активным ауксином, чем ИУК, которая, в отличие от синтетического 2,4-Д, имеет естественное происхождение и легче разлагается тканями растений (Моррис П., 1989; Хасси Г., 1987).

Скорость роста и внешний вид каллуса также зависят от концентрации и типа вносимых в среду фитогормонов. Наши исследования показали, что внесение в среду, содержащую 2,4-Д в концентрации 1 мг/л, кинетина в концентрации 0,2 мг/л тормозит рост каллуса, который становится более компактным, темным и очень твердым (рис. 4а). В то же время увеличение концент-

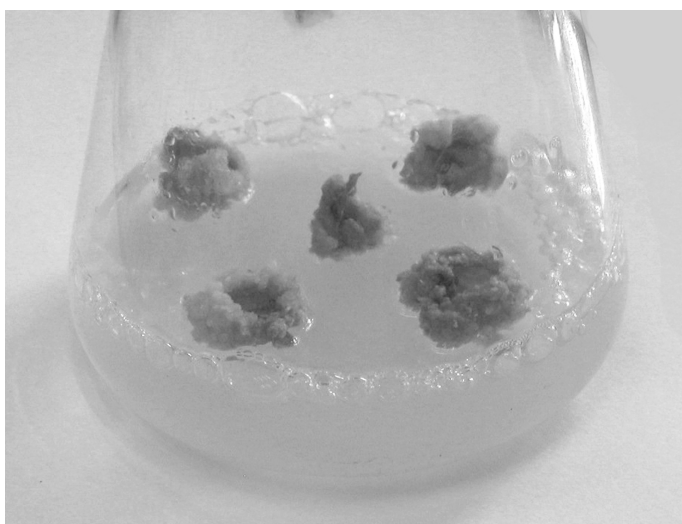


Рис. 3. Калусообразование *N. oleander* на 10–13-й день после введения в культуру на среде Шенка

рации кинетина до 1 мг/мл способствует быстрому росту каллуса (рис. 4б). При этом образуется каллусная ткань молочного цвета с умеренно рыхлой поверхностью.

В этих условиях нарастание каллусной массы *N. oleander* происходит очень быстро. На 28–30-й день культивирования поверхность агара в колбе была полностью покрыта каллусом. К концу пассажа, на 30–32-й дни, каллус бурел, обводнялся и вскоре погибал. Для дальнейшей работы нами были отобраны каллусные ткани, полученные на среде МС 24 из молодых листочков, стерильных проростков и поддерживаемые на той же среде.

Изучение динамики накопления сырой массы полученной нами изолированной каллусной культуры олеандра показало, что рост тканей на агаризованной среде происходит по нарастающей кривой. Кривые роста каллусной культуры *N. oleander* имеют стандартную S-образную форму. На представленном графике (рис. 5) показана динамика накопления сухой и сырой каллусной массы *N. oleander* при культивировании на среде МС 24. Как видно из рис. 5, после помещения кусочка каллуса *N. oleander* на свежую питательную среду прироста сырой биомассы в первые шесть суток не наблюдалось (лаг-фаза). Затем, на седьмые сутки, клетки вступали в

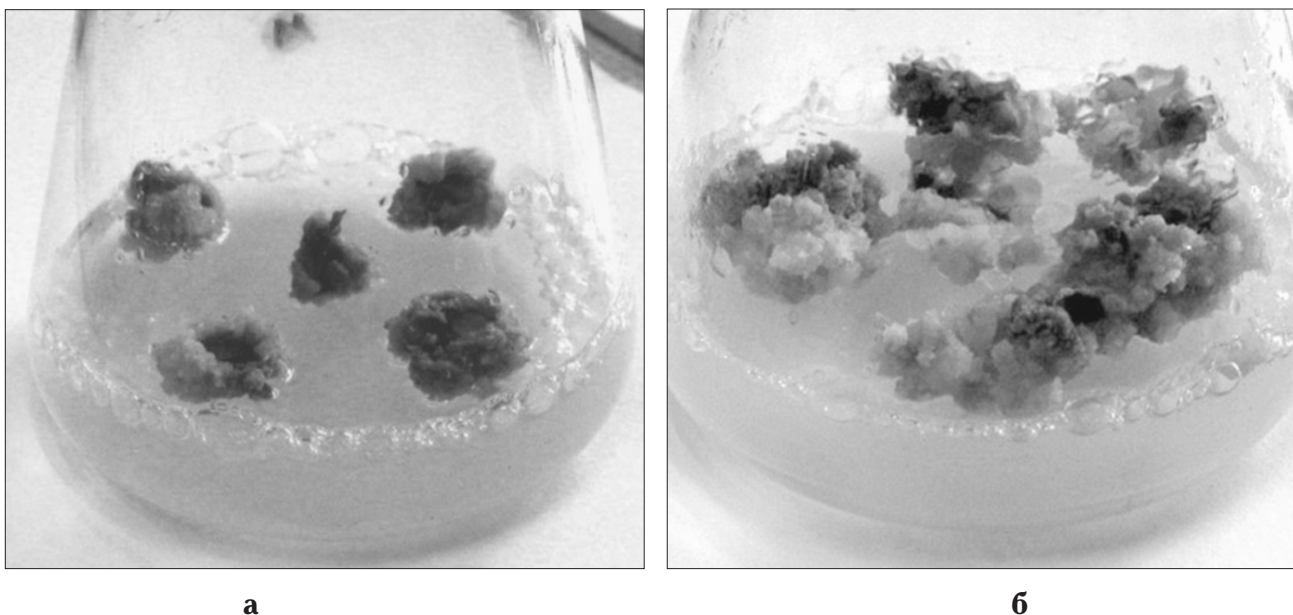


Рис. 4. Каллусная ткань *N. oleander* на средах, содержащих кинетин: 2,4-Д (мг/мл) в соотношениях: а) 0,2:1, б) 1:1

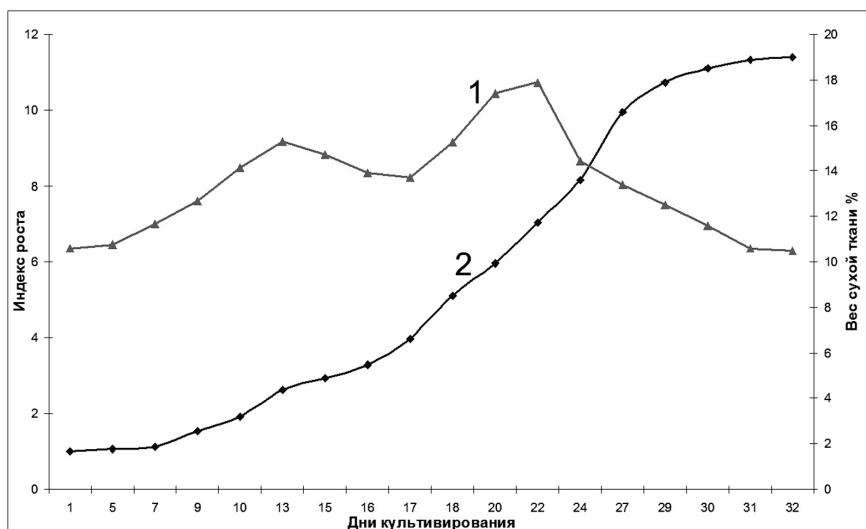


Рис. 5. Динамика накопления сухой (1) и сырой (2) массы каллусной ткани *N. oleander*



фазу экспоненциального роста, что видно из динамики увеличения сырой и сухой биомассы, основной характеристикой которой являлась высокая и постоянная удельная скорость роста. Прирост сухой биомассы каллусной ткани продолжался в течение 16 дней, а сырой массы — до 30-х суток культивирования, что связано с обводнением клеток, их вакуолизацией и растяжением. Таким образом, экспоненциальная фаза роста каллусной ткани олеандра начиналась на седьмые сутки и продолжалась в течение 16 дней. В течение этой фазы наблюдалось активное митотическое деление клеток, и митотический индекс клеток каллусной ткани при культивировании на среде МС 24 в экспоненциальной фазе роста составил 0,17‰.

Наблюдения за динамикой накопления сухого вещества в каллусной ткани олеандра (см. рис. 5) выявили два пика его увеличения. Первое, сравнительно небольшое увеличение веса приходилось на 10–13-й дни, что, по всей видимости, связано с началом интенсивного деления клеток. Второй пик соответствовал 20–22-му дню культивирования, после чего наблюдалось уменьшение веса сухой ткани, продолжавшееся до конца срока наблюдений (31-й день). Судя по полученным результатам, на 23-е

сутки культивирования, то есть после прекращения увеличения сухой массы, наступала фаза замедленного роста культуры, переходящая в стационарную фазу. Согласно литературным данным, на поздних стадиях экспоненциальной фазы и в стационарной фазе увеличение биомассы происходит уже не за счет возрастания числа клеток, а за счет их растяжения и вакуолизации (Бутенко Р.Г., 1999). К концу стационарной фазы (30–32-е сутки) фазы сухой вес каллусной ткани стабилизировался.

Итак, в исследованной нами культуре олеандра длительность пассажа (то есть промежуток времени между пересевами клеток) составляла 30–35 дней. На 14–16-е сутки происходило трехкратное увеличение исходной массы. Индекс роста по сырой и сухой биомассе составил  $11,4 \pm 0,3$ . Подсчет числа живых и мертвых клеток в каллусной культуре *N. oleander* показал, что в цикле культивирования выживаемость клеток колебалась от 55 до 76%.

Наибольшая выживаемость клеток приходилась на экспоненциальную фазу роста и составляла 75,97% (табл. 5).

Таблица 5

#### Выживаемость клеток в течение цикла культивирования каллусной ткани *N. oleander*

Каллусная ткань <i>N. oleander</i>	Фазы роста каллусной ткани <i>N. oleander</i>					
	7-е сутки (лаг-фаза)		15-е сутки (экспоненциальная фаза)		26-е сутки (стационарная фаза)	
	Число живых клеток на 1000 клеток	% от общего числа клеток	Число живых клеток на 1000 клеток	% от общего числа клеток	Число живых клеток на 1000 клеток	% от общего числа клеток
	551,6 ± 8,25	55,16	759,7 ± 4,17	75,97	644,6 ± 5,48	64,46

#### Заключение

Изложенные результаты свидетельствуют о том, что для индукции и пробуждения стерильных почек олеандра оптимальной является среда МС, а для клонального микроразмножения полученных черенков — безгормональная жидкая среда МС с половинным составом остальных компонентов. Для индукции каллусогенеза у эксплантов оптимальными являются среда Шенка и Хильдебранта и модифицированная нами среда МС 24, на которых первые признаки каллусообразования наблюдаются на 10–13-е сутки культивирования. При использовании листьев в качестве источника каллусной ткани достигается более высокая скорость нарастания биомассы. Для стабильного

роста каллусной ткани *N. oleander* необходимо присутствие в питательной среде МС гормональных соединений 2,4 Д и кинетина в концентрациях 1,0 мг/мл. Митотический индекс на этой среде в экспоненциальной фазе роста составляет 0,17‰, а индекс роста —  $11,4 \pm 0,3$ . Наибольшая выживаемость клеток приходится на экспоненциальную фазу роста и составляет 75,97%.

Таким образом, в экспериментах по получению стерильных проростков и оптимизации условий для их размножения показана возможность клонального микроразмножения олеандра с получением полноценных растений в условиях *in vitro*. Получена каллусная ткань *Nerium oleander*, стабильно растущая в перевиваемой культуре на искусственных питательных средах и обладающая

довольно высокими ростовыми показателями, которые в будущем можно использовать в качестве продуцентов биологически активных соединений.

## Литература

1. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве. — Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1993.
2. Березнеговская Л.Н., Гусев И.Ф., Дмитрук С.Е., Смородин А.В., Смородин В.В., Трофимова Н.А., Шмыкова Н.А. Культура тканей и клеток алкалоидных растений. — Томск: Изд-во Томского университета, 1975.
3. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. — М.: Наука, 1986.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.
5. Калинин Г.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии растений. — Киев: Наукова думка, 1980.
6. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. — М.: Наука, 1983.
7. Моррис П., Скразг А., Смарт Н., Стаффорд А. Образование продуктов вторичного метаболизма в суспензионных культурах клеток / Биотехнология растений: культура клеток. — М.: ВО «Агропромиздат», 1989. — С. 154–204.
8. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. — М.: Медицина, 1981.
9. Ованесян Н.А., Мкртумян М.К., Гаспарян Г.Г. Цитотоксическая активность экстрактов культуры клеток *Nerium oleander* L. // Биотехнология. — 2007. — 5.07 — С. 66–71.
10. Паушева Э.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980.
11. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro* / Биотехнология сельскохозяйственных растений. — М.: Агропромиздат, 1987. — С. 105–133.
12. Dixon R., Gonzales R. Plant cell culture. A practical approach. — USA: Oxford University Press, 1996.
13. Duke J.A. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton. — FL: CRC Press, 1985.
14. Manna S.K., Sah N.K., Newman R.A., Cisneros A. and Aggarwal B.B. Oleandrin Suppresses Activation of Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and c-Jun N-Terminal Kinase // J. of Cancer Research. — 2000. — Vol. 60. — P. 3838–3847.
15. McConkey D.J., Lin Y., Nutt L. K., Ozel H.Z., Newman R.A. Cardiac glycosides stimulate  $Ca^{2+}$  increases and apoptosis in androgen — independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells // J. of Cancer Research. — 2000. — Vol. 60. — P. 3807–3812.
16. Mingorance M.D., Rossini S.O. Heavy metals content in *Nerium oleander* leaves as urban pollution assessment // Environmental Monitoring and Assessment. — 2006. — P. 9004–9009.
17. Ozel H.Z. U.S. Pat. No.5.135. 745, 2000.
18. Rossini S.O., Mingorance M.D. Assessment of airborne heavy metal pollution by aboveground plant parts // Chemosphere. — 2006.
19. Skoog F., Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* / In: The biological action of growth substances: Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge: Univ. Press, 1957. — Vol. 11. — P. 118–131.
20. Walker K.A., Ju P.C., Sato S.J. et al. The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L cultured *in vitro* // Amer. J. Bot. — 1978. — Vol. 65. — P. 654–659.
21. World health organization monographs on selected medicinal plants. — 1999. — Vol. 1. — P. 44–45.

### Список сокращений

МС — среда Мурасиге и Скуга,  
В5 — среда Гамборга и Эвелега,  
БАП — бензиламинопурин,  
ИУК — индолилуксусная кислота,  
2,4-Д — дихлорфеноксисукусная кислота.

## CLONAL MICROPROPAGATION AND AN INDUCTION OF THE CALLUS FORMATION IN OLEANDER (*NERIUM OLEANDER* L.) IN VITRO

N.A. OVANESYAN

*Biological Faculty, Erevan State University, Erevan, Armenia*

The possibility of the obtaining of stably growing callus culture of *Nerium oleander* and clonal micropropagation *in vitro* were investigated. The growth parameters were evaluated. It was shown that growth index of callus culture of *Nerium oleander* on modified medium MS 24 in exponential growth phase was  $11.4 \pm 0.3$  and mitotic index was 0.17%. The cells' high viability — 75.97% was observed in exponential growth phase. The opportunity of the oleander isolated culture application as an alternative source of chemotherapeutics similar to known Anvirzel medication was discussed.

*Keywords:* callus culture, oleander, *Nerium oleander*, clonal micropropagation, growth index, mitotic index, cell viability.

## БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БЕЗВИРУСНОГО КАРТОФЕЛЯ

Д.И. ТАЗЕТДИНОВА\*, Р.И. ТУХБАТОВА, Э.А. РАФАИЛОВА, Ф.К. АЛИМОВА

ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина», Казань

Статья посвящена изучению влияния биопрепарата на основе микромицетов рода *Trichoderma* в зависимости от состава среды культивирования на микрорастения безвирусного картофеля *in vitro*. На основе выявленных сортоспецифичности и органотропного действия микроорганизмов подобраны наиболее перспективные штаммы-стимуляторы роста микрорастений картофеля.

*Ключевые слова:* безвирусный картофель, микрорастения, биопрепарат, *Trichoderma*.

### Введение

Картофель в Российской Федерации — это один из важнейших продуктов питания, потребление которого в последние годы существенно возросло. Среднегодовой объем производства базисного семенного картофеля в России за последние 2–3 года составил около 160 тыс. тонн.

Увеличение производства семенного материала всех категорий в современных условиях может решаться только при соблюдении главного требования формирующегося отечественного рынка — повышения качества семян. При этом, в первую очередь, повышенные требования предъявляются к элитному и особенно к исходному материалу [1].

Картофель является культурой, восприимчивой к возбудителям грибных, бактериальных и вирусных болезней. Возбудители подавляющего большинства болезней передаются с посадочным материалом. При высадке микрорастений в грунт для получения микроклубней важно, чтобы растение было хорошо развитым, с сильной корневой системой. Слабое растение не сможет противостоять болезням и погибнет. Это приводит к увеличению себестоимости семенного материала.

Для решения проблемы в новых экономических условиях необходимы новые методические и технологи-

ческие подходы к вопросам воспроизводства оздоровленного семенного материала, его размножения в элитном семеноводстве.

Широкое и успешное использование для биологической защиты растений против грибных возбудителей болезней получили грибы рода *Trichoderma*, встречающиеся во всех типах почв [2]. При исследовании биологии этих микромицетов в первую очередь акцентируют внимание на их антагонистической активности в отношении фитопатогенных грибов. Однако они продуцируют и фитогормоны, которые поступают в растительный организм, приводя к более активному его развитию [3].

Ранее нами и другими исследователями был показан органотропный эффект метаболитов грибов рода *Trichoderma* на злаковых [3, 4]. Однако не было данных по влиянию на микрорастения безвирусного картофеля.

Целью работы явилось изучение влияния биопрепарата на основе *Trichoderma* в зависимости от состава среды культивирования на микрорастения безвирусного картофеля *in vitro*.

### Материалы и методы

**Объекты исследования.** В работе использованы 4 сорта микрорастений безвирусного семенного картофеля (МБСК) отечественной и зарубежной селекции: Розара, Фелокс, Невский, Ред Скарлет, культивируемые в Поволжье.

Использованы изоляты гриба рода *Trichoderma*: *T. sp.1 (T.1)*, *T. koningii 2 (T.2)*, *T. koningii 3 (T.3)*, *T. asperellum 4 (T.4)*, выделенные из почв регионов Татарстана.

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Тазетдинова Диана Ирековна,  
аспирант биолого-почвенного факультета  
Казанского государственного университета  
им. В.И. Ульянова-Ленина  
Тел./факс: (843) 231-53-60  
E-mail: tazetdinova\_d@rambler.ru

**Методы.** Фитотоксичность изолятов *Trichoderma* в зависимости от состава питательной среды оценена по воздействию культуральной жидкости (КЖ) микромицетов на МБСК. В качестве источников углерода в составе картофельно-глюкозной среды (КГ) для культивирования *Trichoderma* выбраны: сахароза, маннит, глицерин, глюкоза, спирт.

Штаммы *Trichoderma* выращивали на КГ [5] в течение 3 суток в колбах объемом 250 мл при 25 °С с постоянным перемешиванием 200 об/мин. Затем отфильтрованную КЖ гриба раскапывали по 0,5 мл в пробирки с микрорастениями картофеля. На 7-е сутки измеряли длину стеблей и корней картофеля и производили подсчет фитотоксической активности по формуле:

$$A_{\text{ф}} = 100 - \left( \left( \frac{D_{\text{ж}} - D_{\text{н}}}{D_{\text{к}} - D_{\text{н}}} \right) \times 100 \right),$$

где  $A_{\text{ф}}$  — фитотоксическая активность в процентах ингибирования роста корней;

$D_{\text{ж}}$  — средняя длина корней (стеблей) на 7-е сутки в опытном варианте (см);

$D_{\text{к}}$  — средняя длина корней (стеблей) на 7-е сутки в контроле (см);

$D_{\text{н}}$  — начальная длина корней (стеблей) (см).

Как фитотоксичные определены культуры *Trichoderma*, вызвавшие угнетение роста стеблей и корней картофеля не менее чем на 30% по сравнению с контролем [5].

Микрорастения картофеля выращены на модифицированной среде Мурасиге — Скуга, для размножения материала применено микрочеренкование растений [6].

Статистическая обработка и графическое представление данных выполнены с использованием программы Microsoft Office Excel 11.

## Результаты и обсуждение

### 1. Подбор питательной среды

Известно, что микромицеты рода *Trichoderma* выделяют различные метаболиты: факторы роста (ауксины, цитокины и этилен), органические кислоты, внутриклеточные аминокислоты, витамины и свыше 100 антибиотиков [8–11]. Каждый вид характеризуется специфичным набором метаболитов. Состав питательной среды влияет на метаболизм микроорганизмов, приводя к синтезу различных соединений [7]. В комплексе они могут действовать как положительно, так и отрицательно на развитие растений.

Исследование влияния разных источников углерода (сахароза, маннит, глицерин, глюкоза, спирт) в составе

питательной среды на синтез фитотоксинов штаммом *T.4* выполнено на сортах картофеля Ред Скарлет и Розара.

Наименьшая длина стеблей картофеля сорта Ред Скарлет отмечена при использовании глицерина в качестве источника углерода (увеличение на 1,4%), наибольшая длина — при использовании в качестве источника углерода глюкозы (увеличение на 3,5%). Наибольшая длина корней отмечена при использовании глицерина (увеличение на 3,1%) в качестве источника углерода, наименьшая — при глюкозе (увеличение на 0,4%).

Наибольшая длина стеблей картофеля сорта Розара отмечена при использовании в качестве источника углерода сахарозы (увеличение на 2,0%). Наименьшая — при использовании в качестве источника углерода глицерина (увеличение на 0,5%). Наибольшая длина корней была отмечена при использовании глицерина в качестве источника углерода (увеличение на 1,5%), а наименьшая — при использовании маннита и сахарозы (увеличение на 0,5%).

Таким образом, при использовании глицерина в качестве источника углерода в составе питательной среды для выращивания штамма *Trichoderma T.4* показана наибольшая стимуляция роста корней и наименьшая стимуляция стебля. При выращивании картофеля важна стимуляция роста корневой зоны в большей степени, чем стебля. Поэтому в дальнейших экспериментах в составе питательной среды в качестве источника углерода был использован глицерин.

### 2. Влияние биопрепарата на развитие микро-растений картофеля

В работе исследовалось действие КЖ штаммов *T.1*, *T.2*, *T.3*, *T.4* на МБСК: Ред Скарлет, Розара, Невский и Фелокс.

При оценке новых препаратов важный показатель — определение их фитоконпетентности (отсутствие фитотоксичности) [4]. В результате исследований показано, что изученные изоляты не обладали фитотоксичностью.

Наибольшим стимулирующим действием на корни картофеля сорта Фелокс обладал штамм *T.3*, наименьшим — *T.4*. Наибольшее ингибирующее действие на рост стеблей оказала КЖ штамм *T.3* (рис. 1).

Наибольшее стимулирующее действие на рост корней картофеля сорта Невский оказывал штамм *T.3*, а наименьшее — штамм *T.2*. Наибольшую ингибирующую способность по отношению к стеблю проявил штамм *T.4*, а наименьшую — *T.2*. Также ингибирующее действие проявил штамм *T.1* по отношению к корням (рис. 2).

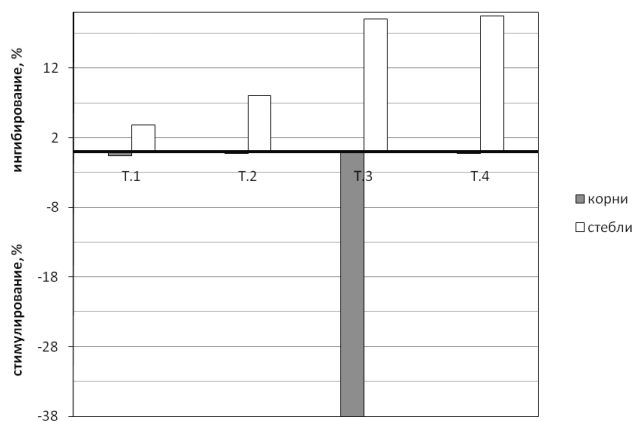


Рис. 1. Влияние КЖ штаммов T.1, T.2, T.3, T.4 на рост корней и стеблей картофеля сорта Фелокс

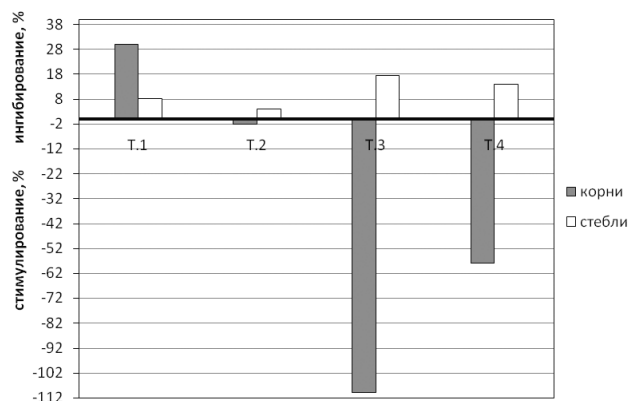


Рис. 2. Влияние КЖ штаммов T.1, T.2, T.3, T.4 на рост корней и стеблей картофеля сорта Невский

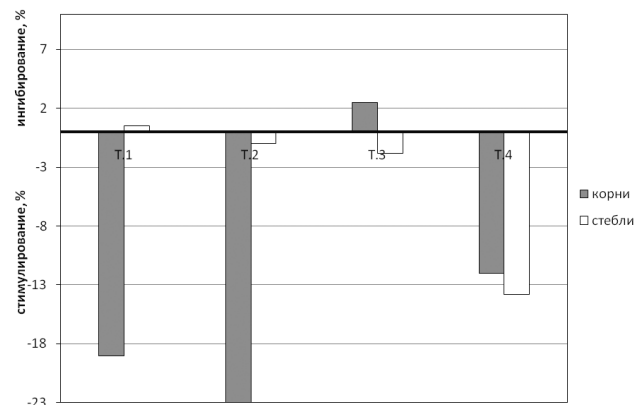


Рис. 3. Влияние КЖ штаммов T.1, T.2, T.3, T.4 на рост корней и стеблей картофеля сорта Ред Скарлет

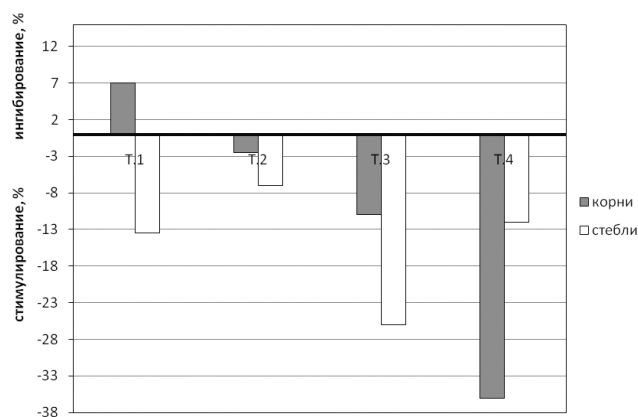


Рис. 4. Влияние КЖ штаммов T.1, T.2, T.3, T.4 на рост корней и стеблей картофеля сорта Розара

Наибольшее стимулирующее действие на рост корней сорта Ред Скарлет оказывали штаммы T.2 и T.1, а на рост проростков — T.4. Наименьшее стимулирующее действие на рост корней оказывал штамм T.4, на проростки — T.2. Ингибирующее действие на корни оказал штамм T.3, а на проростки — T.1 (рис. 3).

Наибольшее стимулирующее действие на рост корней картофеля сорта Розара оказывал штамм T.4, а наименьшее — штамм T.2. Ингибирующее действие по отношению к корням проявил штамм T.1. Наименьшее стимулирующее действие на рост стеблей проявил штамм T.2. (рис. 4).

### Заключение

Питательная среда для культивирования *Trichoderma* подобрана по источнику углерода для снижения уровня фитотоксинов. При изучении влияния культуральной жидкости исследованных штаммов *Trichoderma* на рост

микрорастений картофеля отмечены сортоспецифичность и органотропное действие.

В качестве стимуляторов роста картофеля наиболее перспективны штаммы T.1, T.4, T.3, которые стимулируют рост корней и не стимулируют рост стебля.

Для выращивания здорового семенного безвирусного картофеля рекомендованы:

*Trichoderma spp.1* — для сорта картофеля Ред Скарлет,

*Trichoderma asperellum 4* — для сорта картофеля Розара,

*Trichoderma koningii 3* — для сорта картофеля Невский и Фелокс.

### Литература

1. Тазетдинова Д.И., Сташевски Э., Салихова З.З., Алимова Ф.К. Создание сортов картофеля. Устойчивость к

- фитофторозу исходного материала // Вестник ТО РЭА. – 2005. – № 2. – С. 34–36.
2. Алимова Ф.К. *Trichoderma*/ Нуроскреа (Fungi, Ascomycetes, Нуроскреа): таксономия и распространение. Учебник. – Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. – 264 с.
  3. Алимова Ф.К., Тазетдинова Д.И., Тухбатова Р.И. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*: учебно-методическое пособие. – Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2007. – 234 с.
  4. Коломбет Л.В. Обоснование оптимальных доз биопрепарата для применения на озимой пшенице // АгроXXI. – 2006. – № 7–9.
  5. Захарова Н.Г., Алимова Ф.К., Егоров С.Ю. Методические указания к выполнению лабораторных работ по теме: Экология микроорганизмов. – Казань: КГУ, 1993. – С. 37–39.
  6. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М.: Агропрогресс, 2000. – 80 с.
  7. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. пособие для студентов биол. спец. ун-тов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1979. – 455 с.
  8. Benitez T., Limon C., Delgado-Jarana J., Rey M. Glucanolytic and other enzymes and their genes // Harman G.E., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial application. – London: Taylor and Francis Ltd., 1998. – P. 101–127.
  9. Benitez T., Rincon AM., Limon M.C., Codon A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains // International Microbiology. – 2004. – N 7. – P. 249–260.
  10. Gomez I., Chet I., Herreraestrela A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates // Molecular and General Genetics. – 1997. – Vol. 256. – P. 127–135.
  11. Stoppacher N., Rethner B., Zeilinger S., Brunner K., Mach R.L., Krska R., Schuhmacher R. Screening for atroviridins and harzianins in culture samples of *Trichoderma atroviride* using LC-MS/MS // 9<sup>th</sup> International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vienna, Austria. – 2006.

Список сокращений

- МБСК – микрорастения [пробирочные растения]  
безвирусного семенного картофеля,  
КЖ – культуральная жидкость,  
Т.1 – *Trichoderma spp.1*,  
Т.2 – *Trichoderma koningii 2*,  
Т.3 – *Trichoderma koningii 3*,  
Т.4 – *Trichoderma asperellum 4*.

## BIOPREPARATION FOR CULTURE OF NON-VIRUS POTATO

D.I. TAZETDINOVA, R.I. TUKHBATOVA, E.A. RAFAILOVA, F.K. ALIMOVA

*V.I. Ulyanov-Lenin Kazan State University, Kazan*

The article is devoted to studying of the influence of biopreparation from *Trichoderma* on microplants of non-virus potato in vitro under variation of the culture medium. The most prospective strains of microorganisms for growth stimulation of the potato microplants were selected (based on criteria of sort-specificity and organotropic action).

*Keywords:* non-virus potato, microplants, biopreparation, *Trichoderma*.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *TRICHODERMA* В ПРОЦЕССЕ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА

Ф.К. АЛИМОВА<sup>1</sup>, Е.В. СКВОРЦОВ<sup>2</sup>, Т.А. МЕЛЬНИКОВА<sup>3</sup>, Р.И. ТУХБАТОВА<sup>1\*</sup>,  
Д.И. ТАЗЕТДИНОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный университет,

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН,

<sup>3</sup> ОАО «Татспиртпром», Казань

В работе показана эффективность предварительного культивирования гриба *Trichoderma* при переработке послеспиртовой барды в дрожжевой белковый концентрат. Проведение предварительного культивирования *Trichoderma* позволяет увеличить содержание белка в кормовых дрожжах на 10,2%. Проведен анализ роста биомассы дрожжей в зависимости от продолжительности предварительного культивирования *Trichoderma*.

**Ключевые слова:** ксиланаза, целлюлаза, протеаза, *Trichoderma*, кормовые дрожжи, послеспиртовая барда.

### Введение

Виды *Trichoderma* являются продуцентами ферментов (целлюлаз, хитиназ, пектиназ, ксиланаз, серинзависимых протеиназ и др.), используемых в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, в производстве моющих средств, в получении спирта, преобразовании отходов, содержащих целлюлозу в глюкозу [1, 2] получении кормовых добавок [1, 2] и текстильной промышленности [1, 2]. На основе антибиотиков, токсинов, ферментов грибов этого рода получают препараты для биологического контроля болезней и стимуляции роста растений [1, 2]. Представителей рода *Trichoderma* можно найти практически во всех почвах.

В настоящее время перед микологами, изучающими *Trichoderma*, стоит задача поиска в природе новых видов-продуцентов, которые еще могут быть найдены, и их использования в промышленности. Для этого исследуются заповедные и погребенные почвы как хранители ценных природных изолятов.

При производстве спирта из зерна (например, пшеницы, кукурузы или ржи) получается довольно большое количество отработанной массы прошедшего ферментацию сырья, из которого путем дистилляции был

извлечен алкоголь. Эту жидкую массу — послеспиртовую барду — необходимо утилизировать, и проблема с этим актуальна во всем мире. На сегодняшний день послеспиртовая барда высушивается или перерабатывается в дрожжевой кормоконцентрат — основу комбикорма, предназначенного для кормления сельскохозяйственных животных и птицы.

Применяемая в настоящее время технология предусматривает культивирование кормовых дрожжей на барде с добавкой источника азота (мочевины и др.). Дрожжи обогащают барду белком. Однако дрожжевой кормоконцентрат обладает невысокими кормовыми свойствами и, соответственно, ценой реализации, что заставляет технологов спиртового производства и научных работников продолжать поиски более эффективных методов переработки послеспиртовой барды.

Микробиологический синтез белка, который происходит при культивировании дрожжей на послеспиртовой барде, отличается высокой производительностью. Однако эффективность такого синтеза дрожжами зависит от степени гидролиза полисахаридов сырья. Проведение дополнительного гидролиза полисахаридов барды приводит к возрастанию доступных для дрожжей углеводов сырья. В связи с этим проблему снижения себестоимости кормового белка можно решать путем предварительного гидролиза полисахаридов барды.

Целью работы являлось исследование эффективности предварительного культивирования грибов *Trichoderma* для увеличения содержания белка в дрож-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Тухбатова Р.И.,

аспирант кафедры микробиологии

Казанского государственного университета

E-mail: resedushka84@yandex.ru

жевом кормовом концентрате, получаемом в процессе переработки послеспиртовой барды.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1) Исследование динамики накопления гидролитических ферментов при культивировании *Trichoderma* на послеспиртовой барде;

2) Определение оптимальной длительности предварительного культивирования *Trichoderma* перед внесением инокулята кормовых дрожжей.

## Материалы и методы

**Микроорганизмы.** В настоящей работе были использованы:

- штамм кормовых дрожжей *Candida tropicalis* SK-4-1, предоставленный лабораторией цеха кормовых дрожжей Мамадышского спиртзавода ОАО «Татспиртпром»;
- штамм *Trichoderma spp.* 302, выделенный из Мурзихинского II могильника, погребение № 162, раскоп X.

Мурзихинский II могильник расположен в 3–3,5 км к востоку от бывшего с. Мурзиха, в 5 км к северо-западу от с. Алексеевск. Образцы почвы были отобраны из внутренней части 2 человеческих черепов, обнаруженных во время археологических раскопок на Мурзихинском II могильнике. Первый череп был найден в погребении 196, принадлежал мужчине 30 лет, представителю постмаклашеевской культуры (VIII–VI вв. до н.э., ранний железный век). Второй был извлечен из погребения 162, пол его не определен.

Как было показано почвоведом, образцы почвы попали в погребения при захоронении из верхней части горизонта [A1] старопашотного выщелоченного чернозема. Структурно-агрегатный анализ показал, что, несмотря на весьма низкое для данной разновидности по гранулометрическому составу содержание гумуса в сравнении с собственно целинными аналогами (6,6% при содержании физической глины 65% и илистой фракции 45%), почва характеризуется хорошим структурным состоянием. Распределение гумуса во фракциях однородное.

Идентификация изолята *T. spp.* 302 была проведена с помощью морфолого-физиологического и молекулярно-генетического методов [3]

Штамм *T. spp.* 302 не токсичен по отношению к животным.

**Питательные среды для культивирования микроорганизмов.** Для получения инокулята чистой

культуры *T. asperellum* 302 использовалась среда Чапека (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4$  – 0,01; сахара – 30; агар – 20.

Для получения инокулята чистой культуры дрожжей *Candida tropicalis* среда Сабуро (г/л): глюкоза – 10, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5,  $\text{NaCl}$  – 0,25.

Послеспиртовая зерновая нефилтрованная барда предоставлена Усадским спиртовым заводом ОАО «Татспиртпром» (табл. 1). Барда для выращивания кормовых дрожжей предварительно стерилизовалась с добавлением 0,5% мочевины в качестве источника азота.

Таблица 1

### Характеристика барды

Наименование показателей	Характеристика
1. Внешний вид	Суспензия
2. Массовая доля сухих растворимых веществ, %	4,3
3. Массовая доля сухих веществ (общее содержание), %	7,4
4. Массовая доля сырого протеина (в пересчете на АСВ), %	26,0
5. Активная кислотность, рН	4,3

**Культивирование микроорганизмов.** Посевы грибов *Trichoderma* выращивали на агаризованной среде Чапека при температуре 28 °С, в течение 5 суток, в темноте. Для получения спорово – мицелиальной суспензии микромицета делали смыв стерильной водопроводной водой. Полученную суспензию фильтровали для удаления мицелия и разбавляли до содержания  $1 \times 10^6$  спор/мл и в дальнейшем использовали в качестве инокулята для культивирования на отходах спиртового производства.

Культивирование осуществлялось в 150 мл колбах, содержащих 70 мл барды в течение 24–192 часов на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин. при температуре 28 °С. Пробы для определения ферментативной активности отбирали каждые 24 часа. Клетки отделяли центрифугированием.

Для приготовления посевного материала *Candida tropicalis* использовался поэтапный пересев дрожжей:

1. Получали суспензию дрожжей в стерильной жидкой среде Сабуро методом смыва с агаризованной среды. Затем пробирки с суспензией помещали в термостат на 4 часа при температуре от 30–32 °С.



2- Далее суспензию *C. tropicalis* переносили в колбу объемом 150 мл с 70 мл жидкой среды Сабуро. Выращивание проводили при температуре 32–34 °С на промышленной качалке (200 об/мин.) в течение 24 часов. Полученную суспензию дрожжей в дальнейшем использовали в качестве инокулята для глубинного культивирования на барде.

Культивирование проводили в термостатной камере с частотой вращения 200 об/мин. в течение 24 часов, при температуре 37–38 °С.

Определение ксиланазной и целлюлазной активности ферментных препаратов проводили согласно методике [4]. Исследование проводили в трех повторностях. Разбавленный образец в количестве 0,06 мл помещали в пробирку. Пробирку помещали на 5 минут в 40 °С на водяную баню. Добавляли 0,6 мл 1,5% раствора ксилана или 4% карбоксиметилцеллюлозы и перемешивали. Через 20 минут инкубация прерывалась добавлением 0,3 мл 1% раствора DNSA. Далее раствор инкубировали точно 10 минут в кипящей водяной бане, затем охлаждали в ледяной бане 5 минут, добавляли 3 мл дистиллированной воды и перемешивали. Абсорбцию измеряли при 530 нм, используя двухлучевой спектрофотометр Lambda 35 Perkin Elmer Ins. Одна единица активности энзима (IU) соответствует количеству фермента, вызывающего выход одного микромоля восстанавливающих сахаров в минуту при гидролизе соответствующего субстрата. Выход восстанавливающих сахаров определяли по калибровочным графикам, построенным по глюкозе и ксилозе, соответственно.

Протеолитическую активность определяли по казеину [5]. Субстратом служил 2%-ный раствор казеина в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 9,0. Реакционная смесь состояла из предварительно прогретых до 37 °С 1 мл казеина и 1 мл ферментного раствора. Инкубацию проводили в течение 15 мин. при температуре 37 °С, после чего добавляли 2 мл 5%-ной ТХУ и инкубировали при той же температуре еще 20 мин. Смесь отфильтровывали через плотный фильтр. Затем к 1 мл фильтрата приливали 5 мл 6%-ного раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 1 мл реактива Фолина. Помещали смесь на 20 мин. в темноту, затем измеряли оптическую плотность против контроля на двухлучевом спектрофотометре Lambda 35 Perkin Elmer Ins при длине волны 670 нм. Контроль ставили параллельно следующим образом: смешивали 1 мл ферментного раствора и 2 мл 5%-ной ТХУ, инкубировали 20 мин. при 37 °С, после чего добавляли 1 мл 2%-ного раствора казеина и выдерживали еще 15 мин. при 37 °С. С фильтратом поступали, как описано выше.

Протеолитическую активность определяли по калибровочному графику, пользуясь программным обеспечением спектрофотометра. При вычислении результатов за одну единицу протеазной активности (U) принимали количество фермента необходимого для образования 1 мкМ растворимого эквивалента тирозина за 1 мин. в пересчете на 1 мл исследуемого раствора.

Определение азота и сырого протеина проводили по Кьельдалю (ГОСТ 13496.4-84). Статистическую обработку результатов проводили с помощью математического аппарата программы электронных статистических таблиц.

### Результаты и обсуждение

В работе использовался штамм *T. spp. 302*, который был отобран нами в ходе проведенного ранее широкого скрининга штаммов грибов *Trichoderma*. Штамм характеризуется сочетанием высоких показателей протеазной, целлюлазной и ксиланазной активностей [6].

Изучение морфологических и кинетических признаков позволило отнести штамм *T. spp. 302* к виду *Trichoderma asperellum*.

Морфологическое описание штамма *T. asperellum 302*.

После 72 часов роста на PDA при 30 °С колония имеет радиус (7–54(–64) мм, при 35 °С: (0–)27(–42) мм, при 40 °С – 0 мм. Колонии после выращенные в течение 72 часов на PDA в 30 °С в темноте, могут образовывать до 5 концентрических колец с интенсивным споронием. В центральной части колонии более темные по мере удаления от центра к краю формируют воздушный мицелий. При культивировании при 25 °С в темноте конидии формируются после 40 часов. Желтый пигмент не диффундирует в толщу агар, ни при каких температурах. Запах не выделяется.

Пустулы формируются обильно по всей поверхности колонии на средах CMD и SNA после 5 дней культивирования при 20 °С, в условиях периодического освещения (12 часов в темноте/12 часов в условиях освещения). Диаметр пустул 0,5–2,0 мм. Тип расположения пустул на поверхности дискретный, не отмечается тенденций к слиянию. Спорониесящие удлинения на конидиофорах отсутствуют. Стерильные отростки также не формируются. Конидиофоры чаще всего формируются в пустулах и редко – на воздушном мицелии. Конидиофоры симметричные и завершаются двумя или более фиалидами. Первые парные ответвления формируются ниже верхушки конидиофора и

располагаются под углом почти  $90^\circ$  по отношению к основной оси. Первичные ветки, по мере удаления от верхушки, характеризуются тенденцией к удлинению. Парные ответвления имеют одинаковую длину. На боковых ветвях первого порядка формируются неветвящиеся боковые ветви второго порядка. Основная ось конидиофора практически имеет одинаковую ширину с размером основания фиалид. Ширина конидиофоры – (1,7–)2,8–4,0(–7,0) мкм. Фиалиды формируются на концах ветвей первого, второго и третьего порядка, редко непосредственно вдоль длины веток. Обычно образуются скопления из 2–4 фиалид. Фиалиды – прямые, колбовидные, незначительно расширенные в середине, длиной (4,6–)6,5–11,5(27,5) мкм, шириной в середине – (2,0–)2,7–4,2(–6,8) мкм, в основании (1,3–)1,8–2,8(–4,7) мкм. Коэффициент L/W 1,6–3,6. Фиалиды немного уплотнены в основании и располагаются под углом  $100^\circ$  относительно клетки, из которой они возникают. Интеркалярные фиалиды не формируются. Конидии имеют темно-зеленый цвет, формы от шаровидных до сферических, или яйцевидных, мелко-шиповатые (шипы плохо видны в световом микроскопе), размером (2,8–)3,4–3,6(–7,0) x (2,4–)3–4(–6) мкм, коэффициентом – L/W 1,0–1,7. Отмечено интенсивное образование хламидоспор при культивировании в течение одной недели на СМД при  $20^\circ\text{C}$  в темноте. Хламидоспоры формируются терминально, реже интеркалярно на выросших в субстрат гифах. Форма у хламидоспор от сферической до яйцевидной, гладкие, бледно-зеленые, диаметром (4,5–)7,7–11,7(–15) мкм. Синанаморфы не формируются. Строматы не обнаружены.

Молекулярно-генетический анализ подтвердил результаты морфологической идентификации [3].

Проведено исследование гидролазной активности *T. asperellum 302* при культивировании на барде (табл. 2, рис. 1). Результаты показали, что при выращивании *T. asperellum 302* на барде наибольшее значение активности гидролаз наблюдается на 3–4-е сутки культивирования.

Дрожжи могут использовать в качестве источника углерода только простые сахара и дисахариды. Полимерные углеводы, содержащиеся в послеспиртовой барде, для дрожжей недоступны. Между тем в составе барды содержится значительное количество полисахаридов, что не позволяет получать на ее основе высококачественный белковый концентрат. В процессе культивирования *Trichoderma* происходит гидролиз полисахаридов, содержащихся в барде и увеличение количества простых сахаров в растворе.

**Таблица 2**  
**Ферментативная активность *T. asperellum 302***  
**на барде\***

Время культивирования, час	Ксиланазная активность, IUml-1	Целлюлазная активность, IUml-1	Протеазная активность, UI-1
24	0,1146±0,02	0,0102±0,001	2,097±0,2
48	0,851±0,05	0,201±0,01	37,968±3,3
72	5,7794±0,2	1,1502±0,02	66,4014±4,1
96	4,8532±0,2	1,0105±0,01	67,2304±3,2
120	2,2492±0,2	0,892±0,02	61,973±3,1
144	1,6575±0,05	0,6204±0,02	52,4852±2,2
168	1,3637±0,03	0,483±0,03	45,0602±2,0

\* Данные приведены в виде (среднее ± стандартное отклонение, n=3)

После того как были определены пики активности гидролитических ферментов исследуемого штамма *T. asperellum 302*, мы провели эксперименты по последовательному культивированию *Trichoderma* с кормовыми дрожжами с целью увеличения выхода кормового белка. Было установлено, что при засеве кормовых дрожжей в барду, где предварительно культивировали *T. asperellum 302*, наблюдается увеличение накопления дрожжевого белка. Нами была определена зависимость увеличения накопления дрожжевого белка от продолжительности предварительного культивирования *T. asperellum 302* на барде (рис. 1). Небольшое увеличение накопления дрожжевого белка (от 5 до 7%) наблюдали при предварительном культивировании *Trichoderma* на барде в течение 1–2 суток. Наибольшее увеличение накопления белка наблюдалось после предварительного гидролиза барды *Trichoderma* в течение 3 и 4 дней. Прирост абсолютного содержания белка составил около 10%, что составляет прибавку порядка 35% в сравнении с содержанием белка в дрожжевом кормовом концентрате, полученном без применения предварительного культивирования *Trichoderma*.

### Заключение

Таким образом, нами получены данные, показывающие, что в процессе культивирования *Trichoderma* на послеспиртовой барде в среде происходит накопление гидролитических ферментов. Максимум ферментативной

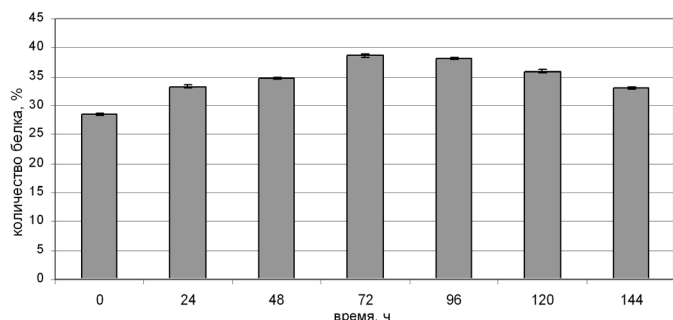


Рис. 1. Содержание белка в кормовых дрожжах после предварительного культивирования *T. asperellum 302*

активности приходится на 3–4-е сутки культивирования гриба. Как показали проведенные исследования, максимум ферментативной активности в среде является оптимальным временем для инокуляции перерабатываемой послеспиртовой барды кормовыми дрожжами. Максимальное содержание белка в дрожжевом концентрате получено при инокулировании дрожжей *Candida tropicalis* на 3-е сутки предварительного культивирования *Trichoderma*.

Полученные результаты показывают, что процесс происходит в два этапа: первый — ферментативный гидролиз части сырья, в процессе предварительного культивирования гриба *Trichoderma*, с получением доступных для дрожжей сахаров, второй — ферментация образующихся сахаров дрожжами, что позволяет получить высокий выход кормового белка.

## Литература

1. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань, Изд-во УНИПРЕСС ДАС, 2006. — 268 с.
2. Алимова Ф.К. *Trichoderma*/Нуроцеа (Fungi, Ascomycetes, Нуроцеалес): таксономия и распространение. — Казань, Изд-во УНИПРЕСС ДАС, 2006. — 360 с.
3. Druzhinina I., Kubichek C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters // J. Zhejiang Univ. SCI. — 2005. — Vol. 6B. — N 2. — P. 100–132.
4. Koenig J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, glucanase, and cellulase activity // Anal. Bioanal. Chem. — 2002. — Vol. 374. — P. 80–87.
5. Каверзнева Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеиназ // Прикладная биохимия и микробиология. — 1971. — Т. 7. — № 2. — С. 225–228.
6. Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Абузярова Д.М. Исследование ферментных препаратов грибов р. *Trichoderma*, гидролизующих пентозаны ржи // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. — 2004. — № 2(20). — С. 14–18.

### Список сокращений

АСВ — абсолютно сухое вещество,  
DNSA — динитросалициловая кислота,  
ТХУ — трихлоруксусная кислота.

## THE USE OF TRICHODERMA IN THE PROCESSING OF ALCOHOL PRODUCTION'S WASTE

F.K. ALIMOVA, E.V. SKVORTSOV, T.A. MELNIKOVA, R.I. TUKHBATOVA, D.I. TAZETDINOVA

Kazan State University, A.E. Arbusov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of RAS, OAO «Tatspirtprom», Kazan

In the present work the efficacy of the preliminary culture of *Trichoderma* in the processing of grains after alcohol distillation to the yeast protein concentrate was demonstrated. This procedure increased a protein content in 10,2%. The analysis of the growth of yeast biomass depending on duration of the preliminary culture of *Trichoderma* was carried out.

**Keywords:** xylanase, cellulose, protease, *Trichoderma*, fodder yeast, grains after alcohol distillation.

## АФФИННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ ИНСУЛИН СЫВОРОТОЧНЫХ ГЛИКОПРОТЕИДОВ ЧЕЛОВЕКА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СОСТАВА В НОРМЕ И ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ПЕРВОГО ТИПА

М.И. ГАРИПОВА\*, Н.А. КИРЕЕВА, Т.В. МОРУГОВА, О.Н. ЕЛИСЕЕВА, А.С. ПЕРШИНА

*Биологический факультет Башкирского государственного университета, Уфа*

На аффинном сорбенте с иммобилизованным инсулином выделены связывающие инсулин компоненты сыворотки крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом. Показано, что в формировании комплекса с инсулином в норме и при заболевании сахарным диабетом первого типа принимают участие гетерогенные по электрофоретической подвижности и молекулярной массе белки крови, в том числе относящиеся к семейству липокалинов. Состав сывороточных белков, формирующих комплекс с инсулином в норме и при сахарном диабете, различен. В состав комплекса наряду с альбумином и другими транспортными молекулами в норме входит известный своими иммуномодулирующими свойствами  $\alpha$ -фетопротеин, при сахарном диабете —  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин. При формировании сахарного диабета первого типа на электрофореграммах связывающих инсулин компонентов сыворотки крови усиливается  $\gamma$ -глобулиновая фракция. Предполагается, что в сыворотке крови человека транспортные белки формируют единый для многих гидрофобных и гидрофильных гормонов транспортный комплекс, в состав которого входит также инсулин. В состав этого комплекса входят гормоны и другие физиологически активные вещества, находящиеся в лабильной связи и равновесии с рецепторами клеток-мишеней. Доступность инсулина в этом комплексе для связывания с клеточными рецепторами, длительность его присутствия в сыворотке и реакция него иммунной системы, вероятно, зависят от свойств транспортных молекул, в комплексе с которыми инсулин присутствует в данной сыворотке.

**Ключевые слова:** аффинный сорбент, связывающие инсулин гликопротеиды сыворотки крови, сахарный диабет первого типа, липокарины.

### Введение

О природе сывороточных белков, аффинных к инсулину, и форме, в которой гормон доставляется к клеткам-мишеням, в литературе нет единого мнения. Принято считать, что в сыворотке инсулин представлен двумя фракциями: свободным и связанным инсулином [1]. Предполагается, что фракция «свободного инсулина» действует на мышечную ткань и ткань печени и в плазме представлена гормоном в истинно свободном состоянии [2], либо гормоном, входящим в состав непрочного комплекса с альбумином или орозомукоидом [1]. «Связанный инсулин» не выявляется иммунологически и активен только по отношению к жировой ткани [2]. Вероятно, в этом случае гормон находится в достаточно прочном

комплексе со специфическими иммуноглобулинами. По мнению Грачевой Н.К. и соавторов [3], в крови инсулин взаимодействует с трансферрином и орозомукоидом. В то же время на основании малого времени полувыведения инсулина высказывалось утверждение о том, что в крови гормон транспортируется в свободном виде [4], однако, принимая во внимание способность инсулина к образованию димеров и гексамеров и взаимодействию с катионами металлов, последнее утверждение представляется маловероятным.

Ранее методом титрования инсулин-связывающей активности сыворотки крови с эритроцитами, сенсibilизированными инсулином, было показано, что в сыворотке крови человека присутствует фактор, связывающий инсулин (ИСФ), причем, при возникновении сахарного диабета I типа его содержание в сыворотке снижается и продолжает падать по мере увеличения длительности заболевания [5]. Анализ спектров поглощения в ультрафиолетовой области аффинных к инсулину компонентов сыворотки крови человека позволил сделать предположение о том, что с инсулином взаимодействуют сывороточные гликопротеиды, причем, в норме процентное

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Маргарита Ивановна Гарипова,  
доцент кафедры биохимии и биотехнологии  
Башкирского государственного университета,  
450074 Уфа, ул. Фрунзе, 32  
Тел.: (3472) 736871  
E-mail: margaritag@list.ru

содержание углеводного компонента в ИСФ достоверно ниже, чем при сахарном диабете первого типа [6].

Цель данного исследования — выделение специфичных к инсулину гликопротеидов сыворотки крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом первого типа и изучение их физико-химической природы. Выделение проводилось методом аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованным инсулином.

### Материалы и методы

Получен сорбент на основе матрицы, представляющей собой модифицированный крупнопористый гель поливинилового спирта (ПВС-носитель), стабилизированный и активированный методом ацеталирования гидроксильных групп поливинилового спирта глutarовым альдегидом. Синтез ПВС-носителя проведен по ранее описанному методу [7]. Для получения аффинного сорбента к 5 мл отмытого дистиллированной водой до отрицательной реакции на альдегиды ПВС-носителя добавляли равный объем раствора инсулина (человеческий генноинженерный инсулин ХУМУЛИН Р производства фирмы Lilly France S.A.), приготовленный на 0,1 М карбонатном буфере рН 8,5 с 0,5 М хлористым натрием из расчета 10 единиц гормона на 1 мл носителя (0,4 мг/мл). Реакцию связывания лиганда с ПВС-носителем проводили при 4 °С в течение 18 часов. Непрореагировавшие с белком альдегидные группы носителя нейтрализовали добавлением 0,1 М β-аланина в 0,1 М карбонатном буфере рН 8,0. После 4 часов инкубации при 22 °С проводили восстановление азометиновых связей боргидридом натрия в течение 4 часов при комнатной температуре, добавляя его порошком из расчета 1 мг на 1 мл геля. Аффинные сорбенты хранили при -20 °С в 50% растворе глицерина.

В качестве критерия отбора для достоверного выделения группы больных сахарным диабетом первого типа, из сыворотки которых выделялись ИСФ, помимо диагноза эндокринолога, использовали величину процентного содержания гликозилированной формы гемоглобина в капиллярной крови испытуемых (% Гб).

Метод, примененный для определения процента гликогемоглобина, является аналогом метода, использованного фирмой «Pierce Chemical Company» в диагностическом наборе «Glyco Gel Test» [8]. Принцип метода основывается на аффинном выделении гликозилированной формы гемоглобина, специфически взаимодействующей с иммобилизованной на силикагеле бороновой кислоте, способной связывать соединения, имеющие цисдиольные группировки.

Для определения % Гб в капиллярной крови больных сахарным диабетом использовали гемолизаты, приготовленные из 0,2 мл гепаринизированной капиллярной крови. Пробу крови суспендировали в 10 мл физиологического раствора и центрифугировали при 2000 об/мин. в течение 10 минут. Надосадок отбрасывали, эритроциты вновь суспендировали в физиологическом растворе и дважды повторяли центрифугирование. Отмытые эритроциты лизировали добавлением 0,4 мл дистиллированной воды. Гемолизат выдерживали 5 минут для завершения лизиса эритроцитов и центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об./мин. для удаления стромы эритроцитов. Содержание гликогемоглобина в пробе определяли сразу после приготовления гемолизата или в течение одного месяца при хранении при -20 °С.

Для разделения фракций гликозилированного и негликозилированного гемоглобина на колонку, содержащую 2 мл аффинного сорбента с иммобилизованной фенолбороновой кислотой, уравновешенную 0,025 М натрий-фосфатным буфером рН 8,5, наносили 0,4 мл ранее приготовленного гемолизата. Температуру растворов и колонки поддерживали в пределах 20–24 °С. После проникновения гемолизата в слой сорбента ток буфера останавливали на 15 минут для облегчения связывания гликогемоглобина с иммобилизованной фенолбороновой кислотой. Затем сорбент промывали 25 мл стартового буфера для сбора фракции гемоглобина, не содержащей остатков глюкозы (фракция 1). Гликозилированный гемоглобин элюировали с колонки тем же буфером, содержащим 200 мМ конкурирующего моносахарида — сорбитола (фракция 2). Элюцию продолжали до исчезновения поглощения фракции элюата в области поглощения гемоглобина — при 414 нм. Следы гликогемоглобина отмывали от сорбента 20 мл элюирующего буфера и проводили регенерацию колонки 50 мл 0,0001 М соляной кислоты рН 4,0. Затем колонку уравнивали стартовым буфером рН 8,5 и проводили следующие определения. Процент гликогемоглобина в пробе по отношению к общему содержанию гемоглобина определяли по формуле:

$$\% \text{ Гб} = \frac{\text{ОП}414(2) \times 100\%}{\text{ОП}414(1) + \text{ОП}414(2)},$$

где: % Гб — % содержания гликозилированного гемоглобина, ОП414 — оптическая плотность при 414 нм фракции 1, ОП414 — оптическая плотность при 414 нм фракции 2.

Хроматографическое разделение фракций гемоглобина регистрировали при помощи проточного спектрофотометра «Uvicord-2» и самописца фирмы ЛКВ. Значения % Гб, соответствующие нормальному уровню гликемии, составляют 4–8%; удовлетворительно-му уровню компенсации нарушений углеводного обмена соответствует 8–10% Гб, величина показателя более 10% свидетельствует о неудовлетворительной компенсации нарушений углеводного обмена у больных сахарным диабетом.

Для выделения ИСФ компонента было отобрано 100 проб крови больных сахарным диабетом первого типа с содержанием % Гб в пределах от 10,3 до 18,6%.

Выделение ИСФ из крови здоровых доноров проведено из проб крови 100 добровольцев 20–25 лет с содержанием Гб от 4 до 7,0 %.

Количественное определение сывороточных факторов, специфически связывающих инсулин, в исходных сыворотках и пробах, полученных в результате аффинного выделения ИСФ, проводили методом титрования в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с эритроцитами барана, сенсibilизированными инсулином из расчета одна единица инсулина (0,4 мг) на 1 мл 50% стабилизированных формалином эритроцитов, приготовленных по [9]. Реакцию проводили в 96-луночных полистироловых планшетах с U-образными лунками. В лунках планшета готовились двоичные разведения испытуемых сывороток на разведенном в 10 раз мясопептонном бульоне, затем в каждую лунку вносили равный объем (100 мкл) 5% сенсibilизированных инсулином эритроцитов. В контрольные лунки испытуемую сыворотку не вносили (контроль 1). Для исключения ложно-положительной реакции с молекулами, расположенными на поверхности эритроцитов барана, проводили параллельное титрование испытуемых сывороток с использованием 5% стабилизированных эритроцитов барана, несенсibilизированных инсулином (контроль 2).

Аффинную хроматографию на конканавалине А, иммобилизованном на ПВС-носителе, проводили при рН 7,2 в физиологическом растворе, содержащем 0,001 М хлорида магния; регенерацию колонки проводили 0,1 М уксусной кислотой, приготовленной на 0,14 М хлориде натрия.

Концентрацию гормонов в полученных пробах определяли на автоматическом анализаторе Amerham с использованием наборов Amerlite по прилагаемой инструкции.

Для определения степени гетерогенности ИСФ и идентификации в полученном комплексе связываю-

щих инсулин гликопротеинов известных транспортных веществ сыворотки крови по их электрофоретической подвижности проведено электрофоретическое разделение в нитроцеллюлозных пленках ИСФ, выделенных из 20 сывороток здоровых доноров и 20 сывороток больных сахарным диабетом с использованием системы Microtech 648 РС.

## Результаты и обсуждение

Методом электрофореза в нитроцеллюлозных пленках установлено, что в ИСФ из сывороток больных сахарным диабетом содержится в 2 раза больше  $\gamma$ -глобулинов ( $41 \pm 1,83\%$ ) по сравнению с их количеством в ИСФ из сывороток здоровых доноров ( $21 \pm 0,95\%$ , табл. 1). Очевидно, это обусловлено повышенным содержанием специфических к инсулину иммуноглобулинов у больных сахарным диабетом. Полученные данные согласуются с данными литературы о появлении в сыворотке больных сахарным диабетом антител к инсулину [10].

Обращает на себя внимание тот факт, что значительная часть связанных с инсулином белков сыворотки здоровых доноров ( $25,9 \pm 1,75\%$ ) представлена альбумином или белком, имеющим ту же электрофоретическую подвижность. При сахарном диабете первого типа этот транспортный белок в связывании с инсулином участия не принимает: на электрофореграммах связывающих инсулин веществ, выделенных из сывороток больных сахарным диабетом, фракция с подвижностью альбумина не выявлена (табл. 1).

Электрофоретически наиболее подвижной фракцией связывающих инсулин гликопротеидов из сыворотки больных сахарным диабетом, является  $\alpha_1$ -глобулин, содержание которого составило  $21,5 \pm 1,12\%$ , в то время как в нормальных сыворотках аффинные к инсулину вещества с этой электрофоретической подвижностью отсутствуют. По данным литературы, в состав этой фракции входят многие белки острой фазы воспалительной реакции, такие как  $\alpha_1$ -антитрипсин, протромбин,  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин (орозомукоид),  $\alpha$ -липопротеиды [11, 12, 13], многие из которых выполняют транспортную функцию и относятся к липокалинам. Один из наиболее изученных липокалинов —  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин — способен взаимодействовать с конканавалином А за счет концевой маннозы углеводного компонента его молекулы [4]. Для проверки предположения о его присутствии в ИСФ больных сахарным диабетом проведено истощение связывающих инсулин гликопротеидов, выделенных из сывороток больных диабетом, на иммобилизованном

**Таблица 1**  
**Фракции связывающих инсулин сывороточных**  
**гликопротеидов, полученные методом электрофореза**  
**в нитроцеллюлозных пленках**

Название фракции	I, %	II, %	III, %
Альбумин	25,9±1,75	0,0	0,0
$\alpha_1$ -глобулин	0,0	21,5±1,12	0,0
$\alpha_2$ -глобулин	33,0±1,54	18,9±0,87	17,0±0,65
$\beta$ -глобулин	20,0±1,26	18,5±1,07	14,5±1,07
$\gamma$ -глобулин	21,1±0,95	41,1±1,83	38,0±1,5

I — содержание фракций в инсулин-связывающем факторе здоровых доноров (%),

II — содержание фракций в инсулин-связывающем факторе больных сахарным диабетом (%),

III — содержание фракций в инсулин-связывающем факторе больных сахарным диабетом (%) после истощения на сорбенте с иммобилизованным конканавалином А

конканавалине А. Как следует из результатов, приведенных в таблице 1, после истощения на электрофореграмме фракция с подвижностью  $\alpha_1$ -глобулинов исчезает.

Таким образом, вероятно, что в сыворотке больных сахарным диабетом, наряду с другими транспортными белками, в образовании комплекса с инсулином принимает участие один из гликопротеидов острой фазы воспалительной реакции —  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин.

В связывающей инсулин фракции здоровых доноров выявлено примерно двукратное превышение содержания фракции с подвижностью  $\alpha_2$ -глобулина по сравнению со связывающей инсулин фракцией больных сахарным диабетом (33,0±1,54% по сравнению с 18,5±1,07%, табл. 1). Как следует из полученных данных, в транспорт инсулина у здоровых доноров основной вклад вносят относительно менее заряженные транспортные молекулы — альбумин и  $\alpha_2$ -глобулин.

Электрофоретической подвижностью  $\alpha_2$ -глобулина обладают многие известные транспортные гликопротеиды сыворотки крови:  $\alpha_2$ -макроглобулин, гаптоглобин, церулоплазмин. Таким образом, в транспорте инсулина в крови здоровых доноров, вероятно, наряду с альбумином также принимают участие липокалины.

Подтверждением справедливости этого утверждения служит присутствие в ИСФ здоровых доноров 6,7±0,3 нг/мл  $\alpha$ -фетопропротеина, выявленного в пробах

иммунолюминесцентным методом. Как известно,  $\alpha$ -фетопропротеин образует нековалентные комплексы с полиненасыщенными жирными кислотами, билирубином, некоторыми стероидными гормонами и другими биологически активными лигандами, то есть обладает свойствами, характерными для липокалинов [14]. В ИСФ больных диабетом этот гликопротеид не выявлен.

Следовательно, полученные данные позволяют предположить, что в транспорте инсулина в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом первого типа принимают участие различные липокалины, в частности,  $\alpha$ -фетопропротеин — в норме и  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин — при диабете.

Различие связывающих инсулин компонентов сывороток здоровых доноров и больных сахарным диабетом в содержании  $\beta$ -глобулина оказалось недостоверным (20,0±1,26% — для здоровых доноров и 18,5±1,07% — для больных сахарным диабетом).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что инсулин в крови человека наряду с альбумином транспортируется также липокалинами, подобно гидрофобным гормонам и другим биологически активным лигандам. Как следует из анализа электрофоретических спектров и данных иммунолюминесцентного анализа, состав липокалинов, формирующих комплекс с инсулином в норме и при сахарном диабете, очевидно, различен. В норме комплекс с инсулином наряду с другими сывороточными белками образует  $\alpha$ -фетопропротеин, известный своими иммуносупрессирующими свойствами [15], при сахарном диабете —  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин.

Для проверки предположения о том, что в транспорте инсулина принимают участие липокалины, одним из основных свойств которых является способность связывать низкомолекулярные гидрофобные молекулы [16], в полученных фракциях связывающих инсулин гликопротеидов было проведено определение липидов.

В ИСФ из сывороток здоровых доноров содержание холестерина составило 0,07±0,0004 ммоль/л, а в ИСФ больных сахарным диабетом — 0,08±0,0007 ммоль/л.

Триглицериды составили в пробах здоровых доноров 0,1010±0,003 ммоль/л, в пробах больных сахарным диабетом — 0,0944±0,0025 ммоль/л.

Итак, наличие липидного компонента в связывающих инсулин гликопротеидах следует считать доказанным. Достоверного различия содержания холестерина и триглицеридов в сравниваемых пробах не было выявлено.

Аналогично близкие значения были получены для процентного содержания пре- $\beta$ -липопротеинов и липопротеинов, определенных электрофоретически.

Иммунолюминесцентным методом установлено, что в связывающих инсулин фракциях сыворотки крови и здоровых доноров и больных сахарным диабетом первого типа присутствуют гидрофобные гормоны. В пробах обнаружены: тироксин в концентрации  $11,0 \pm 0,5$  нмоль/л, трийодтиронин в концентрации  $1,3 \pm 0,06$  нмоль и  $7,0 \pm 0,03$  нмоль тестостерона. В то же время в изучаемом транспортном комплексе выявлены незначительные количества гидрофильных гормонов: 1 МЕ/мл хориогонина, 0,03 мкМЕ/мл тиреотропного гормона, 0,5 МЕ/мл пролактина.

Выявление гормонов в пробах связывающих инсулин гликопротеидов служит дополнительным свидетельством того, что выделенные гликопротеиды выполняют функции, идентичные функциям липокалинов.

### Заключение

По современным представлениям, транспортные гликопротеины сыворотки крови — липокарины — в кровотоке вступают в сложные взаимодействия с другими белками сыворотки крови и транспортируемыми веществами [16]. Транспортные молекулы образуют сложный комплекс, обеспечивающий доставку транспортируемых веществ (гормонов, гидрофобных витаминов и т.д.) не только за счет их специфических рецепторов, но и за счет клеточных рецепторов к транспортным гликопротеидам. Установлено, что в сыворотке происходит взаимодействие липокалинов между собой и другими сывороточными белками. Так, липокарины нейтрофилов связываются с лейкоцитарной желатиной, причем связывание происходит за счет формирования ковалентных дисульфидных связей [12, 13]. Белок, связывающий ретинол, в плазме обычно комплексируется с транстиретином, переносящим тиреоидные гормоны. Следовательно, формируя единый информационный комплекс, липокарины способны доставлять широкий спектр гормонов к клеткам, даже не имеющим специфических к этим гормонам рецепторов.

Согласно нашим данным, в этот комплекс включаются также инсулин и ряд гидрофильных гормонов, таких как хориогонин, тиреотропный гормон, пролактин. То есть полученные факты свидетельствуют о существовании в сыворотке крови человека единого для многих гидрофобных и гидрофильных гормонов транспортного комплекса, доставляющего не только гидрофобные, но и гидрофильные гормоны клеткам-мишеням. Вероятно,

фракция «свободного инсулина» реально представляет собой комплекс инсулина и транспортных гликопротеидов, в том числе относящихся к семейству липокалинов. В состав этого комплекса входят гормоны и другие гидрофобные вещества, находящиеся в лабильной связи и равновесии с рецепторами клеток-мишеней. Доступность инсулина в этом комплексе для связывания с клеточными рецепторами и длительность его присутствия в сыворотке, очевидно, зависят от свойств гликопротеидов, в комплексе с которыми инсулин присутствует в данной сыворотке.

Полученные нами данные свидетельствуют о различии в составе транспортных молекул, входящих в комплекс с инсулином у здоровых доноров и больных сахарным диабетом первого типа. Альбумин, составляющий  $25,9 \pm 1,75\%$  всех связывающих инсулин белков сыворотки в норме, не принимает участия в транспорте гормона в крови больных сахарным диабетом. В то же время в электрофоретических спектрах больных появляется фракция  $\alpha_1$ -глобулинов, вероятно, представляющая собой  $\alpha_1$ -кислый гликопротеин. В норме в ИСФ выявлено присутствие  $\alpha_2$ -фракции и наличие в числе связывающих инсулин гликопротеидов  $\alpha$ -фетопротейна, известного своими иммуномодулирующими свойствами [14]. Так как в составе комплекса присутствуют и другие гормоны, правомерно предположить, что при сахарном диабете механизм доставки к клеткам-мишеням нарушен не только для инсулина, но и для других гормонов.

Подводя итог сказанному, следует заключить, что инсулин, подобно множеству других гормонов, формирует в крови комплекс с транспортными гликопротеидами, состав которых определяет эффективность доставки гормона к клеткам-мишеням. Возможно, именно состав транспортных молекул, формирующих данный комплекс, определяет реакцию иммунной системы на транспортируемый гормон, вероятность развития аутоиммунной реакции и скорость его элиминации из кровяного русла.

### Литература

1. Касаткина Э.П. Сахарный диабет у детей и подростков. — М.: Медицина, 1996. — 240 с.
2. Старосельцева Л.К. Гормоны поджелудочной железы в патогенезе сахарного диабета // Вестник АМН СССР. — 1983. — № 2. — С. 28–33.
3. Грачева Н.К., Харитоненков И.Г. // Лабораторное дело. — 1977. — С. 8–13.



4. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. 2 т. — М.: Мир. — 1993. — С. 247–263.
5. Гарипова М.И., Умнова В.Ю., Штыкова Л.И. Инсулинсвязывающий компонент сыворотки человека в норме и при заболевании сахарным диабетом первого типа // Вестник Башкирского университета. — 2005. — № 2. — С. 46–48.
6. Гарипова М.И., Баранова М.В., Розова О.П. Аффинное выделение ннсулинсвязывающего компонента сыворотки крови человека и изучение его биохимической природы // Вестник Башкирского университета. — 2005. — № 4. — С. 44–46.
7. Гарипова М.И., Фролова И.С., Клеева О.Б., Кузнецов В.П. Новый иммуносорбент на основе поливинилового спирта для очистки интерферона // Доклады РАН. — 1993. — Т. 328. — № 6. — С. 736–739.
8. Давидович М.Г., Гарипова М.И. Пористый силикагель, модифицированный глицерил-пропилсиланом и эпихлоргидрином с иммобилизованной мета-аминофенилбороновой кислотой в качестве сорбента для аффинного определения гликозилированного гемоглобина // Изобретения и полезные модели. — 2004. — № 17. — С. 564–565.
9. Гарипова М.И., Хавкин Ю.А., Киреева Т.А. Исследование молекулярной гетерогенности моноклональных и поликлональных антител / Тез. докл. 5 Всесоюзный биохимический съезд. Киев. 1986. — С. 34.
10. Atkinson M., Maclaren N., Scharp D. // Lancet. — 1990. — Vol. 335. — P. 1357–1360.
11. Bratt T. // Biochim. biophys. acta. — 2000. — Vol. 1482. — P. 318–326.
12. Fournier T., Medjoubi N.N., Porquet D. // Biochim. biophys. acta. — 2000. — Vol. 1482. — P. 157–171.
13. Logdberg L., Wester L. // Biochim. biophys. acta. — 2000. — Vol. 1482. — P. 284–297.
14. Решетников С.С. Иммуноферментный анализ альфа-фетопротейна. Использование в диагностике заболеваний человека // Новости «Вектор-Бест». — 1997. — № 6. — С. 12–16.
15. Пухальский А.Л., Шмарина Г.В., Лютов А.Г. и др. // Бюлл. эксперим. биол. мед. — 2001. — Т. 131. — С. 564–567.
16. Flower D.R. The lipocalin protein family: structure and function // Biochem. J. — 1996. — Vol. 318. — P. 1–14.

*Список сокращений*

ИСФ — инсулин-связывающий фактор,  
 ПВС-носитель — носитель на основе поливинилового спирта,  
 % Гб — процентное содержание гликозилированной фракции гемоглобина,  
 РПГА — реакция пассивной гемагглютинации,  
 Кон А — конканавалин А.

## HUMAN INSULIN-BINDING SERUM GLYCOPROTEIN AFFINITY PREPARATION AND INVESTIGATION OF ITS DIVERSITY IN DIABETIC AND NORMAL SERA

M.I. GARİPOVA, N.A. KİREEVA, T.V. MORUGOVA, O.N. ELİSEEVA, A.S. PERSHINA,

*Biology Department of Bashkiriа State University, Ufa*

By method of affinity adsorbent insulin-binding serum blood components of healthy donors and diabetics were prepared. It was shown, that electrophoretically diverse lipocalin similar glycoproteins were forming complex with insulin in diabetic and healthy sera. Insulin-binding component composition was different in diabetic and normal sera. In normal serum at the same time with albumin,  $\alpha$ -fetoprotein with known immunomodulating properties took part in insulin-binding complex, in diabetic one —  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. In genesis of insulin-dependent diabetes at the electrophoretic spectra of insulin-binding glycoprotein  $\gamma$ -globulin strip increased. It was supposing, that in human blood serum glycoproteins were forming general transport complex of a great number of hydrophobic and hydro-philic hormones, including insulin. There were many hormones and other physiologically active substances in this complex. Substances were in labile bond with glycoproteins and were forming balance with cell receptors. Insulin accessibility to cell receptors, serum half-life period, its immune recognizing, in all probability, were determining by insulin-binding transport molecule properties of serum.

*Keywords:* affine sorbent, insulin-binding serum glycoproteins, type one diabetes, lipocalins.

## ХОМИНГ-ЭНДОНУКЛЕАЗА SegB БАКТЕРИОФАГА T4: БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

В.С. БРОК-ВОЛЧАНСКАЯ\*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино Московской области*

Ранее было показано, что ген *segB*, расположенный в кластере генов тРНК фага T4, кодирует сайт-специфическую хоминг-эндонуклеазу, относящуюся к GIY-YIG семейству хоминг-эндонуклеаз. В данной работе определялись физико-химические особенности SegB, изучались проявление эндонуклеазной активности и стабильность фермента при различных условиях. Фермент наиболее активен в щелочных значениях pH, с максимумом при pH 8,0–8,5. Температурный оптимум для SegB находится в области 30–35 °С. Сходно с другими хоминг-эндонуклеазами, активность SegB зависит от присутствия металлов и уменьшается в ряду  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ . Ионы  $Zn^{2+}$  в концентрации 0,1 мМ ингибируют активность SegB, наблюдаемую в присутствии 10 мМ  $Mg^{2+}$ , до 96%. Ионы  $Na^+$  и  $K^+$  также тормозят общую активность фермента. БСА и неионный детергент Тритон X-100 стабилизируют фермент. Сделано предположение, что при расщеплении SegB использует механизм «один-металл».

*Ключевые слова:* эндонуклеаза, биохимия, катионы.

### Введение

Активное изучение хоминг-эндонуклеаз связано с их уникальным свойством узнавать протяженную до 40 п.н. вырожденную последовательность. Благодаря этому свойству, хоминг-эндонуклеазы могут служить хорошим подспорьем в работе с целыми геномами. Считается, что в природе гены, кодирующие хоминг-эндонуклеазы, являются эгоистическими мобильными элементами, которые распространяются с помощью ретровирусного рекомбинационного процесса превращения аллели, не содержащей ген эндонуклеазы, в аллель, содержащую ген, называемого хомингом [1]. На основе присутствия консервативных аминокислотных мотивов в гидролизующем домене, хоминг-эндонуклеазы объединены в 4 семейства: LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H и His-Cys [2], различные аминокислотные остатки которых выполняют структурную и/или каталитическую функцию. Для катализа расщепления всех хоминг-эндонуклеаз необходимо связывание их активных

центров с двухвалентными катионами. В настоящее время сформировалось две модели участия катионов в катализе — механизм «один — металл» (показан для представителей His-Cys семейства) и «два — металла» (показан для представителей LAGLIDADG) [3].

Эндонуклеаза SegB, наряду с другими Seg-эндонуклеазами фага T4, относится к GIY-YIG семейству хоминг-эндонуклеаз, поскольку на N-конце этих белков имеется вырожденный вариант GIY-YIG мотива [4]. Показано, что SegA, SegB, SegE, SegF и SegG являются  $Mg^{2+}$ -зависимыми сайт-специфическими эндонуклеазами [5–9]. SegA, SegB и SegE узнают вырожденные последовательности и проявляют иерархию в узнавании сайтов [5–7].

Целью данного исследования является определение физико-химических особенностей и характеристика основных биохимических свойств SegB.

### Материалы и методы

**Конструирование плазмиды pURB1sB.** Плазида pURB1sB содержит фрагмент области генов тРНК фага RB1 размером 1071 п.н., который был амплифицирован при помощи ПЦР с праймерами 1 и 2 и клонирован в SalI - PstI сайты pUC19 [10]. Процедуру клонирования и ПЦР проводили стандартными методами [11].

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Брок-Волчанская В.С.,  
младший научный сотрудник лаборатории молекулярной  
микробиологии, Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
142290 Пушкино Московской области, проспект Науки, 5  
Факс: +7 (495) 956-33-70  
E-mail: verakh@gmail.com

**Олигонуклеотидные праймеры.**

1 ttgtcgACTCATACCGCACTGATTAATACC  
 2 ttctcgcAGGCCATATCTCAACCATATCC

**Определение эндонуклеазной активности SegB**

**in vitro.** Стандартная реакционная смесь содержала 10 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ, 100 мМ NaCl, 0,1 мг/мл БСА и 0,02% Тритон X-100, 0,5 мкг ДНК плазмиды ρURB1sB, линеаризованной эндонуклеазой рестрикции Eco31I, а также 0,5 ед. эндонуклеазы SegB в 20 мкл. Реакцию проводили при 30 °С в течение 1 ч и останавливали добавлением ЭДТА до концентрации 50 мМ с последующим охлаждением во льду. За одну единицу активности SegB принято количество фермента, необходимое для 50% расщепления 1 мкг ДНК плазмиды ρURB1sB за 1 ч при 30 °С.

**Программное обеспечение.** Для вычисления физико-химических параметров белка использовали программу ProtParam.

Для поиска известных доменов и мотивов в аминокислотной последовательности SegB использовали базу данных Pfam (<http://pfam.wustl.edu/>).

Графическую обработку отсканированных изображений фотографий проводили в программе OptiQuant v.3.0. Значение MR высчитывали как процент яркости полосы от максимально яркой полосы, в качестве которой была использована контрольная проба, содержащая плазмиду ρURB1sB, не обработанную SegB. Для построения графиков использовали программу SigmaPlot Graph v.8.0.

**Результаты**

Ранее ген *segB* (GenBank accession no. Z69338) был клонирован в плазмиду ρЕТ-15b, экспрессирован в системе промотор/РНК полимеразы фага Т7 и получен гомогенный препарат SegB последовательной хроматографией на фосфоцеллюлозе, Ni-NTA агарозе, гидроксилпатите и Моно-S [6]. Чтобы охарактеризовать свойства SegB, были применены теоретический и экспериментальный подходы.

На основе аминокислотной последовательности SegB были рассчитаны основные физико-химические параметры белка и предсказана его доменная организация (табл. 1).

Чтобы определить биохимические свойства фермента, эндонуклеазную активность SegB тестировали *in vitro* при различных условиях. Как известно, ферменты очень чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. При определении зависимости

**Таблица 1**

**Основные физико-химические свойства и предсказанная доменная организация SegB**

Количество аминокислот	221
Молекулярная масса	26145,8 Да
Общее количество «+» заряженных остатков (Arg + Lys)	41
Общее количество «-» заряженных остатков (Asp + Glu)	31
Теоретический рI	9,43
Индекс нестабильности	36,50
Алифатический индекс	63,08
Время полужизни ( <i>E. coli</i> , <i>in vivo</i> )	>10 ч

Домен	Начало	Конец
GIY-YIG	2	89
Low complexity	3	18
NUMOD3	157	170

активности SegB от рН оценивали ферментативную активность в различных буферных системах в диапазоне рН от 5 до 10,5. В качестве буферных систем использовали MES буфер (рН 5,0–6,0), Трис-НСl буфер (рН 7,0–9,5) и глицин-NaOH (рН 10–10,5). Эндонуклеаза SegB активна в широком диапазоне рН от 6,0 до 10,5 (рис. 1). При рН 5,0 гидролиз отсутствовал. С увеличением рН буфера активность фермента возрастала, и наибольшая скорость гидролиза субстратов достигалась в Трис-НСl буфере при рН 8,0–8,5. Изменение кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН приводило к некоторому снижению активности фермента.

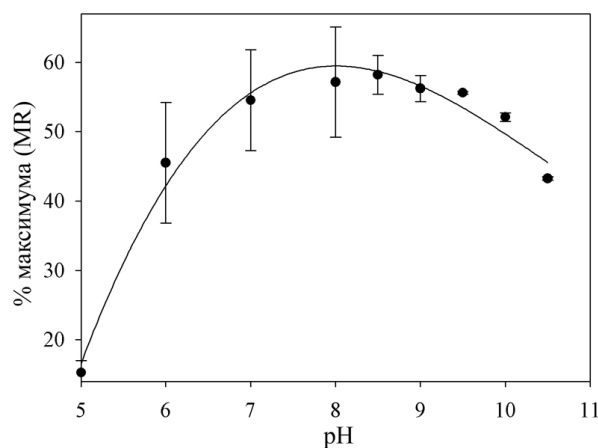


Рис. 1. Влияние рН на активность эндонуклеазы SegB

Результаты исследования влияния температуры на активность SegB представлены на рисунке 2. Максимальная активность SegB наблюдалась при 30–35 °C и соответствует температурному оптимуму 30–40 °C большинства ферментов. Уменьшение температуры реакционной смеси до 10 °C выражается в 5-кратном падении ферментативной активности. При 50 °C происходит потеря активности фермента вследствие его температурной инактивации.

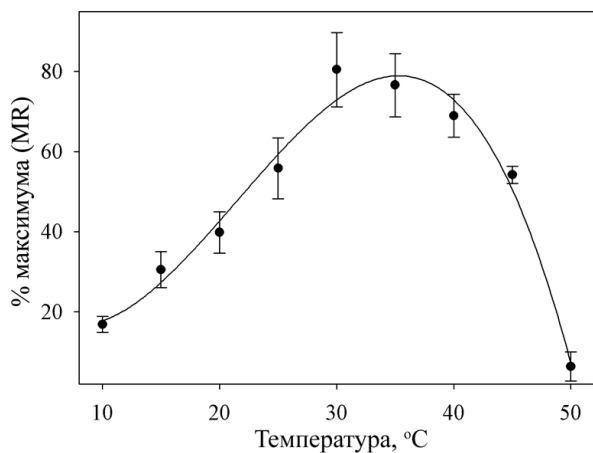


Рис. 2. Влияние температуры на активность эндонуклеазы SegB

Общей особенностью многих нуклеаз является использование связанных ионов металлов в качестве кофакторов. Проверено влияние основных двухвалентных  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и моновалентных  $Na^+$ ,  $K^+$  катионов на активность SegB (рис. 3–4). В отсутствие в реакционной смеси ионов  $Me^{2+}$  активность SegB не обнаруживается (рис. 3, проба 1), что указывает на абсолютную необходимость двухвалентных катионов для протекания ферментативной реакции, в то время как присутствие моновалентных катионов  $Na^+$  и  $K^+$  в реакционной смеси не обязательно для проявления активности фермента и даже снижает его общую активность (см. рис. 4).

Считается, что все ДНК-гидролизующие ферменты являются Mg-зависимыми ферментами, поэтому была исследована зависимость активности фермента от концентрации этих ионов (рис. 5). Оптимальная концентрация ионов  $Mg^{2+}$  находится в пределах 9–15 мМ. Ионы  $Ca^{2+}$  способны заменить ионы  $Mg^{2+}$  в реакционном буфере, но эффективность гидролиза при этом снижается в 2,5 раза (рис. 3, проба 2), в то время как замена ионов  $Mg^{2+}$  на ионы  $Mn^{2+}$ , наоборот, приводит к увеличению эффективности расщепления субстрата приблизительно в 2,6 раза (рис. 3, проба 5).

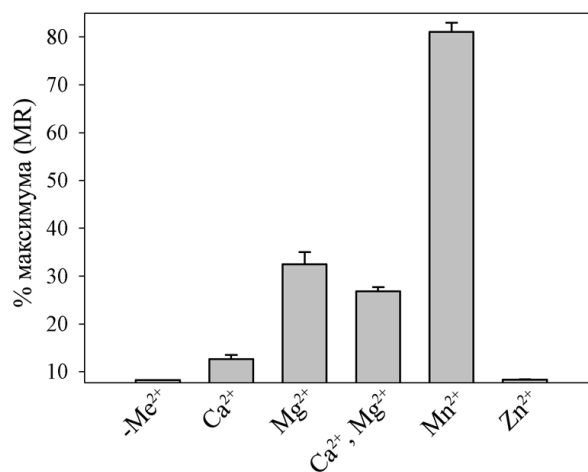


Рис. 3. Влияние двухвалентных катионов на активность эндонуклеазы SegB.

Конечная концентрация катионов в реакционной смеси составляет 10 мМ, за исключением пробы 4, содержащей одновременно по 5 мМ ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$

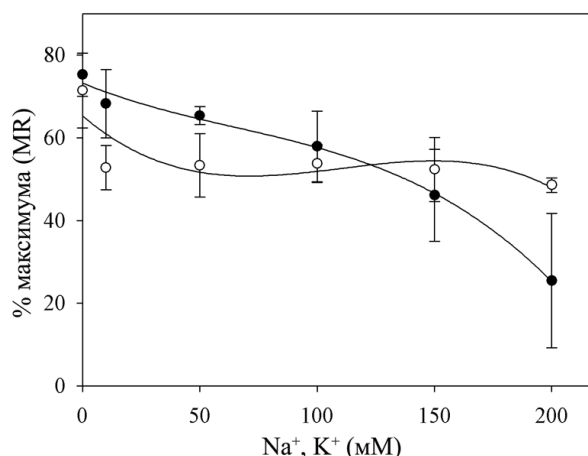


Рис. 4. Влияние моновалентных катионов  $Na^+$  и  $K^+$  на активность эндонуклеазы SegB

Ионы  $Zn^{2+}$  в 10 мМ концентрации не способны активировать протекание реакции (рис. 3, проба 6). Кроме того, в присутствии 10 мМ концентрации ионов  $Mg^{2+}$  и концентрации ионов  $Zn^{2+}$  0,01 мМ на 0,5 ед. фермента уже наблюдается понижение активности фермента примерно на 22%, а при 0,05 мМ концентрации ионов  $Zn^{2+}$  активность SegB ингибируется на 96% (рис. 6).

Во время работы с SegB было отмечено, что фермент быстро теряет активность при разведении. Присутствие 0,1 мг/мл БСА в смеси стабилизирует фермент (рис. 7). Однако инкубация фермента с 0,02% Тритон-Х100, приводила к большей стабилизации фермента по сравнению с БСА (рис. 8).

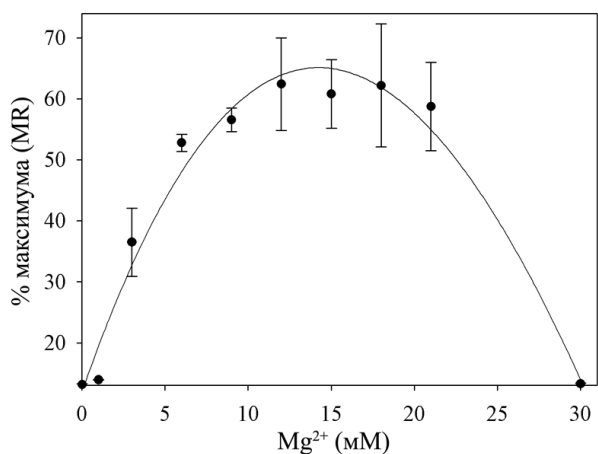


Рис. 5. Влияние катионов  $Mg^{2+}$  на активность эндонуклеазы SegB

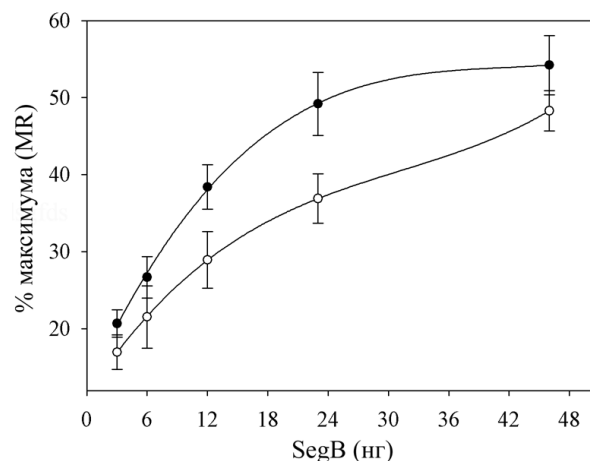


Рис. 7. Влияние БСА на активность эндонуклеазы SegB. Белыми кружками обозначено отсутствие, черными — присутствие БСА (0,1 мг/мл) в реакционной смеси

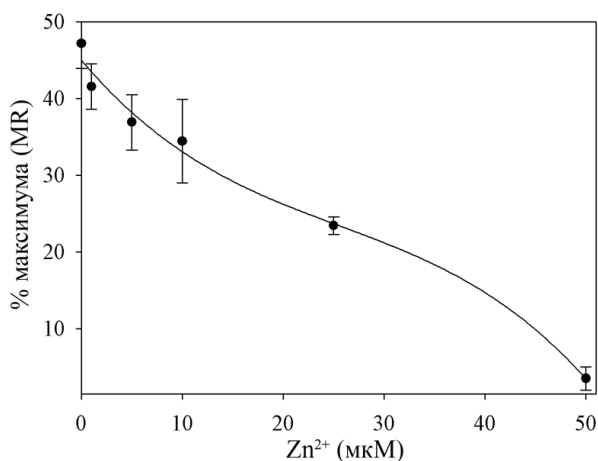


Рис. 6. Влияние катионов  $Zn^{2+}$  на активность эндонуклеазы SegB в присутствии 10 мМ катионов  $Mg^{2+}$

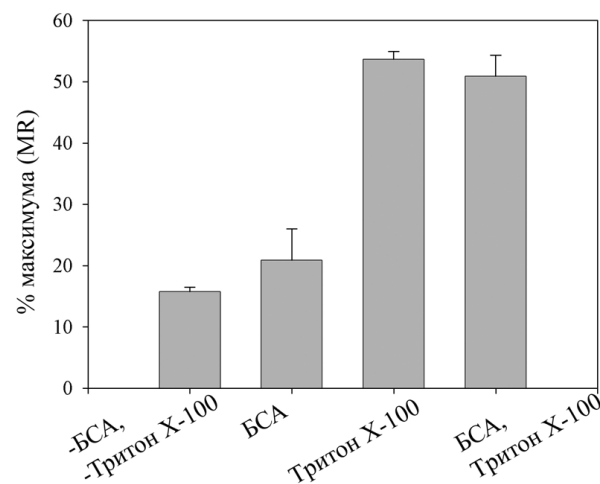


Рис. 8. Влияние БСА и Тритон-Х100 на активность эндонуклеазы SegB. Черными кружками обозначено присутствие, белыми — отсутствие NaCl в реакционном буфере

При проведении экспериментов было обнаружено, что количество участков расщепления ДНК сильно зависит от времени инкубации и соотношения фермент/субстрат. Длительная инкубация с ферментом, так же как и увеличение его концентрации в реакционной смеси, или присутствие 10 мМ концентрации ионов  $Mn^{2+}$ , приводит к появлению дополнительных участков расщепления, которые являются менее предпочтительными для гидролиза. Так, при снятии кинетических параметров расщепления 0,5 мкг ДНК 0,9 нг SegB в зависимости от времени было обнаружено, что в первые 7 минут реакции фермент гидролизует ДНК плазмиды pURB1sB по одному сайту (рис. 9, пробы 2, 3). Дальнейшая инкубация

с ферментом приводила как к увеличению эффективности гидролиза исходно расщепляемого сайта, так и к появлению дополнительных фрагментов, что свидетельствует о наличии дополнительных сайтов расщепления. Наши усилия в поиске условий, при которых будет происходить расщепление только по одному сайту, не увенчались успехом.

### Обсуждение

В данной работе были изучены основные физико-химические и биохимические свойства хоминг-эндонуклеазы SegB.

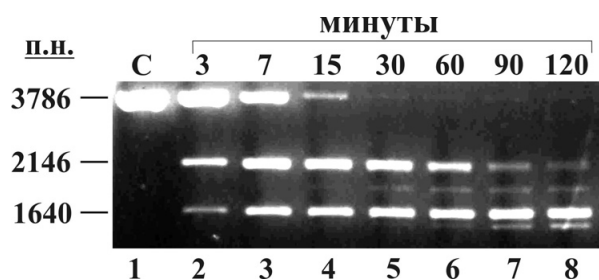


Рис. 9. Кинетика гидролиза эндонуклеазой SegB плазмиды pURB1sB

Эндонуклеаза SegB является небольшим по размеру белком и состоит из 221 аминокислоты. SegB обогащен положительно заряженными аминокислотами, поэтому изоэлектрическая точка белка 9,43 сдвинута в щелочную область и при нейтральном pH белок имеет достаточно сильный положительный заряд. Поскольку SegB является ДНК-гидролизующим ферментом, то положительный заряд белка будет способствовать его взаимодействию с отрицательно заряженной ДНК. Предсказано, что SegB является стабильным белком *in vivo*, поскольку индекс нестабильности  $<40$ , и не обладает повышенной термостабильностью, поскольку значение алифатического индекса невелико, что согласуется с полученными экспериментальными данными о полной потере активности SegB при 50 °C. Согласно компьютерному анализу, проведенному с помощью Pfam, а также косвенным данным, полученным ранее, SegB имеет доменную организацию и состоит из GIY-YIG каталитического и ДНК-связывающего домена, в котором обнаружен NUMOD3 мотив, участвующий в узнавании ДНК [6, 12, 13]. Помимо указанных доменов, в структуре SegB существует область «low complexity», которая содержит два высоко консервативных остатка Туг 6 и Туг 17. Для эндонуклеазы I-TevI из GIY-YIG семейства, установлено участие остатка Туг 17 в катализе [14].

Как уже упоминалось выше, все ДНК-гидролизующие ферменты используют двухвалентные катионы в качестве кофакторов, связывая от одного до трех ионов в активном центре, поэтому их присутствие в реакционной смеси является абсолютной необходимостью [15]. Профиль зависимости активности ферментов от различных катионов индивидуален, но в целом может вносить вклад в понимание устройства активного центра фермента и механизма катализа [3]. Так, профиль активности SegB в порядке уменьшения  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Zn^{2+} = 0$ , где ионы  $Zn^{2+}$  являются каталитически неактивными. Ионы  $Zn^{2+}$  обладают наибольшим размером среди изученных

ионов и отсутствие катализа можно было бы объяснить стерическими ограничениями активного центра и отсутствием связывания иона  $Zn^{2+}$  вследствие его большого размера, как в случае отсутствия связывания иона  $Ca^{2+}$  в центральном сайте I-CreI из семейства LAGLIDADG [16]. Однако для SegB обнаружено ингибирование  $Mg^{2+}$ -опосредованного расщепления небольшими количествами ионов  $Zn^{2+}$ , что, по-видимому, обусловлено конкуренцией ионов  $Zn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  за связывание с активным центром SegB, сходно с хоминг-эндонуклеазами I-DmoI и I-PorI, для которых было показано ингибирование реакции ионами  $Ca^{2+}$  за счет прямого связывания в каталитическом центре ферментов [17]. Кроме того, для некоторых ферментов было показано, что в небольших концентрациях каталитически неактивные катионы могут усиливать расщепление, опосредованное другим катионом, например,  $Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  [18]. Такой эффект, оказываемый каталитически неактивными катионами на расщепление, рассматривают как индикатор каталитического механизма «два-металла» [19]. Факт ингибирования, а не усиления, ионами цинка  $Mg^{2+}$ -опосредованного расщепления служит косвенным указанием на использование SegB механизма расщепления «один-металл».

Одной из характерных особенностей сайтов узнавания хоминг-эндонуклеаз является его вырожденность. Внешне вырожденность сайта проявляется в появлении дополнительных участков расщепления в субстрате. При увеличении количества SegB в реакционной смеси, так же, как и в случае родственных эндонуклеаз SegA, SegE и SegF [5, 7, 8] или в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ , сходно с PI-SceI и PI-PfuI, входящих в семейство LAGLIDADG [20, 21], в субстрате появляются дополнительные участки расщепления для SegB. Большинство эндонуклеаз предпочитает  $Mg^{2+}$  в качестве кофактора для оптимального гидролиза вследствие его благоприятных физико-химических свойств [22, 23]. Считается, что у некоторых нуклеаз в присутствии  $Mn^{2+}$  происходит ослабление специфичности расщепления вследствие разницы в координационных сферах ионов  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , которые включены в обеспечение субстратной специфичности [3]. Однако в присутствии небольших количеств ионов  $Mn^{2+}$  в реакционной смеси, SegB расщепляет субстрат специфически (данные не представлены). Возможно, что в присутствии ионов  $Mn^{2+}$ , по сравнению с равным количеством ионов  $Mg^{2+}$ , фермент приобретает повышенную каталитическую активность, и, как следствие, способность узнавать более вырожденные последовательности. Ускорение реакции расщепления может быть следствием или более высокого сродства ионов  $Mn^{2+}$  к активному

центру фермента, или лучшей способностью ионов  $Mn^{2+}$  уменьшать свободную энергию переходного состояния, образующегося при расщеплении фосфодиэфирной связи [15]. Наоборот, при замене ионов  $Mg^{2+}$  на  $Ca^{2+}$ , количество расщепленного субстрата уменьшается, что, по-видимому, происходит вследствие уменьшения скорости расщепления субстрата. При одновременном присутствии ионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  в реакционной смеси эффективность расщепления сравнима с таковой в присутствии только ионов  $Mg^{2+}$ , из чего можно сделать вывод о большем сродстве ионов  $Mg^{2+}$  к активному центру фермента, чем ионов  $Ca^{2+}$ .

### Заключение

SegB является Mg (Mn)-зависимой сайт-специфической эндонуклеазой с вырожденным сайтом узнавания, которая, в зависимости от вида катиона, связываемого в активном центре фермента, расщепляет субстрат с различной скоростью.

### Литература

1. Chevalier B.S. and Stoddard B.L. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intron mobility // *Nucleic Acids Res.* — 2001. — Vol. 29. — P. 3757–3774.
2. Belfort M. and Roberts R. Homing endonucleases: keeping the house in order // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25. — P. 3379–3388.
3. Guhan N. and Muniyappa K. Structural and functional characteristics of homing endonucleases // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2003. — Vol. 38. — P. 199–248.
4. Sharma M., Ellis R.L. and Hinton D.M. Identification of a family of bacteriophage T4 genes encoding proteins similar to those present in group I introns of fungi and phages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 6658–6662.
5. Sharma M. and Hinton D.M. Purification and characterization of the SegA protein of bacteriophage T4, an endonuclease related to proteins encoded by group I introns // *J. Bacteriol.* — 1994. — Vol. 176. — P. 6439–6448.
6. Brok-Volchanskaya V.S., Kadyrov F.A., Sivogriyov D.E., Kolosov P.M., Sokolov A.S., Shlyapnikov M.G., Kryukov V.M. and Granovsky I.E. Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA gene region occurring in co-infection with a related phage // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — doi:10.1093/nar/gkn053.
7. Кадиров Ф.А., Крюков В.М., Шляпников М.Г. и Баев А.А. SegE — новая сайтспецифическая эндодезоксирибонуклеаза бактериофага T4 // *Доклады РАН.* — 1994. — Т. 339. — С. 404–406.
8. Belle A., Landthaler M. and Shub D.A. Intronless homing: site-specific endonuclease SegF of bacteriophage T4 mediates localized marker exclusion analogous to homing endonucleases of group I introns // *Genes Dev.* — 2002. — Vol. 16. — P. 351–362.
9. Liu Q., Belle A., Shub D.A., Belfort M. and Edgell D.R. SegG endonuclease promotes marker exclusion and mediates co-conversion from a distant cleavage site // *J. Mol. Biol.* — 2003. — Vol. 334. — P. 13–23.
10. Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // *Gene.* — 1985. — Vol. 33. — P. 103–119.
11. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Ed.2. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
12. Derbyshire V., Kowalski J.C., Dansereau J.T., Hauer C.R. and Belfort M. Two-domain structure of the td intron-encoded endonuclease I-TevI correlates with the two-domain configuration of the homing site // *J. Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 265. — P. 494–506.
13. Sitbon E. and Petrokovski S. New types of conserved sequence domains in DNA-binding regions of homing endonucleases // *Trends Biochem. Sci.* — 2003. — Vol. 28. — P. 473–477.
14. Van Roey P., Meehan L., Kowalski J.C., Belfort M. and Derbyshire V. Catalytic domain structure and hypothesis for function of GIY-YIG intron endonuclease I-TevI // *Nat. Struct. Biol.* — 2002. — Vol. 9. — P. 806–811.
15. Galburt E.A. and Stoddard B.L. Catalytic mechanisms of restriction and homing endonucleases // *Biochemistry.* — 2002. — Vol. 41. — P. 13851–13860.
16. Chevalier B., Sussman D., Otis C., Noel A.J., Turmel M., Lemieux C., Stephens K., Monnat R.J. Jr. and Stoddard B.L. Metal-dependent DNA cleavage mechanism of the I-CreI LAGLIDADG homing endonuclease // *Biochemistry.* — 2004. — Vol. 43. — P. 14015–14026.
17. Lykke-Andersen J., Garrett R.A. and Kjems J. Mapping metal ions at the catalytic centres of two intron-encoded endonucleases // *EMBO J.* — 1997. — Vol. 16. — P. 3272–3281.
18. Feng H., Dong L. and Cao W. Catalytic mechanism of endonuclease V: A catalytic and regulatory two-metal model // *Biochemistry.* — 2006. — Vol. 45. — P. 10251–10259.
19. Vipond I.B., Baldwin G.S. and Halford S.E. Divalent metal ions at the active sites of the EcoRV and EcoRI restriction endonucleases // *Biochemistry.* — 1995. — Vol. 34. — P. 697–704.
20. Gimble F.S. and Stephens B.W. Substitutions in conserved dodecapeptide motifs that uncouple the DNA binding and

- DNA cleavage activities of  $\rho$ I-SceI endonuclease // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 5849–5856.
21. Komori K., Fujita N., Ichiyangi K., Shinagawa H., Morikawa K. and Ishino Y.  $\rho$ I-PfuI and  $\rho$ I-PfuII, intein-coded homing endonucleases from *Pyrococcus furiosus*. I. Purification and identification of the homing-type endonuclease activities // Nucleic Acids Res. – 1999. – Vol. 27. – P. 4167–4174.
22. Cowan J.A. Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry // Chem. Rev. – 1998. – Vol. 98. – P. 1067–1088.
23. Cowan J.A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes // Biometals. – 2002. – Vol. 15. – P. 225–235.

## HOMING ENDONUCLEASE SegB OF BACTERIOPHAGE T4: BIOCHEMICAL PROPERTIES

V.S. BROK-VOLCHANSKAYA

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino Moscow Region*

SegB gene is located in the cluster of tRNA genes of bacteriophage T4. It encodes the site specific homing endonuclease belonging to GIY-YIG family. In this work physicochemical properties of SegB were characterized and its endonuclease activity in different conditions was studied. The enzyme revealed the highest activity at pH 8.0–8.5, while the temperature optimum is 30–35 °C. Like other homing endonucleases, SegB is metal-dependent and its activity decreases in the order  $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ .  $Zn^{2+}$  ions in concentration 0.1 mM inhibit endonuclease activity of SegB, observed in presence of 10 mM of  $Mg^{2+}$ , up to 96%.  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  cations also inhibit its total activity. BSA and nonionic detergent Triton X-100 stabilize enzyme. It was suggested that SegB uses one-metal mechanism of cleavage.

*Keywords:* endonuclease, biochemistry, cations.



## БАКТЕРИОФЕРРИТИН КАК БИОСЕНСОР И НАНОСТРУКТУРА

С.С. АНТИПОВ<sup>1,2</sup>, К.В. КУРГАНОВ<sup>1</sup>, К.С. ЧЕМЕРИС<sup>1</sup>, О.Н. ОЗОЛИНЬ<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Московская область;<sup>2</sup> Воронежский государственный университет

В работе рассматриваются свойства многофункционального белка Dps, принимающего участие в утилизации ионов железа, окисляющего  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , формирующего феррогидритное ядро внутри белковой полости и являющегося одним из мажорных белков нуклеоида. Приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие о влиянии электромагнитного излучения на экспрессию гена *dps*, и обсуждаются перспективы использования бактериоферритина в качестве биосенсора и основы для создания новых материалов с заданными свойствами.

**Ключевые слова:** ферритин, Dps, наночастица, металлопротеин, электромагнитное излучение.

## Введение

Создание новых материалов с использованием биологических макромолекул является чрезвычайно перспективным направлением современной прикладной науки. Огромное число публикаций, в частности, посвящено оценке возможности прикладного использования природных накопителей ионов железа — ферритинов. Это сферические белки, состоящие из 24 одинаковых субъединиц с молекулярной массой  $\approx 18$  kDa. Внутри белковой глобулы субъединицы формируют полость, в которой накапливаются ионы железа в виде ориентированных в пространстве гидратированных оксидов ( $5 Fe_2O_3 \cdot 9 H_2O$ ), то есть феррогидритов. Общее число ионов железа в полости одного белка по разным данным составляет от 2500 до 4500, а размер ионного ядра не превышает 8 нм. Оно имеет ряд необычных свойств, которые можно изменять в широком диапазоне при дополнительном (или альтернативном) насыщении ферритинов оксидами других металлов. В зависимости от потребностей внутрибелковое ядро может быть антиферромагнетиком или ферромагнетиком. Именно поэтому ферритины являются чрезвычайно перспективным материалом для микроэлектроники. Имеются данные, свидетельствующие о возможности их использования для создания логических элементов нового поколения

[1], ячеек памяти с супервысокой плотностью хранения информации [2], квантовых электронных приборов [3], биомедицинских нанороботов, биосенсоров высокой чувствительности [4], многослойных бионанобатарей [5] и даже как «биореактор» для получения необычных сплавов, например CoPt [6]. Совершенно понятно, что все эти задачи могут быть решены с использованием ферритинов бактериального происхождения. В клетках *E. coli* имеется, по крайней мере, два таких белка. Один кодируется геном *bfg*. По структуре он похож на соответствующие белки высших организмов. Другим является Dps. В отличие от Bfg и аналогичных белков высших организмов он способен связываться с ДНК и функционирует в виде димера (преимущественная форма взаимодействия с ДНК) или додекамера (преимущественная форма окисления ионов железа и депонирования их в белковой полости). Каждая из субъединиц Dps окисляет 2 иона  $Fe^{2+}$ , восстанавливая одну молекулу пероксида. Помимо всего прочего, это способствует удалению  $H_2O_2$  из цитоплазмы, уменьшая продукцию активных форм кислорода в клетке. Ионы  $Fe^{3+}$  остаются связанными с додекамером Dps, формируя ионное ядро, состоящее из 400–500 молекул [7]. Поэтому, если в качестве природного «дозатора» наночастиц использовать Dps, размер соответствующих элементов будет в полтора раза меньше, что открывает дополнительные возможности по миниатюризации конечных конструкций.

Dps первоначально был обнаружен у *Escherichia coli* как белок, ассоциированный с ДНК в «голодающих» клетках (DNA-binding protein of starved cells), то есть в клетках, находящихся в стационарной фазе роста

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Озолин О.Н.,

Институт биофизики клетки РАН,

142290 Пущино, Московская область

E-mail: ozoline@icb.psn.ru

[8]. В этих условиях внутриклеточное содержание Dps достигает максимума и составляет 180000 молекул [9]. Во время экспоненциального роста в клетках находится только  $\approx 6000$  мономеров этого белка. Практически весь содержащийся в клетках Dps связан с ДНК. Это значит, что в условиях стационарного роста геном бактерий практически полностью «закрыт» этим белком (один мономер приходится на  $\approx 25$  пар оснований). Чрезвычайно большой интерес к Dps до последнего времени был вызван именно этой его функцией: поддерживать соответствующую скорости роста конформацию геномной ДНК. Кроме Dps, в этом участвуют еще несколько белков IHF, Fis, HU, StpA, H-Ns, CbpB, CbpA, DnaA, Lrp и IciA [10], а также белки аппарата транскрипции и факторы, контролирующие экспрессию генома. Все они влияют на конформацию нуклеоида и, следовательно, на все функции генома, но в стационарной фазе роста именно Dps является главным архитектурным фактором ДНК.

Очищенный Dps связывается с ДНК благодаря наличию кластера положительно-заряженных аминокислот в N-концевом домене и не обладает специфичностью к какой-либо последовательности нуклеотидов [10]. Поэтому он отнесен к семейству нуклеоид-связанных гистоноподобных белков. Связанные с ДНК додекамеры Dps могут агрегировать друг с другом, трансформируя ДНК в компактную форму [11]. Способность димерной формы Dps к агрегации пока не установлена. Участие Dps в депонировании ионов железа является его уникальной особенностью, отличающей его от других белков нуклеоида. Понятно, что изучение свойств Dps, так же, как и исследование молекулярных механизмов, задействованных в регуляции экспрессии соответствующего гена, представляется чрезвычайно актуальной задачей. Учитывая наличие феррогидритного ядра внутри белковой полости Dps, можно было предположить, что воздействием, способным повлиять на продукцию этого белка в бактериальных клетках, может быть внешнее электромагнитное поле. Поэтому были предприняты усилия для того, чтобы исследовать влияние электромагнитного излучения на продукцию в клетках бактериоферритина Dps.

### Материалы и методы

В работе были использованы клетки *E. coli* KР7600 W3110 (lacI<sub>g</sub> lacZ  $\Delta$ l galK2 galT22) (*E. coli* W3110). Их растили в среде LB при 30 °С до глубокой стационарной фазы и подвергали воздействию электромагнитного поля в пластиковых флаконах, пронизываемых для электромагнитного излучения (ЭМИ). До помеще-

ния в рабочую камеру клетки выращивали в одной колбе, разделяли на 2 части по 20 мл и подвергали действию электромагнитного излучения в течение одного часа в термостате, специально сконструированном для этих исследований [12]. Он состоял из двух камер, одна из которых была экранирована от ЭМИ. В ней размещали контрольный образец. Опытный образец помещали на расстояние 80 см от рупора антенны генератора ЭМИ Я2Р-76/2. Аэрация обоих образцов осуществлялась с использованием общей качалки, помещенной на дно термостата, поэтому условия роста экспериментального и опытного образцов были идентичными. Клетки облучали ЭМИ качающейся частоты (8,15–18 ГГц) с периодом перестройки 1 мсек. Центр облучаемого флакона фиксировали в точке, средняя мощность излучения в которой составляла 1 мкВт/см<sup>2</sup>.

Зависимость экспрессии гена *dps* исследовали методом полимеразной цепной реакции (PCR) в реальном времени. Суммарную фракцию клеточных РНК выделяли с использованием колонок фирмы Invitrogen в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Для реакции обратной транскрипции использовали фермент M-MuLV («Fermentas»). Выравненные по концентрации РНК (0,5–1 мкг в разных экспериментах) смешивали с праймером 5'-TATTCGATGTTAGACTCGAT-3' (2–6 пмоль) (Рис. 1) и «плавляли» 20 минут при 72 °С. Затем инкубировали 5 минут при 56 °С, переносили пробирки в 42 °С, добавляли буфер для ревертазы (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> и 50 mM DTT) и субстраты (конечная концентрация в пробе – 0,2 mM). После этого вносили 40 ед. обратной транскриптазы и проводили реакцию в течение 40–50 минут. Для инактивации фермента пробу прогревали 10 минут при 78 °С.

Количественную PCR проводили на приборе ДТ-322 (ДНК-Технология, Россия) с использованием SYBR Green (США) в качестве флуоресцентного зонда. Режим амплификации (30–35 циклов) после 4-минутного предварительного плавления кДНК с праймерами 5'-TATTCGATGTTAGACTCGAT-3' и 5'-CGATCATCTGGATACCATGG-3' был следующим: 94 °С (15 секунд) – 60 °С (20 секунд) – 72 °С – (20 секунд). Эффективность эмиссии зонда определяли в конце каждого цикла в течение 15 секунд. Во всех случаях качество PCR-продуктов контролировали электрофоретически в 5%-ном полиакриламидном геле (210 В, 100 мА). Количественный анализ уровня экспрессии осуществляли при помощи программы q\_PCR (ДНК-Технология).

## Результаты и обсуждение

Ранее методом двумерного электрофореза полипептидов было установлено, что кратковременное (5–60 минут) воздействие электромагнитного излучения сантиметрового диапазона (ЭМИ СВЧ), практически не влияя на рост бактериальной культуры, сопровождается некоторым изменением спектра синтезируемых в клетке белков [12]. Среди индуцируемых излучением полипептидов оказался белок, имеющий молекулярную массу и изоэлектрическую точку, близкую к Dps (18,6 kDa 5,7, соответственно). Именно поэтому было исследовано влияние ЭМИ СВЧ на содержание в бактериальных клетках соответствующей мРНК.

На рисунке 1 схематически показано расположение праймеров, использованных для полимеразной цепной реакции в реальном времени. Они были выбраны таким образом, чтобы регистрируемый сигнал отражал количество прочитанной до конца мРНК. Такое расположение праймеров максимально устраняет погрешности, обусловленные преждевременными остановками транскрипции на аттенуаторах.

Синтез мРНК гена *dps* начинается на промоторе  $P_{dps}$ , стартовая точка которого точно обнаруживается при сканировании генома компьютерной программой PlatProm [13]. Кроме нее и известного промотора  $P_{glnH}$  компьютерное сканирование исследуемого генетического локуса выявило еще два промотороподобных участка,  $P_{a1}$  и  $P_{a2}$ . Теоретически с этих промоторов может идти синтез РНК, антисмысловых к *dps*-мРНК. Выбирая праймеры для количественной полимеразной цепной реакции, мы учитывали и это обстоятельство. Выбранное расположение праймера 5'-ТАТТСГАТГТТАГАСТСГАТ-3' (левее  $P_{a1}$ ) снижает вероятность несанкционированной амплификации ДНК-копии РНК, потенциально синтезированной с  $P_{a1}$ , даже если из-за остаточной активности обратной транскриптазы [14] некоторое количество этих копий будет синтезировано во время первых циклов РСР.

Выбранные праймеры оказались высокоспецифичными и при амплификации давали только один продукт ожидаемой длины, как при использовании геномной ДНК в качестве матрицы, так и при постановке реакции с кДНК (Рис. 2С). На рисунке 2А в качестве примера приведены зависимости флуоресценции SYBR green от числа циклов амплификации кДНК для опытного и контрольного образцов. Динамика изменения флуоресцентного сигнала свидетельствует о позитивном влиянии физического воздействия на внутриклеточное

содержание мРНК гена *dps*. Это вполне соответствует предположению, сделанному на основании данных, полученных методом двумерного электрофореза белков. Так как синтез ампликонов не наблюдался в образцах, содержащих только РНК (без обратной транскрипции) (рис. 2С), можно полагать, что зарегистрированное изменение отражает реальную ситуацию. Это означает, что регуляторные системы бактериальных клеток реагируют на электромагнитное излучение, а в формировании адаптивного ответа может принимать участие бактериоферритин Dps.

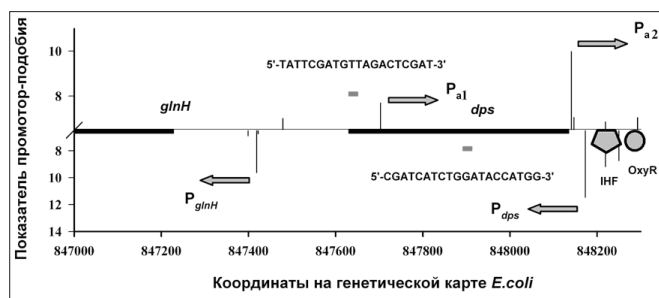


Рис. 1. Фрагмент генетической карты *E. coli*. Расположение генов указано черными прямоугольниками, направление транскрипции — стрелками. Столбиками выше и ниже оси X (для + и – нитей генома, соответственно) обозначены известные ( $P_{glnH}$  и  $P_{dps}$ ) и предсказанные с помощью компьютерной программы PlatProm промоторы. Серыми прямоугольниками обозначены позиции праймеров

Наши данные пока не позволяют судить о том, насколько велика роль Dps в активации собственной транскрипции. Несмотря на то, что он является мажорным белком нуклеоида, взаимодействие Dps с ДНК не определяется какой-то конкретной последовательностью оснований, а круг генов с зависящей от него экспрессией не известен. Позитивными регуляторами гена *dps* являются IHF (integration host factor) и OxyR (рис. 1). Гистоноподобный белок IHF, так же, как Dps, формирует структуру нуклеоида, но связывается со специфическими мотивами в ДНК. Он известен как фактор глобальной регуляции, контролирующей экспрессию, по крайней мере, 191 гена. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о координированном изменении биосинтеза в клетках IHF и Dps, по крайней мере, при переходе от логарифмической к стационарной фазе роста [10]. OxyR является ключевым регулятором транскрипции в условиях оксидативного стресса, выступая активатором или репрессором, по крайней мере, для 17 генов. Повышение концентрации пероксида приводит к индукции

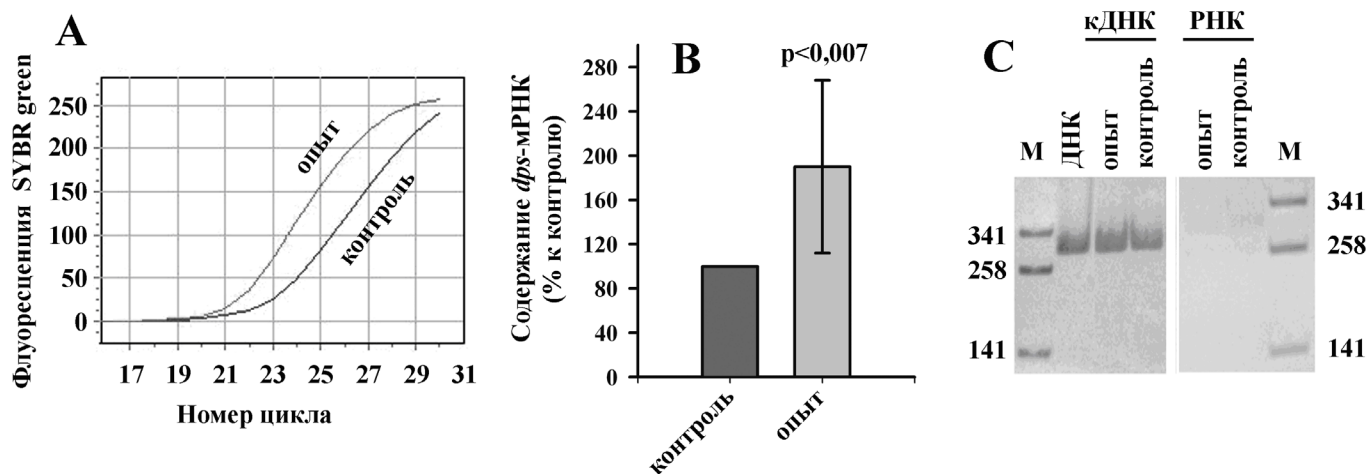


Рис. 2. Влияние ЭМИ СВЧ на внутриклеточное содержание мРНК гена *dps*. А) Пример зависимости флуоресценции SYBR green от числа циклов амплификации. кДНК была получена в реакции обратной транскрипции с использованием РНК, выделенной из клеток, подвергнутых облучению ЭМИ СВЧ (левая кривая) и из контрольной культуры (правая кривая). В) Результат статистического анализа результатов, полученных с использованием трех независимых препаратов РНК в экспериментах с двумя или тремя разведениями матрицы (правый столбик). Рассчитанное программой *q\_PCR* количество *Dps*-мРНК в контрольных клетках в каждом из экспериментов было принято за 100% (схематически показано слева). Значение  $p$  рассчитано в операционной системе Excel с использованием *t*-теста Стьюдента для 18 независимых измерений. С) Электрофоретический контроль специфичности полученных ампликонов с кДНК (ожидаемая длина ампликона — 281 нуклеотидная пара). Позитивным контролем, свидетельствующим об аутентичности синтезируемых фрагментов, были продукты, полученные в реакции с использованием ДНК в качестве матрицы (ДНК); негативным — продукты, полученные в реакции с использованием в качестве матрицы РНК, не подвергнутой обратной транскрипции (РНК) (негативный контроль, исключающий неспецифическую амплификацию). М — маркер молекулярной массы

регулона ОхуR. Такой же эффект закономерно должен наблюдаться и при недостатке агентов, восстанавливающих пероксид, в том числе при недостатке Dps. Кроме этого, в транскрибируемой с промотора *P<sub>dps</sub>* области генома компьютерной программой PlatProm обнаружено два промотора ( $P_{a1}$  и  $P_{a2}$ ), с которых может идти синтез регуляторных антисмысловых РНК. Образуя дуплексы с мРНК они могут влиять на ее стабильность ( $P_{a1}$ ) и на синтез белкового продукта ( $P_{a2}$ ). Для гена *dps*, таким образом, имеется несколько уже известных и предполагаемых путей активации транскрипции, хотя природа первичного сигнала на молекулярном уровне остается неизвестной.

Не исключено, что роль первичного магниторецептора выполняет именно додекамер Dps, обладающий собственным магнитным моментом. Если предположить, что электромагнитное излучение влияет на равновесие между димерной и додекамерной формой комплекса, облучение должно сопровождаться изменением компактности нуклеоида, от которой зависит профиль экспрессии всего генома. Очевидно, что другие ферритины, накапливающие ионы железа внутри белковой полости, тоже могут реагировать на электромагнитное излучение, но

только взаимодействующий с ДНК бактериоферритин Dps может трансформировать полученный сигнал в измененный профиль геновой экспрессии, то есть в адаптивный биологический ответ.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о влиянии электромагнитного излучения на экспрессию *dps*. Это открывает возможность использования его в качестве репортерного гена для мониторинга уровня техногенного излучения в окружающей среде. Магнитное поле Земли и электромагнитное излучение Солнца являются естественными компонентами среды обитания биологических объектов. Вариации их интенсивности, обусловленные внешними или техногенными факторами, вызывают реакцию практически у всех живых организмов. Поэтому создание биологических сенсоров, помогающих выбрать режим безопасного использования излучений широкого частотного и амплитудного диапазона, становится все более актуальным. Разработка бактериальной тест-системы, способной оперативно отслеживать уровень биологической

опасности, может стать существенным шагом вперед в этом направлении.

Наряду с этим способность Dps взаимодействовать с ДНК можно использовать для создания желаемого распределения в пространстве феррогидритных наночастиц, используя ДНК как структурообразующую матрицу. В зависимости от потребностей эта матрица может быть линейной, двумерной или трехмерной, причем любой конфигурации. Несмотря на то, что предпочтительной формой взаимодействия с ДНК, по-видимому, является димер, а не додекамер, структурное состояние Dps зависит от солевого состава среды и, возможно, от электромагнитного излучения. То есть процесс биокристаллизации, по-видимому, можно сделать управляемым.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-01066 и 08-04-01143.

## Литература

- Choi S.H., Kim J.-W., Chu S.-H., Park Y., King G.C., Lillehei P.T., Kim S.-J., Elliott J.R. Ferritin-templated quantum-dots for quantum logic gates / In: Proceedings of 12th SPIE Smart Structures and Smart Materials. — 2005. — Vol. 5763. — P. 213–232.
- Yamashita I. Fabrication of a two-dimensional array of nanoparticles using ferritin molecule // Thin Solid Films. — 2001. — Vol. 393. — P. 12–18.
- Jelinski L. Biologically related aspects in nanostructure science and technology / In: R&D status and trends in nanoparticles, nanostructured materials and nanodevices (eds: Siegel R.W., Hu E., Roco M.C.). 1999. National science and technology council.
- Jaaskelainen A., Harinen R.R., Soukka T., Lamminmaki U., Korpimaki T., Virta M. Biologically produced bifunctional recombinant protein nanoparticles for immunoassays // Anal. Chem. — 2008. — Vol. 80. — P. 583–587.
- <http://www.freepatentsonline.com/20070134552>).
- Warne B., Kasyutich O.I., Mayes E.L., Wiggins J.A.L., Wong K.K.W. Self assembled nanoparticulate Co:Pt for data storage applications // IEEE Transactions on magnetics. — 2000. — Vol. 36. — P. 3009–3011.
- Zhao G., Ceci P., Ilari A. et al. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 27689–27696.
- Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // Genes Dev. — 1992. — Vol. 6. — P. 2646–2654.
- Azam T.A., Iwata A., Nashimura A. et al. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // J. Bacteriology. — 1999. — Vol. 181. — P. 6361–6370.
- Azam T.A., Ishihama A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274. — P. 33105–33113.
- Ceci P., Cellai S., Falvo E. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus // Nucleic Acids Research. — 2004. — Vol. 32. — P. 5935–5944.
- Antipov S.S., Ozoline O.N., Fesenko E.E. Low intensity microwave irradiation of *Escherichia coli* cells affects the spectrum of synthesized proteins // Biophysics. — 2005. — Vol. 50. — P. 30–35s.
- Ozoline O.N., Deev A.A. Predicting antisense RNAs in the genomes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* using promoter-search algorithm PlatProm // J. Bioinf. Comput. Biol. — 2006. — Vol. 4. — P. 443–454.
- Suslov O., Steindler D.A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency // Nucl. Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — P. e181.

## BACTERIOFERRITIN AS A BIOSENSOR AND NANOSTRUCTURE

S.S. ANTIPOV, K.V. KURGANOV, K.S. CHEMERIS, O.N. OSOLIN

*Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino Moscow Region;  
Voronej State University*

The present work deals with properties of multifunctional protein Dps, which takes part in the utilization of Fe ions, oxidizes Fe<sup>2+</sup> to Fe<sup>3+</sup>, forms ferrihydrite core within protein cavity and which is one of major proteins of the nucleoid. The experimental data were presented, indicative of an influence of the electromagnetic irradiation on gene dps expression. The prospects of the use of bacterioferritin as a biosensor and base for development of the new materials with predicted properties.

*Keywords:* ferritin, Dps, nanoparticle, metalloprotein, electromagnetic irradiation.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ СИНТЕЗА ФИТОГОРМОНОВ ПРИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ РАСТЕНИЙ

В.В. АЛЕКСЕЕВА<sup>1</sup>, Е.Б. РУКАВЦОВА<sup>1</sup>, Ю.С. ГОЛУБЧИКОВА<sup>1</sup>, Я.И. БУРЬЯНОВ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Филиал Института биоорганической химии  
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пушкино Московской области;

<sup>2</sup> Уральский государственный университет, Екатеринбург

Образование опухолей фитопатогенными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* при заражении многих важных сельскохозяйственных видов растений связано с интеграцией в геном растений бактериальных онкогенов, изменяющих гормональный статус инфицированных растительных клеток. Наиболее важными из этих генов являются гены *ipt* и *iaaM*, отвечающие за синтез, соответственно, цитокинина и ауксина. Экспрессия этих генов в зараженных клетках растений приводит к чрезмерному синтезу данных гормонов и образованию опухоли.

Получение трансгенных растений, способных вызывать замолкание генов *ipt* и *iaaM*, создает предпосылки для получения растений, устойчивых к агробактериям. Применение стратегий антисмысловых РНК и РНК-интерференции является достаточно эффективным и безопасным подходом для направленного подавления экспрессии агробактериальных онкогенов. Данные технологии не связаны с возрастанием синтеза каких-либо дополнительных белков или пептидов и, кроме того, требуют значительной гомологии генов, что снижает риск аллергических последствий и возможность ингибирования других генов.

В своей работе мы получили трансгенные растения табака с антисмысловыми копиями агробактериальных генов *ipt* и *iaaM*, отвечающих за синтез цитокининов и ауксинов, под контролем одинарного и двойного промоторов *CaMV 35S*. С помощью скрещивания трансгенных растений — одинарных трансформантов с антисмысловыми копиями этих генов (*as-ipt*-растений и *as-iaaM*-

растений) нами были созданы двойные трансформанты (*as-ipt::as-iaaM*-растения).

При заражении всех форм трансгенных растений с антисмысловыми копиями онкогенов вирулентным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pTiC58) показано частичное ингибирование экспрессии этих генов. Подавление экспрессии генов синтеза цитокининов и ауксинов приводило к изменениям в морфологии и физиологии опухоли. Из опухолей, образованных на *as-iaaM*-растениях и двойных трансформантах, получены побеги. Ингибирование гена биосинтеза ауксина изменило гормональный баланс в некоторых опухолевых клетках в сторону преобладания цитокининов, стимулирующих образование побегов. Анализ антисмыслового ингибирования онкогенов в некоторых растениях, полученных из опухолевых тканей, проводили методом РНК-ДНК гибридизации. Обнаружено, что в этих побегах уровень мРНК гена *ipt* снижается меньше, чем уровень мРНК гена *iaaM*. Такой эффект может объясняться большей силой контролирующего этот ген двойного промотора *CaMV 35SS*, а также более высокой гомологией генов *iaaM*.

Картина заражения листовых дисков двойных трансформантов вирулентным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* A6 (pTiA6) была аналогична.

В настоящее время для более эффективного ингибирования опухолеобразования проводятся исследования с использованием стратегии РНК-интерференции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 06-08-00237.

Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Бурьянов Я.И.

Уральский государственный университет,  
Екатеринбург

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ПРЕПАРАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ПОЛЕЙ

Н.Н. КНЯЗЬКОВ<sup>1</sup>, В.Е. КУРОЧКИН<sup>1\*</sup>, Е.Д. МАКАРОВА<sup>1</sup>, Т.Н. ПАШОВКИН<sup>2</sup>,  
Г.В. ШИЛЬНИКОВ<sup>2</sup>, А.И. ДУХИН<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>2</sup> *Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области;*

<sup>3</sup> *Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург*

Применение силового действия ультразвука является новым и чрезвычайно эффективным подходом к построению современных разделительных систем, систем фильтрации дисперсных фаз и концентрирования клеток и микрочастиц, исследовательских систем для изучения процессов агрегации, взаимодействия и состояния клеток и микрочастиц в различных дисперсионных средах.

Результаты экспериментальных и теоретических исследований, проведенных в последние 25 лет, показали, что ультразвуковые методы, основанные на применении некавитирующих полей мегагерцового диапазона имеют следующие преимущества:

- принадлежат к группе бесконтактных «мягких» методов воздействия на клетки, т.е. при адекватном выборе параметров ультразвукового поля не оказывают деструктурирующего действия на лабильные объекты;
- обеспечивают возможность целенаправленного позиционирования и/или концентрирования клеток и микрочастиц в заданных точках ультразвукового поля или объема камеры;
- позволяют регулировать расстояние сближения частиц и степень/интенсивность их контактного взаимодействия;
- позволяют удерживать клетки/микрочастицы в потоке суспензионной (или промывной или токсичной или анализируемой) жидкости, что обеспечивает возможность быстрой смены сред и/или интенсификацию процессов массообмена;

- обеспечивают возможность фракционирования клеток/микрочастиц по нескольким параметрам разделения: размеру, плотности и адиабатической сжимаемости;
- хорошо совместимы с другими силовыми полями (гравитационным, электрическим, потока и т.д.), что дает возможность создания комбинированных многопараметрических систем пространственного разделения объектов и проточного фракционирования с расширенным перечнем параметров разделения.

Кроме того, использование дополнительных эффектов ультразвуковых полей позволяет:

- увеличивать скорость массопереноса через границу раздела фаз;
- осуществлять бесконтактное перемешивание жидкости;
- ускорять и увеличивать заполнение капиллярных систем;
- изменять ориентацию несферических частиц;
- ускорять расслаивание двухфазных систем.

В настоящее время происходит активная коммерциализация и внедрение ультразвуковых методов: сообщается о появлении на рынках клеточного акустического фильтра производительностью 250 л/день и более; о подготовке к серийному выпуску фильтрующего ультразвукового устройства в качестве блока пробоподготовки для автоматизированной системы проточно-инжекционного анализа водных и биологических проб; о клинических испытаниях ультразвукового устройства для ускорения и снижения предела обнаружения реакций латексной агглютинации.

Рассмотрены основные механизмы процессов, происходящих в дисперсных системах при наложении

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Курочкин В.Е.

Институт аналитического приборостроения РАН,  
Санкт-Петербург

---

ультразвуковых полей в статических и проточных условиях, дополнительные эффекты ультразвуковых полей, способы и предпочтительные варианты практического использования силового действия ультразвука и дополнительных эффектов ультразвукового поля.

Особое внимание уделено приоритетным отечественным и собственным разработкам и исследованиям в области создания и применения:

- ультразвуковых разделительных систем и концентраторов
- методов оценки, ускорения и увеличения чувствительности реакций агглютинации;
- методов и систем экспресс-выделения клеток/микроорганизмов из различных сред;
- микрореакторов для наработки заданных штаммов бактерий;
- методов и систем выделения, разделения и концентрирования клеток различного вида для клеточной терапии.

На основании собственных результатов и литературных данных приведены методологические основы и конкретные примеры решения исследовательских и технологических задач в биофизике, аналитической биохимии, токсикологии, экологии, биотехнологии и аналитической химии.

Рассмотрены современные направления и тенденции развития методов и устройств на основе ультразвукового поля стоячих волн, а также условия, необходимые для эффективного применения этих методов и технических средств и внедрения их в практику.

*Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ, грант № 05-03-33108.*

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*



## ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В БИОСУБСТРАТАХ

А.А. КОМАРОВ\*, Е.А. ПОНОМАРЕВА, Е.С. ВЫЛЕГЖАНИНА

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

Антибиотики тетрациклинового ряда широко применяются в медицине и ветеринарии при борьбе с инфекциями, вызванными грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами. Помимо положительного терапевтического эффекта они обладают побочным действием, вызывая тяжелые расстройства пищеварительной системы, аллергические реакции, суперинфекции и др. Остаточные количества тетрациклинов могут накапливаться в органах и тканях животных в количествах, превышающих максимально допустимые уровни. В России общепринятым методом определения остаточного содержания тетрациклинов в продукции животноводства является микробиологический. Этот метод не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью. Целью данной работы явилось создание высоко чувствительного и специфичного скрининг — метода на основе непрямого твердофазного конкурентного ИФА (НТК ИФА) для определения тетрациклинов в биологических матрицах.

Для получения антигенов (АГ) были синтезированы конъюгаты тетрациклина гидрохлорида (Т), хлортетрациклина гидрохлорида (ХТ) и окситетрациклина гидрохлорида (ОТ) (Сигма, США) с бычьим сывороточным альбумином (БСА, V фракция) с помощью модифицированной реакции Манниха. Структуру конъюгатов контролировали спектроскопическими и хроматографическими методами. Содержание белка определяли методом Лоури; эпитопную плотность присоединившихся к БСА молекул тетрациклинов — спектрофотометрически. Поликлональные кроличьи сыворотки были получены путем внутрикожной иммунизации кроликов в область спины растворами АГ (БСА-Т,

БСА-ХТ или БСА-ОТ) с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) и повторной ежемесячной иммунизацией АГ без ПАФ (100–20 мкг/мл на кролика) в течение 6 месяцев. Сыворотки отбирали через неделю после каждой реиммунизации и хранили в растворе глицерина при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Активность и специфичность сывороток определяли в ИФА.

Было получено несколько различающихся по эпитопной плотности конъюгатов тетрациклинов с БСА. Для иммунизации использовали конъюгаты БСА-Т, БСА-ХТ и БСА-ОТ с эпитопной плотностью молекул Т, ХТ и ОТ 14, 10 и 8, соответственно. В процессе иммунизации было получено 68 сывороток с различной активностью и специфичностью. Высокая активность большинства сывороток наблюдалась после первых двух циклов иммунизаций. Титры в ИФА достигали 12800. Удлинение сроков иммунизации приводило к падению активности и специфичности. Сыворотки, полученные на введение синтезированных АГ, обладали перекрестной специфичностью. Была выбрана сыворотка, полученная на введение БСА-ХТ, использование которой позволило определять Т, ХТ и ОТ в НТК ИФА в интервале 0,75–750 нг/мл. Таким образом, были синтезированы конъюгаты тетрациклинов (Т, ХТ и ОТ) с БСА, на введение которых в организме кроликов образовывались специфичные АГ. Полученные иммунные поликлональные сыворотки обладали перекрестной специфичностью. С использованием отобранных иммунореагентов разработан экспресс-метод определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклинового ряда (Т, ХТ и ОТ) в биосубстратах. Предлагаемый метод существенно превосходит по чувствительности и специфичности широко применяемый на сегодняшний день в России микробиологический метод.

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Комаров А.А.,  
Всероссийский государственный центр качества  
и стандартизации лекарственных средств для животных  
и кормов, ФГУ «ВГНКИ», Москва

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ТЕТРАМЕРОВ И СУБЪЕДИНИЦ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В УСЛОВИЯХ ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА

В.Г. АРТЮХОВ\*, М.А. НАКВАСИНА, Н.В. АГИШЕВА

*Воронежский государственный университет*

Разработка методов иммобилизации белков открыла широкие возможности не только для использования биокатализаторов в прикладных целях, но и для решения таких фундаментальных проблем, как изучение пространственно-структурной организации и функционирования ферментных систем в клетке в норме и в условиях воздействия различных модифицирующих агентов.

В связи с этим представлялось необходимым исследовать функциональные свойства иммобилизованных тетрамеров и субъединиц лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в условиях генерации активированных кислородных метаболитов и, в частности, синглетного молекулярного кислорода.

Проведены эксперименты по иммобилизации ЛДГ из скелетных мышц свиньи (изоформа А4) на активированной бромцианом сефарозе.

Полученные препараты иммобилизованного тетрамера обладали следующими характеристиками: степень активации — 5 мг ВгСN/мл геля; количество связанного белка ЛДГ —  $60 \pm 4$  мкг/мл геля; удельная активность ЛДГ до иммобилизации —  $300 \pm 10$  Е/мг белка; удельная активность иммобилизованной ЛДГ —  $167 \pm 4$  Е/мг белка.

Количество связанного белка после обработки иммобилизованной ЛДГ раствором мочевины составило  $17 \pm 4$  мкг/мл геля (то есть  $\approx 25$  % от исходной величины), что свидетельствует о ковалентном связывании только одной из четырех субъединиц ЛДГ. Субъединицы ЛДГ обладали удельной активностью  $40 \pm 5$  Е/мг белка, что составляет  $\approx 25$  % от удельной активности исходного иммобилизованного препарата, то есть их удельные активности оказались идентичными.

Кривые «насыщения» субстратом (пируватом натрия) свободной ЛДГ, иммобилизованных тетрамеров и субъединиц имеют гиперболическую форму. Незначительное ингибирование субстратом отмечается для фермента в растворе при концентрации пирувата 4,0–4,5 ммоль/л, для иммобилизованных тетрамеров и субъединиц — 2,0 и 2,5 ммоль/л, соответственно. Иммобилизация приводит к снижению величин константы Михаэлиса и максимальной скорости ферментативной реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой из скелетных мышц свиньи.

В связи с тем, что синглетный кислород играет существенную роль в процессе УФ-инактивации свободной лактатдегидрогеназы (Артюхов В.Г. и др., 2001), проведены исследования, направленные на выявление возможности взаимодействия этого активного кислородного метаболита с иммобилизованными тетрамерами и субъединицами фермента.

При изучении зависимости каталитической активности ЛДГ, иммобилизованной на сефарозе 4В, после облучения красным светом в присутствии метиленового голубого (МГ) выявлено, что введение в систему МГ в концентрации  $10^{-5}$  моль/л индуцировало снижение функциональной активности ЛДГ на 48 и 67% для иммобилизованных тетрамеров и субъединиц, соответственно. Для МГ в концентрации  $10^{-6}$  моль/л величины инактивации составляли 25% (иммобилизованные тетрамеры) и 58% (иммобилизованные субъединицы). Использование эффективного тушителя синглетного кислорода — азида натрия ( $10^{-3}$  моль/л) — сопровождалось статистически достоверным восстановлением активности иммобилизованных препаратов ЛДГ по отношению к этому показателю при облучении свободного белка. Причем в случае с иммобилизованными тетрамерами (концентрация МГ —  $10^{-5}$  моль/л) активность в присутствии  $\text{NaN}_3$  не отличалась от таковой для немодифицированного иммобили-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Артюхов В.Г.,

Воронежский государственный университет

зованного белка. Это позволяет заключить, что механизм фотоинактивации фермента в присутствии МГ связан с взаимодействием ЛДГ с синглетным кислородом.

В аналогичных условиях функциональная активность свободного фермента ( $2 \cdot 10^{-8}$  моль/л) падала на 25% (концентрация МГ —  $10^{-5}$  моль/л) и 14% (концентрация МГ —  $10^{-6}$  моль/л). Эти результаты свидетельствуют о более высокой степени фотостабильности свободного фермента по сравнению с иммобилизованными тетрамерами и субъединицами в случае их сенсibilизированного повреждения с участием МГ.

Полученные данные дополнительно указывают на участие синглетного молекулярного кислорода в процессе фотоинактивации ЛДГ, а также на возможность

фотосенсибилизированного метиленовым голубым окисления этого белка в иммобилизованном состоянии как в олигомерной форме, так и в виде отдельных белковых субъединиц. Результаты экспериментов, посвященных исследованию иммобилизованных препаратов лактатдегидрогеназы, необходимо учитывать при обсуждении вопросов, касающихся выяснения роли белок-белковых взаимодействий в функционировании биомакромолекул и пространственно-структурной организации полиферментных систем и внутриклеточного метаболизма.

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДНК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ

М.Ю. СКОБЛОВ\*, Ю.С. СКОБЛОВ, Е.Д. ШИБАНОВА, Д.И. БАИРАМАШВИЛИ

*Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

Фармацевтические препараты, получаемые с помощью технологии рекомбинантной ДНК, становятся все более актуальными в последнее время. Особые требования должны предъявляться к качеству активных фармацевтических субстанций (АФС), используемых для производства лекарственных препаратов.

Для определения минимальных количеств чужеродных для организма человека примесей в генноинженерных АФС необходима разработка и применение современных тонких высокочувствительных методов анализа.

Были разработаны методы определения остаточной ДНК штамма-продуцента с использованием ПЦР. В отличие от широко применяемых методов гибридизации и прямого связывания тотальной ДНК с флуоресцентными зондами предлагаемые методы являются более чувствительными, специфичными и менее трудоемкими.

ПЦР для определения остаточной ДНК штамма-продуцента проводилась с использованием праймеров к наиболее консервативным фрагментам плазмидной ДНК (фрагменту гена *Bla*) или геномной ДНК (фрагменту гена *16S РНК*).

Показано, что метод пригоден для полуколичественной оценки (менее или более 7 пг на 1 мкг белка) содержания ДНК в АФС и может применяться для серийного контроля субстанций генноинженерного инсулина, соматропина, филграстима.

Для количественной оценки плазмидной или геномной ДНК был разработан метод ПЦР в реальном времени (Real time PCR) с использованием тех же

праймеров и флуоресцентного красителя SYBR Green I. Показано, что в тех же образцах АФС возможно определение от  $10^{-6}$  пг ДНК штамма-продуцента.

Применение системы Taqman в ПЦР в реальном времени с двумя флуоресцентными красителями Fam и R6G и тушителем H1 на дополнительных праймерах к тем же фрагментам плазмидной и геномной ДНК позволило проводить одновременное количественное определение остаточной ДНК (плазмидной и геномной) в АФС.

Благодаря выбору праймеров к консервативным фрагментам плазмидной и геномной ДНК метод позволяет проводить определение ДНК в разных субстанциях, получаемых техникой рекомбинантной ДНК в штаммах *E. coli* и дрожжах.

Такой метод актуален при отработке технологии получения и очистки генноинженерной субстанции и отработки методов контроля качества получаемой АФС на разных технологических стадиях.

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Скоблов М.Ю.,

Институт биоорганической химии

им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо Маклая, 16/10

## ТВЕРДОФАЗНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНОГО ШТАММА 19/97M *STREPTOMYCES LATERITIUS*

Г.А. СИЗЫХ\*

Сибирский государственный технологический университет,  
Красноярск

На сегодняшний день в современной биотехнологии актуальным является разработка эффективных экологически безопасных методов защиты растений от распространения различных заболеваний (грибных болезней, бактериозов).

Практическое применение методов биологической защиты леса, в особенности ценных хвойных пород, позволит успешнее проводить работу, по искусственному лесовосстановлению, ограничить массовое распространение грибных болезней в лесных питомниках. Актиномицеты, образующие антибиотические вещества, рекомендованы для защиты сельскохозяйственных растений и редко используются в практике защиты семян древесных пород.

Особенностью изучаемого штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* является высокая конкурентно способность и скорость роста. Для рекомендуемого штамма характерно быстрое накопление биомассы и высокая репродуктивная способность. Предлагается применение этого штамма в качестве продуцента биопродуцента и создание на его основе экологически безопасных био-препаратов. Однако его взаимодействие с различными группами микроорганизмов при интродукции в биоценозы не достаточно изучено.

Объектом нашего исследования являлся штамм 19/97M вида *Streptomyces lateritius*, выделенный из почвы лесопитомника Красноярского края в 1997 г. На крахмало-аммиачном агаре штамм образует обильно разветвленный мицелий, частично распадающийся на фрагменты. По заключению специалистов Красноярской краевой ветеринарной лаборатории, данный штамм

авирулентен, нетоксичен, нетоксигенен в отношении теплокровных организмов и не вызывает инфекционных заболеваний.

Целью данной работы являлось изучение продуктивности антагонистически активного штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* в условиях твердофазного поверхностного и глубинного культивирования, изучение биологической, антагонистической активности, оценка штамма как средства в защите семян древесных пород.

Антибиотическую активность стерильных метаболитов штамма 19/97M *Streptomyces lateritius* оценивали в отношении тест-объектов: фитопатогенного микромицета *F. oxysporum* и представителей сапротрофной микрофлоры бактерий. *Azotobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* методом лунок. Актиномицет выращивали поверхностным и глубинным способами на жидких средах, созданных на основе стандартной крахмало-аммиачной среды. Оценку степени подавления грибов и бактерий проводили на 2-, 4-, 6-е сутки.

Твердофазную ферментацию осуществляли при постоянной температуре 23–27 °С, с периодическим увлажнением питательной среды (кора лиственницы поле СО<sub>2</sub> экстракции, кора пихты, древесная зелень). Учет продуктивности штамма проводили определением численности колониеобразующих единиц (КОЕ) методом посева серийных разбавлений из смыва с 1 г полученного продукта после культивирования на твердых питательных средах.

Периодическое культивирование продуцента в погруженной культуре проводили в ферментере с ротором геликоидного типа, разработанным сотрудниками Сибирского государственного технологического университета А.П. Руденко и В.В. Еременко. Аппарат имеет шнековую мешалку, позволяющую перемешивать суспензии различной вязкости, не нарушая соответствия организации потока профилю рабочего объема аппарата. В качестве натурального субстрата для культивирова-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Сизых Г.А.,  
Сибирский государственный  
технологический университет,  
Красноярск

ния актиномицета *Streptomyces lateritius* была выбрана суспензия древесной зелени (тускло-зеленой окраски, влажность 2%) в объемном соотношении сыпучего субстрата и воды 1:2. Культивирование осуществляли в рабочем режиме аппарата при температуре 25 °С в течение 3 сут. После проведения ферментации штамма полученный продукт высушивали до постоянного веса и определяли титр (КОЕ).

Биологический анализ заключался в определении активности штамма по ростовым эффектам, по всхожести семян лиственницы, ели и пшеницы. Учитывали всхожесть семян на 14-е сутки и измеряли длину проростков.

Исследования показали, что Штамм 19/97 М *Streptomyces lateritius* не оказывает ингибирующего действия на рост азотфиксирующих бактерий и представителей доминирующей микрофлоры почв рода *Bacillus*.

Таким образом, рекомендовано получение био-препарата на основе бактерий *Streptomyces lateritius* и

азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter*. Штамм проявляет антагонистическую активность в отношении фитопатогенного гриба — возбудителя фузариоза семян хвойных — *Fusarium oxisporum*.

Использование метаболитов штамма, культивируемого на коре лиственницы и древесной зелени, увеличивает всхожесть семян хвойных пород по сравнению с контролем на 28%, а на всхожесть семян злаковых — на 48%.

Антагонистически активный штамм 19/97 М *Streptomyces lateritius* имеет высокую численность  $5,68 \cdot 10^{13} \pm 0,19$  КОЕ/г при твердофазном культивировании на отходах деревообрабатывающей и гидролизной промышленности — коре и древесной зелени хвойных.

*Материалы IV Съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова 6–7 декабря 2006 г.*

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА В РОССИИ. СООБЩЕНИЕ 3: БИОГАЗ

Р.Г. ВАСИЛОВ\*

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

### Введение

Настоящая статья завершает собой серию публикаций автора по проблеме биотоплива (предыдущие работы: Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2007, Т. 3, № 1, с. 47–54; № 2, с. 50–60). В ней будет рассмотрен вопрос о биогазе.

Биогаз — это газ, получаемый с помощью анаэробного метанового брожения биомассы. В состав биогаза входят 55–65% метана, 35–45% двуокиси углерода, по 1% водорода и сероводорода, незначительные примеси азота, аммиака, ароматических и галогено-ароматических углеводов.

Основным источником биогаза являются органические отходы: навоз, фекалии, твердые бытовые отходы (ТБО), солома и т.д.

Как источник энергии биогаз получают в специальных установках — метантанках (иногда говорят «тенк», используется и термин «метатанк»), или анаэробных колоннах. Их оборудуют на фермах, полигонах ТБО или в виде малых (односемейных) биогазовых установок. Строятся и более крупные заводы. Используют биогаз в качестве топлива для производства тепла или пара, электроэнергии или в качестве моторного топлива. Применение биогаза особенно эффективно в масштабах крупных агропромышленных комплексов, где достигается полный экологический цикл [15, 22, 23, 29].

Производство биогаза экономически выгодно и экологически целесообразно, особенно при переработке постоянного потока отходов — стоки животноводческих ферм, скотобоен, растительных отходов). В связи с

этим оно получило широкое распространение в странах Европы (Германия, Дания, Швейцария), США и Азии (Китай, Индия, Вьетнам).

РФ пока отстает от многих стран по объемам производства биотоплива, в том числе и биогаза.

К настоящему времени накопилась довольно обширная литература по биогазу [11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 28, 30, 31].

### Состояние проблемы за рубежом

**Общие сведения.** Мировой рынок биогаза имеет стойкую тенденцию к увеличению (на этот счет есть хорошая подборка компании Abercade — <http://www.abercade.ru/reports/biogazrep07>). США, ЕС, Китай, Индия, Бразилия являются лидерами по производству биогаза. Постепенно разворачивают деятельность в данном направлении страны ближнего зарубежья.

#### США

В США производство биогаза поддерживается законодательно на федеральном уровне и уровне штатов. Приняты соответствующие программы, активен бизнес. Имеется закон 2002 Farm Bill. В США регулируется также деятельность, связанная с мусорными свалками. Согласно «United States Clean Air Act» (1987) и главе 40 Кодекса федерального регулирования («Code of Federal Regulations») собственникам мусорных свалок предписано оценивать количество выделяющихся неметановых органических веществ (НМОВ). Если количество выделяемых НМОВ превышает 50 тонн в год, то собственник обязан собирать «лендфилл-газ» (от англ. «landfill» — «мусорная свалка») и, как правило, сжигать. Отдаленность мусорных свалок делает экономически невыгодным производить электричество из биогаза.

Существенным моментом является тщательная проработка финансовых вопросов. Для этих целей служат федеральные программы и программы шта-

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Василев Раиф Гаянович,  
профессор, президент Общества биотехнологов России  
им. Ю.А. Овчинникова  
E-mail: obr@biorosinfo.ru

тов, в которых используются механизмы выделения грантов, займов, налоговых кредитов («tax credit») и освобождения от налогов, прогрессивной системы оплаты («productive incentives»). Имеется федеральная программа по биогазу AgSTAR [12], субсидируемая Федеральным агентством по защите окружающей среды, Министерством сельского хозяйства и Министерством энергетики. Из федеральных источников финансируются следующие программы: Environmental Quality Incentives Program (EQIP), Regional Biomass Energy Programs, Renewable Energy Systems and Energy Efficiency Improvements Program, Sustainable Agriculture Research and Education. На программу «The Renewable Energy Systems ...», финансируемую согласно 9006-й части 2002 Farm Bill, на 2007 год выделено 11,4 млн. долларов на гранты и 176,5 млн. долларов — на займы.

На уровне практически всех штатов приняты программы по биогазу, причем выделяются большие средства. Так, например, в штате Калифорния действует Self-Generation Incentive Program, на которую в 2004 году было выделено 100 млн. долларов. В этом же штате функционируют еще 3 программы по биогазу (в том числе California's Dairy Power Production Program — DPPP) с общим финансированием более 15 млн. долларов. На региональную программу штатов Мичиган, Миннесота, Северная и Южная Дакота, Висконсин, сформированную в 1999 г., было выделено 16 млн. долларов на 19 проектов по возобновляемой энергии, из них 7 — по биомассе.

В штате Пенсильвания реализуется программа стоимостью 21,8 млн. долларов. В штате Нью-Йорк есть программа по биогазу стоимостью 10 млн. долларов. В Техасе с 1988 г. действует соответствующая программа с минимальным финансированием 95 млн. долларов. Наконец, в штате Орегон осуществляются 4 программы. На одну из них — Business Energy Tax Credit — с 1980 г. выделено инвестиций для 6500 участников на более чем 549 млн. долларов. На остальные программы этого штата также предусмотрена сумма более 5 млн. долларов.

Биогаз дает 8% электрической энергии, произведенной из возобновляемого сырья в США (данные 2006 г.). Лендфилл-газ в 2005 г. составлял 24% от всего количества метана (его производили более 350 заводов). Больше всего биогазовых фермерских установок находится в Калифорнии, Пенсильвании, Висконсине и Нью-Йорке. Приведенные данные свидетельствуют о широкомасштабной поддержке производства биогаза в США.

## Евросоюз

В ЕС принят «закон о мусорных свалках» — «Landfill Directive», согласно которому ужесточается контроль над деятельностью лиц, ответственных за хранение и переработку мусорных свалок в связи с их вкладом в парниковый эффект. Поэтому производство «лендфилл-газа» выделяется в особую статью. В ЕС также существует особый запрет на вывоз органических отходов на свалки.

В ЕС ставится задача в 2008—2012 гг. уменьшить выброс парникового газа на 8% по сравнению с 1990 годом.

В последние годы отмечается неуклонный рост производства биогаза в ЕС (по данным 2007 г., на 14%). В ЕС намечено к 2010 г. намечено получить 15 млн. тонн нефтяного эквивалента за счет использования биогазовых установок.

Швеция как один из последовательных адептов экологически берегающих технологий создала в 2005 году первый в мире поезд на биогазе. Он приводится в движение двумя двигателями, работающими на биогазе (такие же силовые установки установлены и на 779 шведских автобусах).

По данным 2005 г., в Швеции работало 233 завода по производству биогаза. В январе 2007 г. сдан в эксплуатацию крупный завод в Норрчепинге. Это уникальный для Швеции завод, построенный компанией «Шведский биогаз». Он использует в качестве сырья обмолотки и отруби (поставляются фермами) и остаточные продукты от производства биоэтанола. Первая очередь производит свыше 1,5 млн.  $\text{м}^3$  в год, а в перспективе — 4 млн.  $\text{м}^3$ . Запускаются проекты строительства новых 6 заводов по производству биогаза на полях орошения. В 2006 г. биогазом заправлялись 54% автомобилей такого профиля, а природным газом — 46%. Уже сейчас 5% шведского транспорта переведено на биогаз. Предусмотрены многочисленные льготы для экологически чистых транспортных средств, в том числе работающих на биогазе. Пока не решены вопросы с поддержкой фермерских биогазовых установок по переработке навоза.

Дания производит биогаз в объеме, составляющем около 18% в ее общем энергобалансе. В этой стране действуют десятки (более 20) централизованных биогазовых установок, к которым подвозят биомассу из окрестных фермерских хозяйств (большая часть из них работает с прибылью). Кроме того, имеются небольшие фермерские установки с объемом метантанка 150—200  $\text{м}^3$ . Надо отметить, что Правительство Дании законодательно и финансово поддерживает строительство



централизованных установок, выдавая государственные субсидии, покрывающие примерно 20% от сметы строительства.

Германия относится к числу лидирующих стран по производству биогаза. В ней функционируют более 400 биогазовых установок по переработке сельскохозяйственных отходов с объемом метантанка 600–800 м<sup>3</sup>. В конце 90-х годов в Германии было построено 8 централизованных биоэтаноловых заводов (их суммарная емкость составляла 190 тыс. м<sup>3</sup>). Имеются прогнозы, согласно которым эта страна может за счет биогаза закрыть 11% общего потребления газа. Ее потенциал производства энергии из биогаза к 2020 г. оценивается в 112 млн. тонн биомассы, что позволит выработать энергию 39,8 кВтч/год [12].

Сходные цифры по биогазовому потенциалу приводятся для Франции: 251 млн. тонн биомассы — 42,7 кВтч/год, для Великобритании: 155,4 млн. тонн биомассы — 26,3 кВтч/год. Хорошие перспективы здесь и у Италии, Испании, Нидерландов, Дании, Бельгии, Австрии, Швеции.

Швейцария использует автобусы компаний Volvo и Scania с двигателями, работающими на биогазе. Согласно планам этой страны, к 2010 году 10% автотранспорта в ней будет работать на биогазе.

В Брюсселе планируется построить завод по производству биогаза мощностью 30–40 тыс. тонн.

В Великобритании на правительственном уровне принято решение о переводе 40% котельных на биогаз, для чего в течение пяти лет ежегодно будет выделяться по 10–20 млн. фунтов стерлингов.

### **Китай**

В Китае на конец 90-х годов эксплуатировалось более 10 млн. малых биогазовых установок. Они производили около 7 млрд. м<sup>3</sup> биогаза в год. К концу 2006 года действовало 17 млн. биогазовых установок с годовым производством 6,5 млрд. м<sup>3</sup>, что позволяет заменять около 10 млн. тонн условного топлива и обеспечивать им 50 млн. крестьян.

В настоящее время ставится задача достичь к 2020 году уровня 25 млрд. м<sup>3</sup> биогаза в год, что даст возможность обеспечить им 300 млн. человек. Кстати, к этому же времени в Китае планируется потреблять ежегодно 10 млн. т биоэтанола и 2 млн. т биодизеля.

### **Индия**

В Индии начиная с 80-х годов введено в строй 3,8 млн. малых газовых установок. Сельское хозяйство Индии на 20% обеспечивает себя энергией за счет этих небольших установок. Следует отметить, что внедрению биогаза в Индии способствуют и национальные и рели-

гиозные традиции: например, культ коров, выделяющих больше всех домашних животных метан.

### **Ближнее зарубежье**

В Украине пока большие предпочтения в области биотоплива отдаются биодизелю и биоэтанолю. Производство биогаза не поставлено на высокий уровень, несмотря на большой потенциал, который отмечали представители Европарламента.

Казахстан проявляет интерес к данной проблеме, однако дальше пилотных и демонстрационных проектов пока дело не идет. Имеется инициатива Карагандинского областного экологического музея, который с 2000 года выполняет проект, профинансированный Глобальным экологическим фондом в рамках Программы развития ООН и фондом NIVOS (Нидерланды).

Республика Беларусь имеет собственный проект, принятый на уровне Правительства РБ (см. [http://www.bioenergy.by/mejdu\\_1.htm](http://www.bioenergy.by/mejdu_1.htm)). Он делается под эгидой Программы развития ООН (Глобальный экологический фонд). В качестве прототипа взята готовая программа с проработанной документацией Федеральной земли Штирия ФРГ. Курируют этот проект специалисты из Германии и Австрии.

Грузия также имеет свою программу развития биогаза, которая разработана американскими специалистами. Она помещена на сайте [www.ruralenergyprogram.ge/files/microsoft\\_word\\_-\\_biogas\\_report\\_english.pdf](http://www.ruralenergyprogram.ge/files/microsoft_word_-_biogas_report_english.pdf).

В Кыргызстане разрабатывается государственная научно-техническая программа «Биоэнергетика», в рамках которой формируется направление, связанное с производством биогаза.

## **Вопросы технологии**

Получение биогаза — это своеобразный биологический вариант гелиоэнергетики.

В соответствии с расчетами, в среднем 1 тонна навоза или другой биомассы, подвергаемой метановому сбраживанию, дает около 500 м<sup>3</sup> биогаза, что эквивалентно 350 л бензина. Иногда дают отдельные цифры выхода биогаза из навоза (200–300 м<sup>3</sup>) и растительной биомассы (300–630 м<sup>3</sup>). В целом выход биогаза из разного сырья сильно колеблется (табл. 1).

Здесь принято понятие о так называемой животной единице, эквивалентной ежедневному производству биогаза около 1,5 м<sup>3</sup>. Такое количество может произвести: 1 взрослая корова, 5 телят, 6 свиней, 250 кур.

Производство биогаза — один из лучших способов борьбы с глобальным потеплением, поскольку происходит

захват метана в изолированных от атмосферы емкостях. Известно, что метан вызывает парниковый эффект в 21 раз сильнее, чем углекислый газ, и сохраняется в атмосфере до 12 лет.

**Таблица 1**  
**Влияние вида исходного сырья на выход биогаза**

Исходное сырье	Выход биогаза из 1 кг сухого вещества, л/кг	Содержание метана в газе, %
Трава	630	70
Древесная листва	220	59
Сосновая игла	370	69
Ботва картофельная	420	60
Стебли кукурузы	420	53
Мякина	615	62
Солома пшеничная	340	58
Солома льняная	360	59
Шелуха подсолнечника	300	60
Навоз КРС	200–300	60
Конский навоз с соломой	250	56–60
Домашние отходы и мусор	600	50
Фекальные осадки	250–310	60
Твердый осадок сточных вод	570	70

Источник: <http://www.aditi-tmn.info/bio.htm>

Метановое брожение происходит в температурном диапазоне от 0 до 70 °С (оптимально – 25–60 °С). Поэтому в странах с жарким климатом (тропики, субтропики) создавать специальные установки не требуется, а надо лишь накапливать навоз в ямах под колпаком, осуществлять газоотвод, сбор и накопление биогаза в соответствующих емкостях. Такой подход широко реализуется в Индии, Индокитае, на юге Китая. Среднесуточная выработка биогаза на таких примитивных установках составляет 0,15–0,3 м<sup>3</sup> на 1 м<sup>3</sup> биореактора.

Общая схема производства биогаза довольно проста (рис. 1). Вначале сырье смешивается и измельчается до получения полужидкой гомогенной массы в приемном

танке. Далее масса нагревается до 70 °С не менее 1 часа с целью уничтожения бактерий. После охлаждения сырье перекачивается в автоклав (биореактор-метан-танк, ферментатор), где оно подвергается анаэробному брожению при температуре 38 °С. Процесс получения биогаза длится обычно около 1 месяца. Существуют 2 режима брожения: мезофильный – 25–38 °С – оптимум 37 °С (работают мезофильные бактерии) и термофильный – 45–60 °С – оптимум 56 °С (работают термофильные бактерии). Для интенсификации брожения добавляют катализаторы (глюкозу и целлюлозу). Рекомендуется перемешивание субстрата в ферментаторе с целью предупреждения образования в верхней части слоя всплывающего вещества и корки (это улучшает технологический процесс и соответственно снижает энергозатраты). Биогаз под собственным давлением (не более 0,5 атм.) через газовый штуцер и конденсатор (для удаления влаги) подается в газгольдер, откуда используется либо для сжигания в бытовых приборах, либо для производства электрической и тепловой энергии в когенерационной энергоустановке. Полностью автономный, энергонезависимый биореактор потребляет 10–25% вырабатываемого газа для своих нужд. Это требуется для осуществления термостатирования и перемешивания. Сброженная масса через штуцер удаления эвакуируется и накапливается в бункере-отстойнике. Твердый остаток является хорошим обеззараженным удобрением (обычно содержание азота – 3,5 кг/тонну, фосфора – 0,8 кг/тонну, калия – 1,4 кг/тонну). При оптимальном сбраживании остаток биоудобрения составляет 30% от массы исходного сырья, а остальные 70% органических веществ разлагаются.

Теплотворная способность биогаза 22–24 тыс. кДж/м<sup>3</sup>, или 5500 ккал/м<sup>3</sup>. Один кубометр биогаза равен 0,6 м<sup>3</sup> природного газа, 0,7 л мазута, 0,4 л бензина, 3,5 кг дров.

Исходное сырье для получения биогаза имеет 3 главных источника:

- органические отходы животноводства и птицеводства;
- твердый остаток сточных вод на полях орошения;
- силос и биомасса сельскохозяйственных культур.

Биогаз можно получать на свалках, из сточных вод, кукурузного силоса, навозной жижи, зерновых и т.д. Большая часть его применяется для получения электроэнергии и обогрева и лишь незначительная часть используется в качестве транспортного горючего.

В зависимости от целевого назначения биогазовой установки варьирует объем ферментатора – от 1 до 5000 м<sup>3</sup>.

В Северной Америке наиболее популярны ферментаторы объемом 50–130 м<sup>3</sup>, которые могут обеспечить для семьи из 3–7 человек создание биосистемы с замкнутым циклом, включающую в себя выработку биогаза для бытовых нужд, местную канализацию, фабрику удобрений.

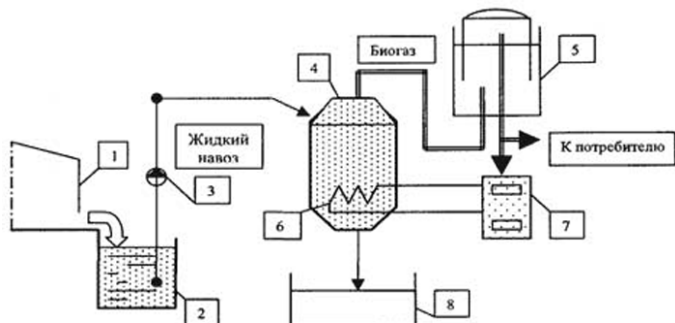


Рис. 1. Схема биогазовой установки:

1 – ферма; 2 – навозоприемник; 3 – насос; 4 – метантенк; 5 – газгольдер; 6 – теплообменник; 7 – котел; 8 – хранилище удобрения

Биогазовые заводы имеют инфраструктуру в соответствии с объемом производства. Типичный вид биогазового предприятия представлен на рисунке 2. Специфически выглядят крупные заводы по переработке отходов полей орошения (рис. 3).

Экономическая эффективность биогазовых установок особенно велика при переработке большого непрерывного потока отходов. Неубыточны и малые предприятия при адекватном техническом решении [11]. Конечно, не оценим вклад биогазовых технологий в сохранение экологического равновесия [27].

## Биогаз в России

Проблема биогаза в России имеет относительно давнюю историю по сравнению другими видами биотоплива – биодизелем и биоэтанолом. В 80-е годы на пике роста отечественной биотехнологии были приняты Постановления Правительства СССР о производстве биогаза из органических сельскохозяйственных отходов, стоков и твердых бытовых отходов. Разрабатывались вопросы теории, предпринимались практические шаги [2, 3, 10]. Правда, дальше опытных образцов дело не продвинулось: биогаз был в 5 раз дороже природного и синтетического. Пионером в разработке биогазовых установок был Запорожский конструкторско-технологический институт сельскохозяйственного машиностроения. Однако послеперестроечный период практически полно-

стью привел к прекращению работ в этом направлении. Лишь в последнее время, когда мировой прогресс в данной области стал слишком очевиден и экономически и экологически успешен, в нашей стране начали уделять внимание этому вопросу [1, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Что мы имеем сейчас? По-прежнему налицо – отсутствие целенаправленной государственной политики по биотопливу и соответственно биогазу. Отдельные инициативы не исправляют положения в целом. Из СМИ мы узнаем о том, что в той или иной географической точке будут создавать установки для производства биогаза. Так, например, в Москве запланировано к концу 2009 года построить мини-ТЭС, функционирующую на биогазе, вырабатываемом Люберецкими очистными сооружениями. Ее мощность составит около 80 МВт, что достаточно для обеспечения электроэнергией жилого квартала площадью примерно 80 тыс. м<sup>2</sup>.

Есть сведения, что в РФ работают 20 установок для получения биогаза на небольших фермах (до 30 голов крупного рогатого скота). Еще как пример приводят метантенк объемом 65 м<sup>3</sup>, установленный в 2002 г. в агрохозяйстве Луховицкого района Московской области. Действуют и индивидуальные биогазовые установки на 50–200 кг органических отходов в день, позволяющие получать 2,5–12 м<sup>3</sup> биогаза. Проявляют себя бизнес-структуры, предлагая на рынок небольшие биореакторы на 10–15 голов крупного рогатого скота (типа комплекса БУГ-1).



Рис. 2. Вид завода по производству биогаза

Между тем известно, по данным 90-х годов, что в российском животноводстве и птицеводстве образовывалось около 150 млн. тонн органических отходов. Были проведены расчеты, согласно которым можно получить из них около 60 млрд. м<sup>3</sup> метана, при сжигании которого может быть вы-



Рис. 3. Крупный завод по переработке канализационных стоков (Рочестер, США)

работано 190 млрд. кВтч электроэнергии. Кроме того, при этом вырабатывается 140 млн. тонн удобрений, отличающихся от навоза наличием связанных азота и фосфора, дегельминтацией, деконтаминацией микробами, семенами сорняков и другими полезными свойствами.

Есть прогнозы, что в России имеется потенциал для ежегодного производства биогаза в объеме 90 млрд. м<sup>3</sup>. Для этого могут послужить 300 млн. тонн органических отходов в сухом эквиваленте, из них: 250 млн. тонн — в сельскохозяйственном производстве, 50 млн. тонн — в виде бытового мусора.

### Заключение

Биогаз является одной из древнейших биотехнологий. Не случайно он так прижился на своей прародине — Китае. Но и новые цивилизации активно используют биогаз, особенно страны, примкнувшие к Киотскому протоколу и реализующие его положения на деле.

Подводя итоги цикла статей автора по биотопливу, нужно подчеркнуть, что нельзя разрушать триаду,

составляющую это понятие: «биодизель — биоэтанол — биогаз». Все это входит в такое еще более интегральное понятие, как энергия из возобновляемого сырья и далее — в более обобщенные категории: истощение минеральных ресурсов, экология, изменение климата, борьба с парниковым эффектом и т.д.

Несмотря на то, что в указанном триедином комплексе биотоплива биогаз несколько меркнет по сравнению с объемами остальных двух, он тем не менее занимает центральное положение в общей системе (рис. 4).

Безусловно, вся проблема биотоплива должна рассматриваться всегда в целом. При этом применительно к конкретным задачам, региональным особенностям должна осуществляться диверсификация видов биотоплива: все должно взаимно дополнять друг друга с главной целью — поддержания экологического баланса. Биогаз в этом отношении представляет собой универсальное средство, особенно при реализации таких проектов, как «Экодом», проведение мероприятий по ремедиации, утилизации отходов и т.д.

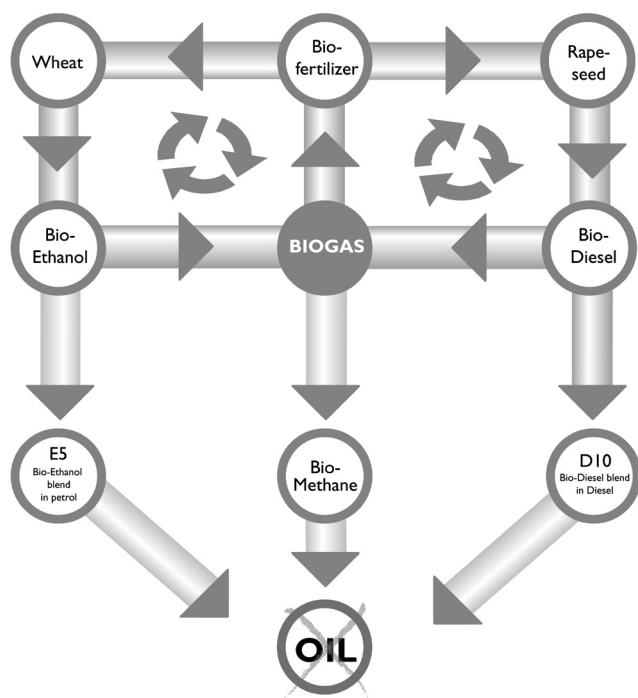


Рис. 4. Место биогаза в биотопливном комплексе.

Источник: <http://www.svenskbiogas.se/sb/press/pressbilder/grongasanlaggningen-nkpg/h-cycle-of-renewable-fuels.pdf>

В настоящее время эта тема выходит за рамки узкопрофессиональных представлений, как это было еще лет 20–30 назад. Реальности глобализации вовлекают практически все человечество в необходимость определения государственной и общественной позиции по данному вопросу. Европа и древние государства (Китай, Индия) дают в этом отношении наглядный пример позитивного подхода. Пора и государству, занимающему 1/7 часть суши, подключиться к решению столь актуальных вопросов на уровне, адекватном науке и практике XXI столетия.

Надо отметить, что всплеск интереса к биогазу был в нашей стране в 80-х годах и шел параллельно с прогрессивным развитием биотехнологии. Однако затем все рухнуло на всем постсоветском пространстве. Тем не менее сохранились еще и кадры, и некоторые разработки принципиально не устарели. Поэтому при надлежащей поддержке сверху все может быстро стать на места.

## Литература

1. Елистратов В.В. и др. Обоснование комплексных энергетических технологий на полигонах твердых бытовых отходов // Энергетическая политика. Вып. 3, 2001. — С. 38–41.

2. Калюжный С.В., Данилович Д.А., Ножевникова А.Н. Анаэробная биологическая очистка сточных вод. — М.: ВИНТИ, Итоги науки и техники, сер. Биотехнология. — 1991. — Т. 29. — 187 с.
3. Калюжный С.В., Пузанков А.Г., Варфоломеев С.Д. Биогаз: Проблемы и решения / В кн.: Итоги науки и техники: ВИНТИ АН СССР. — М., 1988. — Т. 21.
4. Калюжный С.В., Скляр В.И. Высокоэффективная энергопроизводящая очистка концентрированных сточных вод промышленности // Журнал депонированных рукописей. — 2001 Январь. — № 1. <http://www.mte-eco.ru/>
5. Козловская С.Б., Сапрыкин В.И. Технология извлечения и утилизации биогаза полигонов ТБО. <http://www.ecologylife.ru/utilizatsiya-2003/tehnologiya-izvlecheniya-i-utilizatsii-biogaza-poligonov-TBO>
6. Лифшиц А.Б., Гурвич В.И. Утилизация свалочного газа — мировая практика, российские перспективы // Чистый город. — 1999. — № 2. — С. 8–17.
7. Масликов В.И. Энергетическое использование биогаза полигонов твердых бытовых отходов. <http://baltfriends.ru/rus/publ/renwr/reo7.htm>
8. Панцхава Е.С., Пожарнов В.А. В перспективе Россия — крупнейший поставщик биотоплива на мировой рынок // Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология». <http://www.cbio.ru/modules/news/print.php?storyid=1129>
9. Родина Е.М., Ильясов Ш.А., Абайханова З.А. Использование эмиссии метана из отходов для получения биогаза // Вестник КРСУ. — 2003. — № 6. <http://www.krsu.edu.kg/vestnik/2003/v6/a04.html>
10. Сафин Р.Г., Голубев Л.Г., Лашков В.А. и др. Биогазовая установка анаэробного сбраживания органических отходов. Патент. 1993.01.26. [http://www.ntpo.com/patents\\_gas/gas\\_3/gas\\_53.shtml](http://www.ntpo.com/patents_gas/gas_3/gas_53.shtml)
11. Abbasi S.A. Modelling and simulation of biogas system economics. — Ashish, India, 2005. — 380 p.
12. AgSTAR Handbook. A Manual for Developing Biogas Systems at Commercial Farms in the United States / Roos K.F. and Moser M.A. (eds.). — EPA-430-B-97-015, 1997.
13. Amon T., Amon B., Kryvoruchko V., Zollitsch W., Ma. Biogas production from maize and dairy cattle manure. Influence of biomass composition on the methane yield [An article from: Agriculture, Ecosystems and Environment] [HTML] (Digital). — Elsevier, 2007.
14. Barnett A., Pyle L., Subramanian S.K. Biogas technology in the third world: a multidisciplinary review. — IDRC, 1978. — 132 p.
15. 21<sup>st</sup> century essential guide to methane and biogas: landfill methane and manure for energy. AgStar program, recovery and mitigation, greenhouse gas emissions ... biofuels, bioenergy, and biobased products (CD-ROM). — Progressive Management, 2005. — 8878 p.

16. *Daxiong Q., Shuhua G., Baofen L., Gehua W.* Diffusion and innovation in the Chinese biogas programme // World Development. – 1990. – Vol. 18. – N 4. – P. 555–563.
17. *Demuyck M., Nyns E.J. (Eds.)* Biogas plants in Europe: A practical handbook (Solar Energy R&D in the Ec Series E.). – Springer, 2007. – 361 p.
18. *Deublein D., Steinhauser A.* Biogas from waste and renewable resources: An introduction. – Wiley-VCH (in press)
19. *Farr C.A.* Biogas-Praxis. – Oekobuch Vlg + Verstand, 2005. – 238 S.
20. *Fulford D.* Running a biogas program: A handbook. – Practical Action, 1988. – 188 p.
21. *Handbook of biogas utilization (2<sup>nd</sup> ed.).* – Diane Pub., 1996. – 230 p.
22. *Handbook on Bio Gas and its applications.* – NIIR, 2004. – 454 p.
23. *House D.* The biogas handbook. 3<sup>rd</sup> ed. – House Press, 2006. – 263 p.
24. *Leach G.* Household energy in South Asia // Biomass. – 1987. – Vol. 12. – P. 155–184.
25. *Lichtman R.L.* Biogas systems in India. – VITA, 1983. – 130 p.
26. *Nijaguna B.T.* Biogas technology. – New Age International, 2002.
27. *Petersen S.O.* The role and potential of biogas production for reducing greenhouse gas emissions from animal manure / In: The Future of Biogas in Europe II. European Biogas Workshop. 2003, October 2–4<sup>th</sup>. Esbjerg, Denmark. – P. 15–19.
28. *Renewable sources of energy. Volume II: Biogas.* – United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, 1981. – 280 p.
29. *Santosh Y., Sreekrisnan T.R., Kohli S. and Rana V.* Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review // Bioresource Technology. – 2004 Oct. – Vol. 95. – N 1. – P. 1–10.
30. *Sasse L.* Biogas plants: Design and detail of simple biogas plants. – Vieweg, 1984. – 85 p.
31. *Van Buren A. (Ed.)* A Chinese biogas manual: Popularising technology in the countryside. – Practical Action, 1998. – 136 p.

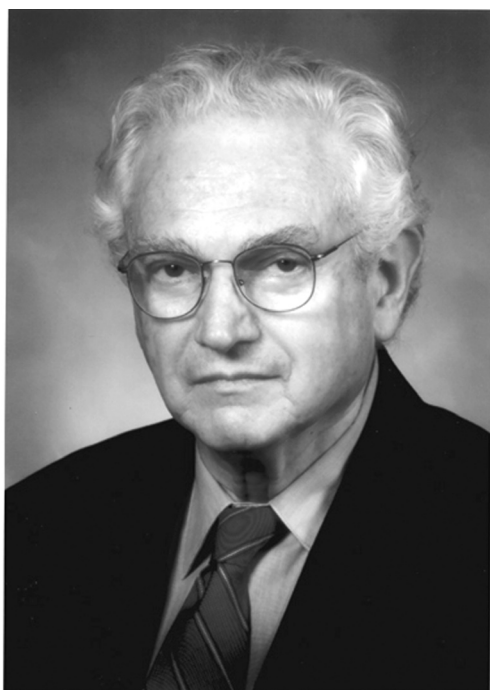
Интернет-источники:

- <http://ru.wikipedia.org/wiki/>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Biogas>
- <http://www.abercade.ru/reports/biogazrep07>
- [http://www.bioenergy.by/mejdu\\_1.htm](http://www.bioenergy.by/mejdu_1.htm)
- [http://www.epa.gov/agstar/pdf/ag\\_fund\\_doc.pdf](http://www.epa.gov/agstar/pdf/ag_fund_doc.pdf)
- [www.ruralenergyprogram.ge/files/microsoft\\_word\\_-\\_biogas\\_report\\_english.pdf](http://www.ruralenergyprogram.ge/files/microsoft_word_-_biogas_report_english.pdf)
- <http://www.svenskbiogas.se/>
- <http://www.i-sis.org.uk/BiogasChina.php>
- [www.completebiogas.com](http://www.completebiogas.com)
- [www.p2pays.org/ref/22/21262.pdf](http://www.p2pays.org/ref/22/21262.pdf)
- [www.gtz.de/de/dokumente//en-biogas-volume1.pdf](http://www.gtz.de/de/dokumente//en-biogas-volume1.pdf)
- [www.gtz.de/de/dokumente//en-biogas-volume2.pdf](http://www.gtz.de/de/dokumente//en-biogas-volume2.pdf)

## К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ МАРШАЛЛА НИРЕНБЕРГА: ЕГО ВКЛАД В РАЗГАДКУ ТРИПЛЕТНОГО КОДА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

О.В. ВОРОБЬЕВА, В.С. ВОРОБЬЕВ\*

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



В истории молекулярной биологии есть важная веха, связанная с расшифровкой триплетного кода. И хотя это явилось преемственным событием, к которому были причастны многие выдающиеся исследователи, все-таки оно ассоциируется главным образом с именем М.У. Ниренберга. Это произошло в уже далекие от нашего времени 60-е годы. Тем не менее сам автор открытия жив и продолжает работу, а в 2007 году ему исполнилось 80 лет. Согласно научным традициям, в юбилейные дни принято анализировать биографию и достижения ученых.

Маршалл Уоррен Ниренберг родился 10 апреля 1927 г. в Нью-Йорке в семье Ниренбергов — Гар-

ри и Минервы (урожденной Быковски). В детстве Маршалл перенес ревматизм, поэтому семья в 1939 г. переехала в Орlando (штат Флорида). Экзотическая природа субтропиков привила ему любовь к биологии. Он вел тщательный дневник наблюдений за растениями, насекомыми, птицами, как бы моделируя свои будущие научные протоколы. В 1945 г. по окончании средней школы поступил в Университет Флориды в Гейнсвилле. В 1948 году получил степень бакалавра по зоологии и химии. В 1952 г. он подготовил магистерскую диссертацию по зоологии (тема была связана с изучением майской мухи). Спустя год Ниренберг перешел в Мичиганский университет в Анн Арборе, где в 1957 г. он получил степень доктора философии за работу по биохимии, написав диссертацию о пермеазе гексозы. В этом же году молодому ученому вручается двухлетняя постдокторская стипендия Американского ракового общества для обучения в Институте артрита, болезней обмена веществ и пищеварительного тракта Национального института здоровья (Бетесда, штат Мэриленд). Здесь он занимался и изучением ферментов метаболизма. В 1960 г. он стал штатным научным сотрудником по биохимии.

Начиная с 1959 г. Ниренберг приступает к исследованию ДНК, РНК и синтеза белков. Именно на этом пути его ждал беспрецедентный успех, сразу выдвинувший его в число лучших биохимиков мира. В 1961 г. он вместе с Г.И. Маттеи публикует работу о начале расшифровки генетического кода. В 1962 году об этой новости узнали повсеместно. Ниренберг был удостоен награды Национальной академии наук и с 1962 г. становится руководителем Группы биохимической генетики (с 1966 г. — лаборатории) в Национальном институте сердца с достаточным штатом молодых сотрудников. Благодаря этому к 1966 году ему удалось полностью распознать генетический код для всех 20 аминокислот.

В год своего великого открытия (1961) он женился на Пероле Зальцман, биохимике из Бразилии, с

\* Автор для переписки:

© 2007 г. Воробьев Вадим Сергеевич,  
к.м.н., член Центрального Правления ОБР  
119296 Москва, Университетский пр-т, 9  
E-mail: obr@biorosinfo.ru

которой прожил 40 лет до ее смерти в 2001 г. Брак был бездетным.

В 1968 г. Ниренберг награждается Нобелевской премией (совместно с Робертом Уильямом Холли и Харом Гобиндом Кораной).

После данного триумфа ученый отходит от изучения генетического кода и переключается на нейробиологию, которой он занимался около 30 лет. Кроме работы в Национальном институте здоровья, он занимал должность профессора в Университете Мэриленда в Колледж Парке и адъюнкт-профессора — в Медицинском центре Университета Джорджа Вашингтона.

Следует подробно рассмотреть обстоятельства выхода в свет его эпохального исследования, опубликованного в 1961 г. Многие факты известны, есть и прекрасное автобиографическое описание пером самого автора [10]. При этом надо изложить краткую предысторию этого события. В 1958 году Эдвард Тейтем, соавтор концепции «один ген — один фермент», получая Нобелевскую премию, сказал в конце своей лекции, что для решения проблемы генетического кода понадобится еще поколение исследователей. И вот спустя 3 года после предсказания выдающегося молекулярного биолога первый ключ к ее решению находит никому не известный 34-летний американский биохимик. Это был Маршалл Ниренберг. Совместно со своим коллегой Генрихом Иоганном Маттеи (рис. 1), стажером из Германии (Бонн), они в 1961 г. осуществили простой остроумный эксперимент.

Они искусственно синтезировали РНК, состоящую только из урацила, — нуклеотида, который встречается только в РНК (аналог тимина ДНК). Затем они добавляли эту синтетическую полиурацильную РНК в бесклеточный экстракт *Escherichia coli*, который содержал ДНК, РНК, рибосомы и другие клеточные материалы, необходимые для синтеза белка. После этого добавляли ДНКазу, которая расщепляет только ДНК, в результате чего не может синтезироваться какой-либо белок, кроме как под воздействием синтетической РНК. Далее в экстракт вводили одну радиоактивно меченную аминокислоту и 19 немеченных, последовательно перебирая разные варианты.

В итоге было показано, что в экстракте с радиоактивно меченым фенилаланином синтезированный белок (полифенилаланин) также содержал радиоактивную метку ( $^{14}\text{C}$ ). Авторами был сделан вывод о том, что ими обнаружен в РНК генетический код для фенилаланина — UUU (три урацильных основания) — и соответственно последовательность AAA в молекуле ДНК. Это был

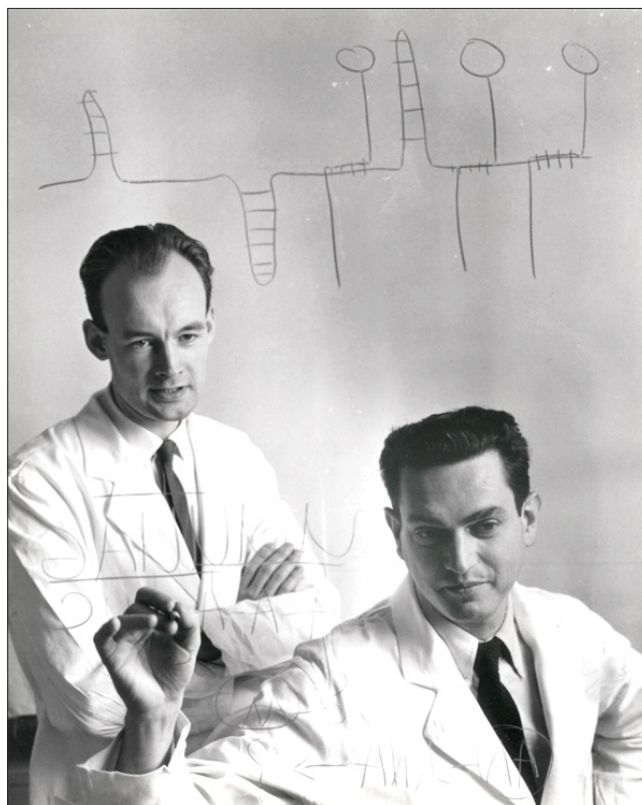


Рис. 1. М.У. Ниренберг и Г.И. Маттеи (слева) в период работы над расшифровкой генетического кода (1961 г.)

Источник: [http://profiles.nlm.nih.gov/JJ/V/B/V/B/X/\\_/jjbbbx.jpg](http://profiles.nlm.nih.gov/JJ/V/B/V/B/X/_/jjbbbx.jpg)

первый этап в расшифровке кодонов генетического кода и первое доказательство мРНК.

Статья с описанием полученных результатов была послана в журнал *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* и вышла в свет в октябре 1961 г. [16]. Еще раньше один из авторов — М. Ниренберг — доложил о них в августе 1961 года в Москве на 5-м Международном биохимическом конгрессе. Сначала молодой ученый сделал доклад на секционном заседании (рис. 2). Нечеткое название и отсутствие известности автора не вызвали интереса. Его попросили сделать доклад повторно на заключительном пленарном заседании. Тут уже все стало ясно, и аудитория по достоинству оценила реальность научного достижения.

Начиная с этого момента, Ниренберг попал в лучи славы и всемирного признания, которые сопровождают его до сих пор. Журнальная публикация 1961 г. и последующие статьи [12] расширяли круг специалистов, ознакомившихся с кардинальным событием в молекулярной биологии. Проявляла активность и пресса, широко оповестившая об этом и дававшая самые высокие,



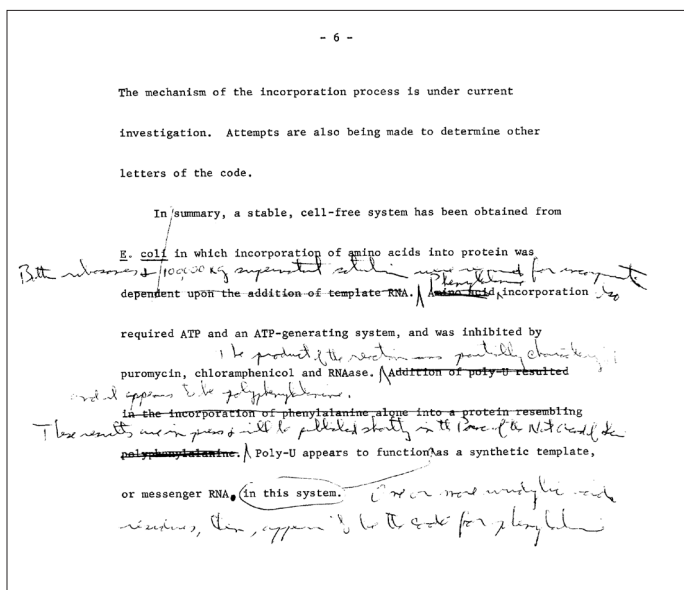


Рис. 2. Страница из доклада М. Ниренберга на 5-м Международном биохимическом конгрессе в Москве (август 1961 г.)  
 Источник: [http://profiles.nlm.nih.gov/JJ/V/V/K/V/\\_/jjbbkb.pdf](http://profiles.nlm.nih.gov/JJ/V/V/K/V/_/jjbbkb.pdf)

нередко эмоционально окрашенные оценки. Так, например, журналист Джон Пфайфер утверждал, что работа Ниренберга и Маттеи является самым выдающимся событием 1961 года, оставляющим позади запуск в космос Гагарина. Открытие генетического кода, регулирующего жизненные процессы, по его мнению, является прорывом в биологии, как это было в физике при открытии Ньютоном закона всемирного тяготения.

Публикация Ниренберга и Маттеи почти совпала по времени с выходом в свет статьи Френсиса Крика, Сиднея Бреннера и др. в «Nature», в которой была окончательно доказана гипотеза триплетного кода Гамова о том, что 3 основания ДНК кодируют 1 аминокислоту [5].

Вскоре (в 1962 г.) Г.И. Маттеи вернулся на родину, а М. Ниренберг продолжил работы по дальнейшей расшифровке генетического кода с группой новых молодых сотрудников. С помощью указанного метода удалось раскрыть еще однобуквенные кодоны: AAA — лизин, CCC — пролин (кроме GGG для глицина — причина этого была выяснена позднее). Кроме того, с помощью синтеза искусственных полинуклеотидов, состоящих из 1, 2, 3 или 4 оснований, были установлены около 50 кодонов из нескольких букв для разных аминокислот. Однако метод давал информацию только о составе кодона, но не о последовательности букв в нем. Требовалась существенная модификация методического подхода.

Следующий прогресс в данном деле был связан с разработкой М. Ниренбергом и Ф. Ледером в 1964 г. нового метода, позволившего быстрее, точнее и с более широкими возможностями расшифровывать различные кодоны, максимальное число которых должно было составлять 64 [15]. Об этом методе было сообщено на 6-м Международном конгрессе биохимиков в Нью-Йорке в 1964 г. Метод основан на отделении связанной с рибосомами аминоацил-тРНК (АА-тРНК) от несвязанной АА-тРНК. При этом нуклеотидная последовательность кодонов РНК дешифруется посредством определения вида АА-тРНК, который связывается с рибосомами в ответ на тринуклеотиды известной последовательности. В результате в течение года код был полностью расшифрован (рис. 3), о чем Ниренберг объявил в 1966 г. [6, 7, 14, 19].

Надо отметить, что параллельно шел Северо Очоа, расшифровавший триплеты для 11 аминокислот, а затем к решению данной проблемы подключился Х.Г. Корана (в независимых исследованиях), который синтезировал 64 тринуклеотида химическими методами, тогда как Очоа и Ниренберг использовали ферментные методы. И как венце этому циклу работ послужило исследование Роберта Холли, определившего в 1965 г. структуру тРНК, переносящей аланин в клетках дрожжей.

В 1968 году М.У. Ниренбергу, Х.Г. Коране и Р.У. Холли была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине за расшифровку генетического кода и его функции в синтезе белка. Г.И. Маттеи был забыт (возможно, как выбывший из систематических исследований данной темы), а С. Очоа тоже не был включен (скорее всего, аргументом могло послужить получение им Нобелевской премии в 1959 г.).

**THE GENETIC CODE**

UUU Δ ○ PHE	UCU Δ ○	UAU Δ ○ TYR	UGU Δ ○ CYS
UUC Δ ○	UCC Δ ○ SER	UAC Δ ○	UGC Δ ○
UUA Δ ○ LEU	UCA Δ ○	UAA Δ ○ TERM	UGA Δ ○ TERM
UUG Δ ○	UCG Δ ○	UAG Δ ○ TERM	UGG Δ ○ TRP
CUU Δ ○	CCU Δ ○	CAU Δ ○ HIS	CGU Δ ○
CUC Δ ○ LEU	CCC Δ ○ PRO	CAC Δ ○	CGC Δ ○ ARG
CUA Δ ○	CCA Δ ○	CAA Δ ○ GLN	CGA Δ ○
CUG Δ ○	CCG Δ ○	CAG Δ ○	CGG Δ ○
AUU Δ ○	ACU Δ ○	AAU Δ ○ ASN	AGU Δ ○ SER
AUG Δ ○ ILE	ACC Δ ○ THR	AAC Δ ○	AGC Δ ○
AUA Δ ○	ACA Δ ○	AAA Δ ○ LYS	AGA Δ ○ ARG
AUG Δ ○ MET	ACG Δ ○	AAG Δ ○	AGG Δ ○
GUU Δ ○	GCU Δ ○	GAU Δ ○ ASP	GGU Δ ○
GUC Δ ○	GCC Δ ○	GAC Δ ○	GGC Δ ○
GUA Δ ○ VAL	GCA Δ ○ ALA	GAA Δ ○	GGA Δ ○ GLY
GUG Δ ○	GCG Δ ○	GAG Δ ○ GLU	GGG Δ ○

Δ BASE SEQUENCE. [AA-tRNA-TRINUCLEOTIDE-RIBOSOME] COMPLEX  
 ○ BASE COMPOSITION. RNA TEMPLATES FOR PROTEIN SYNTHESIS

Рис. 3. Генетический код (рисунок взят из Нобелевской лекции Ниренберга 1968 г.)

Обращаясь к лауреатам, член Нобелевского комитета по физиологии и медицине от Каролинского института профессор Петер Рейхард отметил первопроходческую роль М. Ниренберга в расшифровке генетического кода. При этом он сравнил труд по расшифровке с Розеттским камнем, на котором параллельно представлены египетские иероглифы и греческие буквы, и подчеркнул, что Ниренберг не пошел по этому пути сравнения буква по букве между нуклеиновой кислотой и белком, а использовал метод матричного синтеза на простой системе с одной буквой. Заключил фразу он следующими словами: «Таким образом Ниренберг не только расшифровал первый иероглиф, но и показал, как механизм клетки может быть использован для трансляции генетического кода вообще».

Характерно также отношение самого лауреата к своему успеху. В речи на банкете 10 декабря 1968 г. он сказал, что труд отдельного человека в науке неотделим от работы других и поэтому он представляет здесь, в Швеции все сообщество исследователей. Сходные мысли высказывали многие Нобелевские лауреаты и до, и после него. Поэтому не удивительно, что такой скромный и непритязательный человек, как Ниренберг, объективно и сдержанно относился к награждению.

Казалось бы, находясь на вершине такого триумфа — Нобелевская премия в 41 год, работа в русле центральных проблем молекулярной биологии и т.д., Ниренберг должен был продолжить столь успешную линию своих исследований. Но этого не произошло. После получения премии он полностью изменил направление работ, обратившись с нейробиологии, которая также в 60-е годы прошлого века переживала большой подъем. Фактически Ниренберг повторил путь М. Дельбрюка и Ф. Крика, которые сходным образом резко сменили курс от генетики к нервной системе.

Первой задачей Ниренберга была попытка применить генетический код к расшифровке нервного кода на основе анализа последовательностей электрических импульсов (спайков), используя метод аналогий (биохимик вдохновлялся результатами тонких исследований знаменитого английского нейрофизиолога, лауреата Нобелевской премии лорда Эдриана). Однако дальше умозрительных предположений здесь дело не пошло. Даже сам Ниренберг в своей лекции в Говардовском университете в 1969 г. под названием «Genetic versus neural information processing systems» («Сравнение генетических и нервных систем обработки информации») назвал свои соображения «спекуляциями».

Далее Ниренберг избрал в качестве объекта исследования нейробластому и занимался этим вопросом 10

лет (1967–1976). Вместе с коллегой по Национальному институту здоровья Филлипом Нельсоном он разработал методы культивирования клеток нейробластомы *in vitro*, выделил различные клеточные линии, создал банк клеток, которым пользовались ученые разных стран [4, 17]. Этот цикл нейробиологических работ Ниренберга важен тем, что он привнес высокий методический уровень молекулярной биологии и биохимии в новую область изучения нервной системы. Излишне говорить о том, что он приобрел значительный авторитет среди нейробиологов и онкологов.

От нейробластомной тематики в 1976 г. он перешел к исследованию проблемы нейрогенеза сетчатки под влиянием гипотезы Роджера Сперри о молекулярном предопределении топографии каждой клетки в сетчатке. На модели сетчатки куриного эмбриона ему удалось с помощью моноклональных антител показать концентрацию белков в определенных местах сетчатки, что свидетельствовало об определенном топографическом градиенте нейронов. По этому вопросу вышел ряд публикаций в 80-е годы [20].

После работы с сетчаткой куриных эмбрионов Ниренберг обратился к изучению классического объекта генетики — *Drosophila melanogaster*. В это время фокус внимания ученого начал сосредоточиваться на генетическом объяснении развития нервной системы, чему в известной степени способствовало появление весьма эффективного метода ПЦР (Кэрри Муллис предложил его в 1983 г.). Кроме того, большое влияние оказало на многих исследователей направление, связанное с изучением онкогенов.

От внимания Ниренберга не ускользнуло сообщение Вальтера Геринга из Базельского университета (1983) об открытии новой группы генов, названных генами *Noterbox*, которые влияют на экспрессию других генов, важных для развития. Он поручил своему сотруднику Киму Й., прибывшему из Кореи, исследовать гены *Noterbox* у дрозофилы. Результат оказался быстрым и плодотворным: кроме 17 известных генов такого типа были открыты 4 новых, которым дали наименования NK-1, NK-2, NK-3, NK-4 (интересно, не монограммы ли это *Nirenberg-Kim*?) [8]. Ниренберг высоко оценил данное достижение. В этой связи надо упомянуть, что в 2000 году после определения полного генома дрозофилы один из авторов этого проекта Роджер Хоскинс подчеркнул, что из 289 генов человека, причастных к тому или иному заболеванию, 177 сходны с генами дрозофилы. Так что и гены *Noterbox* могут вносить свой вклад в развитие патологии человека.

При анализе цикла нейробиологических работ М. Ниренберга можно сделать заключение о высоком методическом уровне, преемственности, актуальности и др. Однако в общем они уступают тому экстраординарному взлету научной мысли, который был достигнут ученым при исследовании проблемы генетического кода. Следует заметить, что и Дельбрюку и Крику не удалось получить лавров в науке о мозге. По-видимому, не многим удастся быть равновеликими в разных науках, как Аристотелю или Ньютону. История науки свидетельствует, что природа приоткрывает свои тайны дробно, постепенно, отводя каждому лицу, жаждущему выяснения новых истин, строго дозированную информацию. Кроме того, выдающиеся умы в таких точных науках, как химия и физика, входя в область нейробиологии, попадают в дуалистическую сферу мозга и сознания в надежде, применив материальные методы, основанные на измерениях, к изучению идеального, познать в конечном итоге тайну мышления. При такой постановке намерение исходно обречено на неудачу, по крайней мере, из-за нахождения на монистической платформе. В случае химика Ниренберга этого не произошло, поскольку он углубился в конкретные аналитические исследования, а физики Дельбрюк и Крик чаще обращались к обобщениям и поэтому меньше преуспели в нейробиологии.

Естественно, ученый за свою жизнь был отмечен высокими званиями и наградами. Он является членом Американской академии искусств и наук, Национальной академии наук, Европейской академии наук и искусств, Папской академии наук, Американского химического общества, Американского общества биохимиков, Общества нейронаук, почетным членом ряда университетов США и т.д. Он удостоен ряда наград: национальная медаль науки, национальная медаль чести (вручена президентом Линдоном Джонсоном в 1968 г.), медаль Пристли Американского химического общества, награда Луизы Гросс-Хорвиц Колумбийского университета, медаль Франклина Франклиновского института и др. Входит в состав редколлегии журналов «Analytical Biochemistry», «Annual Review of Biochemistry», «Cellular and Molecular Neurobiology», «Journal of Neurogenetics», «Molecular Neurobiology».

В заключение нужно указать на активную социальную позицию ученого. Он всегда не замыкался в кругу своей лаборатории. Известно его участие в коллективном обращении ученых мира к человечеству с предостережением относительно опасности, которая грозит экологии от человеческой деятельности (1992). Еще раньше в 1967 г. он опубликовал в журнале «Science»

статью «Will society be prepared», в которой призывал к умеренности в отношении прогресса молекулярной биологии, оставляя последнее слово за интересами и благосостоянием общества. Сходные мысли высказывали и другие Нобелевские лауреаты: в 70-е годы — Поль Берг, в 80-е годы — Кристиан Анфинсен. Эти же проблемы биоэтики волновали и волнуют человечество на рубеже веков и в наступившем столетии — проект «Геном человека», эмбриональные стволовые клетки, клонирование и т.д. И надо сказать, что Ниренберг и здесь не остался безучастным. В 1998 году он подписал письмо от Американского общества клеточных биологов президенту Биллу Клинтону и членам Конгресса США против клонирования человека. Имеется еще множество примеров неравнодушия Ниренберга к актуальным современным социальным вопросам: здесь и борьба против СОИ, и за ратификацию конвенции о химическом оружии, и поддержка диссидентов в СССР и т.д.

80-летний ученый по-прежнему активен и в творческом отношении. Только за период 2000–2007 гг. он напечатал 17 работ в ведущих профильных журналах (не считая письма к Бушу вместе с десятками американских Нобелевских лауреатов и т.д.). Среди его соавторов появились и лица с русскими и украинскими фамилиями (Иванов А.И., Степченко А.).

Опубликованы биографии ученого [1, 2, 3, 9, 11]. Наиболее полная информация о жизни и деятельности Маршалла У. Ниренберга представлена на Нобелевском сайте <http://nobelprize.org/> и сайте <http://profiles.nlm.nih.gov/JJ/>. Библиографию трудов см. на сайтах <http://public.nhlbi.nih.gov/Staff/Home/UserInputForPerson.aspx?source=external&OID=956&tab=Publications&tabID=Ibg> и <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=pubmed&term=Nirenberg%20M%5Bau%5D&dispmax=50>.

## Литература

1. *Лауреаты Нобелевской премии. Энциклопедия: Пер. с англ. В 2-х т. Т. 2.* — М.: Прогресс, 1992. — С. 160–163.
2. *Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002.* — СПб.: Издательство ДЕАН, 2003. — С. 108–114.
3. *Харгиттаи И. Откровенная наука: Беседа с корифеями биохимии и медицинской химии / Пер. с англ.* — М.: КомКнига, 2006. — 544 с.
4. *Breakefield X.O. and Nirenberg M.W. Selection of neuroblastoma cells that synthesize certain transmitters //*

- Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1974 Jun. – Vol. 71. – N 6. – P. 2530–2533.
5. Crick F.H., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R.J. General nature of the genetic code for proteins // Nature. – 1961 Dec. – Vol. 192. – P. 1227–1232.
  6. Doctor B.P., Loebel J.E. and Kellogg D.A. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1966. – Vol. 31. – P. 543.
  7. Hatfield D. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1966. – Vol. 31. – P. 619.
  8. Kim Y., Nirenberg M. Drosophila NK-homeobox genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1989 Oct. – Vol. 86 (20). – P. 7716–7720.
  9. Nigel J.T.Th. The life and scientific work of Marshall W. Nirenberg / In: Richard Olson & Roger Smith (eds.). The Biographical Encyclopedia of Scientists. – N.-Y.: Marshall Cavendish, 1998.
  10. Nirenberg M. Historical review: Deciphering the genetic code // Trends Biochem. Sci. – 2004 Jan. – Vol. 29. – N 1. – P. 46–54.
  11. Nirenberg M.W. / In: Current Biography, 1965, April.
  12. Nirenberg M.W. The genetic code: II // Scientific American. – 1963, March.
  13. Nirenberg M. The genetic revolution: the importance of flies and worms // Am. J. Psychiatry. – 2003 Apr. – Vol. 160 (4). – P. 615.
  14. Nirenberg M.W., Caskey T., Marshall R., Brimacombe R., Kellogg D., Doctor B., Hatfield D., Levin J., Rottman F., Pestka S., Wilcox M., Anderson F. The RNA code and protein synthesis // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1966. – Vol. 31. – P. 11–24.
  15. Nirenberg M.W., and Leder Ph. RNA codewords and protein synthesis // Science. – 1964. – Vol. 145. – P. 1399. См. также: Nirenberg M.W. The genetic code. Nobel lecture. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1968/nirenberg-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1968/nirenberg-lecture.pdf)
  16. Nirenberg M.W., and Matthaei J.H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1961 Oct. – Vol. 47. – N 10. – P. 1588–1602.
  17. Nirenberg M., Wilson S.P. et al. Synapse formation by neuroblastoma hybrid cells // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. – 1983. – Vol. 48. – Pt. 2. – P. 707–715.
  18. Nobel Lectures in Molecular Biology 1933–1975. – N.-Y.: Elsevier, 1977. – 534 p.
  19. Pestka S. and Nirenberg M. Codeword recognition on 30 S ribosomes // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1966. – Vol. 31. – P. 641–656.
  20. Trisler G.D., Schneider M.D., Nirenberg M.W. A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1981. – Vol. 78. – N 4. – P. 2145–2149.

Интернет-источники:

<http://profiles.nlm.nih.gov/JJ/>  
<http://nobelprize.org/medicine/laureates/1968>  
<http://en.wikipedia.org/wiki/>  
<http://www.vega.org.uk/video/programme/129>  
<http://www.nlm.nih.gov/hmd/manuscript/ead/nirenberg566.html>

**Резюме.** Статья посвящена 80-летию со дня рождения выдающегося американского биохимика Маршалла У. Ниренберга. Акцент делается на анализе его вклада в расшифровку генетического кода.

**Ключевые слова:** история науки, молекулярная биология, генетический код, биографии, Маршалл Уоррен Ниренберг.

## TO MARSHALL NIRENBERG'S 80<sup>TH</sup> BIRTHDAY. HIS CONTRIBUTION TO DECIPHERING OF THE TRIPLET CODE OF HEREDITY

O.V. VOROBYEVA, V.S. VOROBYEV

*Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow*

The article was devoted to 80<sup>th</sup> anniversary from birthday of Marshall W. Nirenberg, an outstanding American biochemist. Accent was done on analysis of his contribution to deciphering the genetic code.

**Keywords:** history of science, molecular biology, genetic code, biographies, Marshall Warren Nirenberg.

## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2007 ГОДА\*

## ПЕРСОНАЛИИ

К 70-летию со дня рождения  
академика РАН В.Т. Иванова



**18 сентября 2007 года** исполнилось 70 лет со дня рождения академика РАН Вадима Тихоновича Иванова, директора Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, члена Президиума РАН, известного российского биохимика.

Вадим Тихонович Иванов родился в 1937 г. в Феодосии (Крым). В 1960 году окончил химический факультет МГУ. В самом начале своей научной деятельности стал взаимодействовать с М.М. Шемякиным и Ю.А. Овчинниковым, что определило его научные интересы, а именно: изучение химии физиологически активных соединений и белково-пептидных веществ.

Им выполнен ряд важных исследований: разработаны методы получения депсипептидов, осуществлен полный химический синтез природных депсипептидов и их аналогов, установлены конформационные особенности и механизм действия ионофоров валиномицина и энниатинов, определено пространственное строение антибиотика грамицидина С, гормона брадикинина и др. Это выдвинуло В.Т. Иванова в число наиболее авторитетных отечественных исследователей в области биоорганической химии.

По окончании аспирантуры в 1963 г. работал сначала в должности младшего, затем старшего сотрудника до 1971 г. С 1971 года по настоящее время — заведующий лабораторией химии пептидов, с 1972 по 1988 гг. — за-

меститель директора, а с 1988 года после смерти академика Ю.А. Овчинникова стал бессменным директором Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Он также заведует кафедрой биоорганической химии биологического факультета МГУ (с 1988 г. по настоящее время).

Доктор химических наук (1974), профессор (1976). Избран членом-корреспондентом АН СССР (1976) и академиком (1987) по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений. Состоял членом бюро (1988), заместителем академика-секретаря (1995) и академиком-секретарем Отделения физико-химической биологии РАН (1996—2002).

Он является автором более 400 научных работ, в том числе 3 монографий. Под его руководством выполнено 32 кандидатских диссертации. Он — главный редактор журнала «Биоорганическая химия», входит в состав редколлегии отечественных и иностранных журналов. Им осуществляется ответственная миссия членства во многих профильных экспертных советах и комиссиях, а также научных обществах. Он входит в состав редакционного совета нашего журнала.

Заслуги В.Т. Иванова были высоко оценены научной общественностью как в нашей стране, так и за рубежом. С 1991 г. он состоит действительным членом ВАСХНИЛ (с 1992 г. — РАСХН). Он — действительный член РАЕН (1991), Российской биотехнологической академии (1992), Академии медико-технических наук РФ (1996). Он является иностранным членом Нью-Йоркской академии наук (1993), Национальной академии наук Индии (2000), членом Европейской Академии наук (2002).

Вадим Тихонович награжден золотой медалью РАН имени Ю.А. Овчинникова (1991). Он является лауреатом Ленинской премии (1978), Государственной премии СССР (1985), премии Правительства РФ (1991).

Ученый имеет и высокие правительственные награды: ордена «Знак Почета», Октябрьской революции, Дружбы народов, «За заслуги перед Отечеством» IV степени и др.

Юбилей В.Т. Иванова встречает в расцвете творческих сил и в обстановке активной работы возглавляемого им коллектива. Редколлегия журнала поздравляет его со знаменательной датой и желает дальнейших успехов.

\* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

**К 70-летию со дня рождения  
члена-корреспондента РАН А.М. Боронина**



**30 сентября 2007 года** — 70 лет со дня рождения Александра Михайловича Боронина, члена-корреспондента РАН, директора Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (Пушино Московской области). Редколлегия журнала поздравляет ученого со славным юбилеем.

А.М. Боронин хорошо известен в среде современных биологов. Он сформировался как исследователь в Пушино, этом замечательном наукограде, оплоте отечественной биологической науки.

Александр Михайлович родился в 1937 году на Волге, в Ульяновской области. Как и многие пушинцы, он прошел типичный путь. По окончании биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в 1965 г. он связывает свою жизнь с только что открытым Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, как оказалось, прочно и навсегда. Здесь он последовательно прошел все ступени иерархической лестницы — от начинающего стажера-исследователя до директора.

Его научные интересы сконцентрировались на микробиологии, где им выполнены фундаментальные труды в области биологии бактериальных плазмид (псевдомонад), экологической генетики микроорганизмов, биотехнологии. Он — автор 370 публикаций, из них — 3 монографии.

Сконструированные в его лаборатории штаммы, способные к деградации ксенобиотиков и защите растений от почвенных фитопатогенных микроорганизмов,

защищены патентами и получили практическое применение.

Он защищает докторскую диссертацию, в 1988 г. получает звание профессора и в этом же году утверждается в должности директора Института, которую занимает по настоящее время. В 1994 г. его избирают членом-корреспондентом РАН по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений (специальность «Микробиология»). Член бюро Отделения физико-химической биологии (с 1997 г. по настоящее время).

С 1993 по 2005 гг. был ректором Пушкинского университета, ныне — президент этого уникального вуза. Пушкинский государственный университет — это первый университет, созданный на базе академических институтов естественнонаучного профиля РАН в 1992 году по Постановлению Правительства РФ. Этот вуз готовит специалистов по биотехнологии (наряду с другими биологическими специальностями).

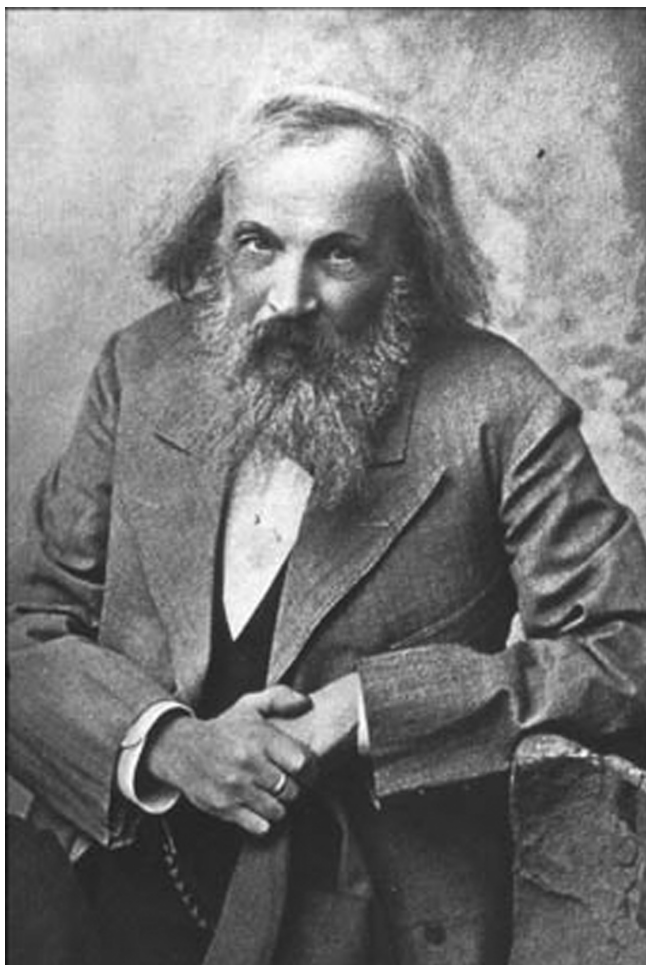
А.М. Боронин — член Президиума Пушкинского научного центра. Соруководитель проекта Тульского государственного университета — Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН «Создание учебно-научного центра рационального природопользования в Тульской области» федеральной целевой программы «Интеграция науки и образования». Является председателем научной программы «Биотехнология защиты окружающей среды». Член Экспертного совета Минпромнауки России по вопросам биобезопасности (с 2001 г.).

Юбиляр награжден орденами Дружбы народов (1981) и Почета (1999). Он является лауреатом премии Президента Российской Федерации в области образования (2001).

Основные труды ученого:

- Биология плазмид (1982);
- Математические модели динамики численностей бактериальных плазмид (1983, в соавт.);
- Биология плазмид бактерий рода *Pseudomonas* (1985);
- Структурная организация и экспрессия гена салицилат гидроксидазы *Pseudomonas putida* BS814 [pBS106] (1998);
- Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений (1998).

## К 100-летию со дня смерти Д.И. Менделеева



2 февраля 2007 г. исполнилось 100 лет со дня смерти Д.И. Менделеева (1834–1907). В связи с этой памятной датой редколлегия журнала публикует сравнительно мало известные заметки великого химика, носящие философский характер. Их он собирался поместить в конце своей книги «Заветные мысли», вышедшей в свет незадолго перед кончиной ученого (1903–1905), однако не сделал этого, сочтя недостаточно полным изложение предмета. В 50-е годы XX века в СССР она была переиздана в 25-томном академическом собрании со значительными купюрами, в том числе с полным изъятием 9-й главы с соображениями о государственном устройстве России. В послеперестроечный период книга «Заветные мысли» вышла в полном объеме с заключительной статьей «Мировоззрение». Эта статья и предлагается вниманию читателя. Вся книга крайне интересна и содержит множество рассуждений и фактического материала по разным предметам: от экономики США до отечественного законодатель-

ства (она имеется на сайте: [http://gallery.economics.ru/cgi-ise/gallery/frame\\_rightn.pl?type=ru&links=/ru/mendeleev](http://gallery.economics.ru/cgi-ise/gallery/frame_rightn.pl?type=ru&links=/ru/mendeleev)). Однако концентрированный обобщенный текст, излагающий гносеологические концепции автора, несомненно, представляет огромную ценность для научных работников по сравнению с аналитическими записками на разные темы, в основном социально-политического и экономического толка. Тем более философские высказывания преподнесены в откровенном, исповедальном жанре. Еще большая ценность данного текста заключается в том, что он написан одним из величайших мировых гениев, открывшим периодическую систему элементов, выстроивших их в законченную классификацию, оставив при этом три (не одну и не пять!) пустых клеточки, которые вскоре были заполнены открытыми химическими элементами. Целевая, интегральная мировоззренческая позиция этого человека очень важна для следующих поколений исследователей (даже если, по мнению ученого, тема не раскрыта полностью).

Статья печатается по: Менделеев Д.И. *Заветные мысли: Полное издание (впервые после 1905 г.)*. — М.: Мысль, 1995. — С. 408–413 [сохранена орфография источника].

## МИРОВОЗЗРЕНИЕ\*

Не могу, даже просто смелости у меня такой не хватает, закончить изложение своих «Заветных мыслей», не попытавшись передать своих исходных положений, выработавшихся всею совокупностью испытанного и узнанного в жизни, так как этими положениями не прямо, а косвенно определяется все мое изложение. Считаю это тем более необходимым в наше время, что оно явно занято «переоценкою» и сосредоточенным стремлением найти вновь как-то затерявшееся «начало всех начал», исходя то из субъективной самостоятельной точки зрения, то из какого-то абстрактного единства, будь оно энергия вообще, или, в частности, электричество, или что-либо иное — только не древнее исходное начало, богом наименованное. От физики до метафизики теперь стараются сделать расстояние до того обоюдно ничтожно малым, что в физике, особенно после открытия радиоактивности, прямо переходят в метафизику, а в этой последней стремятся достичь ясности и объективности

\* В заключение книги «Заветные мысли» Д.И. Менделеев предполагал дать дополнительную главу с изложением своих философских взглядов. С этой целью он и написал работу «Мировоззрение», но затем отказался от намерения ее опубликовать.

физики. Старые боги отвергнуты, ищут новых, но ни к чему сколько-либо допустимому и цельному не доходят; и скептицизм узаконяется, довольствуясь афоризмами и отрицая возможность цельной общей системы. Это очень печально отражается в философии, пошедшей за Шопенгауэром и Ницше, в естествознании, пытающемся «объять необъятное» по образцу Оствальда или хоть Циглера (в Швейцарии, например, в его: *Die wahre Einheit von Religion und Wissenschaft. Von I. H. Ziegler, D-r philos. Zurich, 1904*, и еще лучше в его: *Die wahre Ursache der hellen Lichtstrahlung des Radiums. 1905*), в целой интеллигенции, привыкшей держаться «последнего слова науки», но ничего не могущей понять из того, что делается теперь в науках; печальнее же всего господствующий скептицизм отражается на потерявшей молодежи, так как ей самой, как она знает, зачастую приходится разбираться в явных противоречиях между тем, что она читает и слышит в разных аудиториях одного и того же факультета, что и заставляет молодежь считать себя судьями, а своих учителей, либо одного, либо обоих, — отсталыми, у них опоры ищущими, и только ценить «свободу», понимаемую в виде свободного халата. Известно, что скептицизм-то и сгубил казавшиеся столь крепкими устои древнего мира, и немало мыслителей, думающих то же самое про устои современности. Не думая так, постараюсь, насколько сумею, высказать свою точку зрения, причем, во-первых, надеюсь «гусей не раздражить», а все же сколько-нибудь выяснить те основания, на которых создается скептицизм научного или философского свойства, и, во-вторых, начну прямо с вывода, чего советую краткости ради придерживаться и в готовящихся обсуждениях нашей Государственной думы.

Современный научно-философский скептицизм берет свое начало из вековечно существовавшего и должающего вечно существовать стремления людей признать единство всего внутреннего и внешнего мира, что и выражено в признании единого Бога и в стремлении это исходное понятие об «едином» по возможности реализовать или узнать ближе. Первое признавать правильным, по мне, совершенно необходимо, а второе во всех отношениях неправильно, недостижимо и к скептицизму-то и приводит. Одни видели это единство в солнце, другие — в самодержавии, воображаемом и вечном старике, третьи — в единоличном людском разуме, четвертые — в некоем отвлеченном высшем разуме, пятые видят в какой-то единой материи, шестые — в энергии или силе, седьмые — в воле, восьмые — в индивидуализме, девятые — в человечестве, да мало ли в чем. Стремление

реализовать так или иначе «единое», или «единство», есть естественное следствие пытливости, и за последнее время оно приобрело особую напряженность, когда успехи в реальных науках стали не только явно возрастать, но и быть видными даже в ежедневной жизни. Формализм, придаваемый обыкновенно всем религиозным верованиям, не исключая ни шекеров, ни бабидов, ни протестантов, есть тоже известная реализация того, что реальным требованиям разума очень мало отвечает, потому что вечное, общее и единое во всяком случае логически выше реального, которое познается лишь во временном, частном и многообразном лишь разумом и в отвлечении обобщаемом, что и составляет область наук, а в их числе и философии, если она не становится на ходули науки наук. Науки в сущности отвлекают от прямого реализма, и, если они либо по сюжету реальны, либо реально полезны, потому что дают полезные предсказания, то тем самым только подчеркивается необходимость отвлечений, их значение и полезность. Очень должна быть велика путаница мысли, когда с научными приемами хотят найти реализацию высшего единства, одним реальным выразить множество реальностей или отвлечений. Вот и выходит белка в колесе. А как это увидят, сейчас и бросают, сейчас и впадают в скептицизм по отношению ко всем и всяким обобщениям, конечно, кроме слов, которые сами по себе не что иное, как первичные обобщения. Реализация, какая бы там ни была, обобщения, столь отвлеченного, как общее «единое», или «единство», просто-напросто противоречит самому духу наук и ни к чему, кроме сомнений скептицизма, приводить не может. Порок тут вовсе не в самой идее единства а только в стремлении его реализовать в образы, формы и частные понятия. Никогда этого не достичь по самой логике дела, а общее «единое» не следует и пытаться представить ни в таких матер [иаль] ностях, как вещество или энергия, ни в таких реальностях, каковы разум, воля, индивидуум или все человечество, потому что и то и другое должно охватываться этим общим «единым», и то и другое составляет лишь предметы обобщающих наук.

Итак, я объясняю скептицизм тем, что неразумность заставляет науку, обобщающую реализм и выводы предсказаний его покоряющую на пользу людскую и тем к реальности возвращающую, — заставляет науку относиться с теми же приемами к своим крайним обобщениям. Да этого делать-то не следует, потому что научные обобщения не есть уже меняющаяся безграничность или реальность, а ограничены тем, что удалось изучить (а изучены лишь «песчинки на берегу океана неизвестного», как сказал Ньютон) до того, что стало возможным кое-



что предсказывать, и эти научные обобщения должны оставаться неизменными, пока само изучение реальности не заставит их изменять, расширять и совершенствовать. Оттого-то ничего толкового и полезного и не дала и не дает вся метафизика\*, на которой и покоится весь скептицизм.

Но довольно о нем. Во всяком случае признать громадность массы совершенно неизвестного — неизбежно необходимо. Есть или нет в той или в этой данной области познаний какая-либо грань, которую нельзя перейти, я и рассматривать не стану, потому что для передачи того, что составляет предмет моих исходных мыслей, вовсе это решать и не надобно. Дело идет о данном времени и лишь о том, до чего может ныне достигать разумное обобщение, на чем должно или может соглашаться, хоть временно успокоиться лично, вовсе помимо «начала всех начал», для которого почва создается не изучением, а тем, что называется верою и определяется инстинктом, волею, чувством и сердцем. Ведь где-нибудь да кончаются же обобщения разума? Не сводится же вся его веками собираемая в науке работа на одну разработку частных? Где же грань современных разумных обобщений, если не в «едином» общем? Вот тут вопрос мировоззрения, задача того разряда мыслей, по которому сиздавна отличаются такие просто прикладные науки, как медицинские, инженерно-технические и юридические, от философских, куда относят не только саму философию, филологию и историю, но и все математические и естественные науки. Первые со вторыми связаны так тесно, что в этой тесноте запуталось много умов, но простой здравый смысл ясно сознает, что прикладные науки движутся философскими и в то же время что философские науки разрабатываются только потому, что их хотя бы и тусклый свет все же освещает пути жизни, т.е. служит на пользу и прямо и косвенно — через посредство прикладных наук. Уже одно первичное и явно не могущее никогда закончиться искание новых частей истины, отличающее науку, прямо указывает на стремление ее к усовершенствованию и на признание бездны неизвестного; короче, служение науке учит скромности, соединенной с настойчивостью, и отучает от скороспелой заносчивости и рабства предубеждениям. А так как наука исходя из действительности или реальностей постепенно все же доходит до некоторых положений или утверждений, несомненно оправдывающихся наблюдениями и опытами, то считать их частичной истиной или «законами» право имеют. Этого-то от науки,

\* Но прошу заметить, что я не говорю «не даст», потому что этого знать еще нельзя, ибо границ научному познанию и предсказанию предвидеть невозможно.

кажется, никто и не отнимает. Но так как в республике науки «свобода» мнений обеспечена до такой степени, что нет и попыток спрашивать большинство ни тайно, ни явно, то говорить от имени науки волен не только каждый, чему-либо учившийся, любой писатель, писака и фельетонист, но и простой проходимец, а потому заблудиться в «последних словах науки» чрезвычайно или до крайности легко. И не сыщется тут, пожалуй, никаких, кроме разве отрицательных, признаков для отличения всяких форм узурпации от действительного голоса науки, так как и чутье, здесь могущее руководить, не прирожденно и приобретает только долгим и горьким опытом. Он показывает, однако, что спокойная скромность утверждений обыкновенно сопутствует истинно научному, а там, где хлестко и с судейскими приемами стараются зажать рот всякому противоречию, истинной науки нет, хотя бывает иногда и художественная виртуозность, и много ссылок на «последнее слово науки». Почитайте-ка, как Коперник или Ньютон проводили найденные ими истины, — убедитесь. Наука истинная как будто говорит или советует: «пожалуйста, не верьте на слово и постарайтесь только проверить», — оттого со своей стороны не могу не высказать совета: за науку настоящую считайте только то, что утвердилось после сомнений и всякого рода испытаний (наблюдений и опытов, чисел и логики), а «последнему слову науки» не очень-то доверяйтесь, не попытавши, не дождавшись новых и новых проверок. Новое искание истин — это только и есть наука, но из этого вовсе не следует, что она сводится к «последним словам». Действуя в науке более 50 лет, убеждаешься в необходимости этой осторожности. Доказывать этого здесь не буду, хоть и не закаиваюсь возвратиться к этому предмету в другом месте или при другом случае. Случаев-то благо теперь множество, больше чем когда-нибудь. Да, «переоценку» хотят иные сделать и в науке, такое уж теперь время, всюду — не у нас одних — бродит закваска, и требуется ясно писать «Заветные мысли» хотя бы для того, чтобы избежать хоть части огульных недоразумений. Вот для этой-то цели и считаю необходимым вновь\*\* сказать, что, по моему разумению, грань наук, доньше

\*\* Мысль, здесь излагаемая (о степени ее самостоятельности я и не думаю и даже прямо полагаю, что она очень широко распространена в ученых кругах), выражена была мною в 1902 г. в статье «Попытка химического понимания мирового эфира», помещенной в «Вестнике самообразования», а недавно изданной мною отдельной брошюрой. Может быть, я и ошибаюсь, но все же полагаю, что в эпоху «переоценки ценностей» полезно предъявить то, что считаешь общею ценностью, пускай переоценивают, а то, пожалуй, подумают, что ничего ценного нет и у людей науки и что все дело в молотках «ценовщиков».

---

едва достигнутая и, по всей видимости, еще и надолго долженствующая служить гранью научного познания, грань, за которую начинается уже не научная область, всегда долженствующая соприкасаться с реальностью, из нее исходить и в нее возвращаться, эта грань сводится (повторю опять для избежания недоразумений — по моему мнению) к принятию исходной троицы несливаемых, друг с другом сочетающихся, вечных (насколько это нам доступно узнавать в реальностях) и все определяющих: вещества (или материи), силы (или энергии) и духа (или психоза). Признание их слияния, происхождения и разделения уже лежит вне научной области, ограничиваемой действительностью или реальностью. Утверждается лишь то, что во всем реальном надо признать или вещество, или силу, или дух, или, как это всегда и бывает, их сочетание, потому что одинаково немыслимы в реальных проявлениях ни вещество без силы, ни сила (или движение) без вещества, ни дух без плоти и крови, без сил и материи. Развивать здесь эту тему вовсе не думаю, даже предпочитаю остаться неясным, но высказать ее в «Заветных мыслях» считаю необходимым, потому что не один граф Д. А. Толстой, а с ним целая куча людей полагают по неведению, конечно, что, занимаясь веществом и силами, ему свойственными, естествоиспытатели не признают духа, все сводят на вещество и силы. Такие бывают и есть, не отрицаю, но только преимущественно-то они и выросли на классицизме, что доказывать

— скучища страшная, да и выяснено давным-давно, хотя часто забывается.

Этими замечаниями кончаю книгу, зная или, лучше сказать, понимая, что теперь не такое время, чтобы постепеновские мысли, подобные моим, могли сколько-либо влиять на взбудораженные умы той молодежи, для которой книга эта преимущественно писана. Можно действовать тут только образами, как действовал Сервантес своим Дон-Кихотом. Его вчуже и жалко, и у него чистоту побуждений нельзя не признать, а повторять его все же перестали, потому что уж очень ясно увидели, как ему подобные люди делают только вздор и смешное.

Надо уметь написать о том, как, ища свободы, действуют противу свободы. Увы, у меня нет этих талантов, их не вызывал и не воспитывал. Несмотря, однако, на то что так отношусь к выходящей книге, не только не раскаиваюсь в том, что ее писал, но радуюсь тому, что ее закончил, потому что, как бы то ни было, все же будет из моей книги, надеюсь, ясно, какими мыслями проникались профессоры времен покойного графа Д. А. Толстого, которого, уж признаюсь, считаю первопричиною многих современных русских бед и образцовым умелым бедокуром и смутьяном.

27 сентября 1905 г.  
Д. Менделеев

## СОБЫТИЯ ВТОРОЙ ПОЛОВИНЫ 2007 ГОДА\*

## Некролог

## Памяти Юрия Викторовича Махотина



Редколлегия и редакционный совет журнала «Вестник физико-химической биологии и биотехнологии им. Ю.А. Овчинникова» с глубоким прискорбием извещают, что **6 августа 2007 года** скоропостижно на 65-м году жизни скончался член редколлегии журнала, ученый секретарь Института иммунологии Юрий Викторович Махотин. Его утрата остро и болезненно переживается всеми, общавшимися и трудившимися вместе с ним.

Ю.В. Махотин родился в Москве 14 февраля 1943 года. В 1966 году он окончил II ММИ им. Н.И. Пирогова (ныне РГМУ). Он ценил и любил свою alma mater, поддерживал контакты с однокурсниками, выпускал совместные альманахи воспоминаний и т.д. С 1966 по 1969 гг. обучался в аспирантуре Минздрава СССР, а в 1969–1974 гг. работал младшим научным сотрудником в Институте биофизики МЗ СССР. В 1971 году защитил кандидатскую диссертацию по вопросам радиобиологии. В течение двух лет (1974–1976) трудился в НИИ трансплантологии и искусственных органов, занимаясь проблемой создания искусственного сердца.

В 1976 г. происходит знаковое событие в его жизни — он переходит на работу в издательство «Медицина», где за 16 лет прошел путь от старшего научного редактора до заведующего редакцией, главного редактора и исполняющего обязанности директора. Последние две должности он занимал в переходный период от СССР к России (1991–1992).

Именно здесь, в издательстве развернулся в полной мере талант Юрия Викторовича. Он был прирожденным редактором, он чувствовал слово и знал, как им пользоваться применительно к той или иной идее или факту. Им выпущены десятки книг фундаментального и практического характера по медицине. Весь цвет АМН СССР печатался в 80-е годы в редакции Ю.В. Махотина. Кроме обычных заказных книг, он как составитель выпустил в свет уникальное издание «Книга о здоровье» (1988). Его труд отмечен медалями ВДНХ, грамотами и благодарностями, знаками «Отличник печати», «Отличник здравоохранения». Имеет он и скромную правительственную награду — медаль в память 850-летия Москвы.

В 50-летнем возрасте в послеперестроечный период ему пришлось сменить амплуа — он поступил на работу в Министерство науки РФ, где занимался научно-организационной деятельностью под руководством В.А. Княжева. Здесь он до 2000 года состоял на должностях главного специалиста, заместителя начальника и начальника отдела.

Последние годы жизни Ю.В. Махотин провел в стенах Института иммунологии ФМБА в качестве ученого секретаря. Надо полагать, его профессиональная пригодность к этой работе была вне всяких сомнений, что и подтвердило его честование на 60-летнем юбилее в феврале 2003 года.

Как и любой одаренный человек, тем более русский, он имел множество увлечений вне работы. Прежде всего, это киносъемка — вначале любительская, а затем — достаточно профессиональная, причем с широкой тематикой: от историко-архивной до искусствоведческой. Среди них фильмы: «Дионисий», «В кольцах Кроноса», «Шестая печать», «Кое-что о музыке». Он снял ряд кинофильмов вместе с известными кинорежиссерами (Г.Л. Рошаль, Т.Ю. Вульфвич). Был он и незаурядным, тонким фотографом. Далее — домашний театр, где ставили под его режиссурой серьезные вещи, в том числе по мотивам произведений Н.С. Лескова «Смех и горе» и др. И еще — летние байдарочные походы на протяжении десятков лет, в которых он объездил всю Европейскую

\* Материал подготовлен В.С. Воробьевым, О.В. Воробьевой.

Россию. Все это было естественно, без всякого шума и показухи. Немногие знали об этих его занятиях для души. Он обладал поистине аристократической, почти бунинской сдержанностью. Был немногословен, умел слушать, а когда говорил, то метко, аргументировано и афористично. Все у него было в порядке и с чувством юмора.

Три года редколлегия нашего журнала имела редкую возможность работать рядом с Юрием Викторовичем. Его советы, замечания, правки были всегда точны и уместны и никогда не травмировали самолюбия авторов. Во многом благодаря его высокому редакторскому профессионализму журнал приобрел академический, сбалансированный, строгий характер.

В издательской среде не принято применять эмоциональные, возвышенные эпитеты по поводу достоинств того или иного редактора. Но смерть дает право назвать вещи своими именами. Это был выдающийся редактор, настоящий рыцарь издательского дела, безукоризненно владевший формой и содержанием русского языка.

Он в совершенстве знал русскую и иностранную поэзию. Уже упомянутая «Книга о здоровье» вышла со стихотворными заставками разных поэтов. Это было сделано с чувством меры и изящества, свойственным только Ю.В. Махотину.

Было бы непонятным, если бы человек с таким большим литературным даром не пробовал бы себя в сочинительстве. Он действительно писал стихи, но, конечно, в стол. А среди них есть необычные и глубокие. В них нет и тени графомании, они — как бы продолжение профессии работника печатного слова, хотя оригинальность, философская осмысленность, вербальная завершенность, а, по большому счету, искра Божия, несомненно, всегда присутствуют. Приведем одно из них.

#### *Дон Кихот*

*Какой-то старый сумасшедший  
Понапрасну слезы льет  
И никак не понимает —  
Он всю жизнь не понимает, —  
Что Дульсинеи не бывает,  
Дульсинея не придет,  
И ее он не найдет.*

*Не бывает великанов,  
Не бывает колдунов,  
Справедливость не бывает  
Вечной прихотью богов,  
Как Земля — без дураков  
И свобода — без оков.*

*И, покуда все мы живы,  
Жаждем злата и венца.  
Если нет другой поживы —  
Хоть какой-нибудь наживы,  
Или — кружечку винца,  
Иль — достойного конца.*

*Но вновь какой-то сумасшедший  
Понапрасну слезы льет  
И опять не понимает —  
Он всю жизнь не понимает  
И до смерти не поймет,  
Что Дульсинеи не бывает,  
Что Дульсинея не придет,  
И он ее напрасно ждет.*

*Ю.В. Махотин*

Стихотворение датировано 16 августа 1991 г., за 3 дня до распада СССР. Поставил он и часы написания: 18—19. Такой вот он был, Юрий Викторович. Вечная память тебе!

**30 августа — 2 сентября 2007 года** в г. Суздале прошел IV Международный симпозиум «ЕС — Россия: сотрудничество в области биотехнологии, сельского, лесного хозяйства и продуктов питания».

*Организаторы.* Со стороны Российской Федерации: Министерство образования и науки Российской Федерации, Федеральное агентство по науке и инновациям, Российская академия наук, Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Общество биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова, Российский фонд фундаментальных исследований, Российский национальный контактный центр FP7 по направлению «Биотехнология, сельское хозяйство и пища». Со стороны Европейского Союза: Европейская Комиссия по науке: Direktorat научных исследований, Direktorat по биотехнологии, сельскому хозяйству и пище, Direktorat Европейской Комиссии по международному сотрудничеству.

В соответствии с намеченной повесткой дня были обсуждены вопросы организации и перспективы научно-технического сотрудничества России и ЕС по 7-й Рамочной Программе по следующим направлениям: промышленная биотехнология, биотехнология растений, лесное хозяйство и лесопереработка, качество и безопасность пищи.

В рамках симпозиума состоялось 1 пленарное заседание и 6 сессий по следующим темам:

- биотехнология растений и микроорганизмов,
- промышленная биотехнология и биотопливо,
- лесное хозяйство,
- нанотехнологии в пищевой промышленности,
- здоровье животных,
- рыбное хозяйство и аквакультура.

На пленарном заседании были представлены такие концептуальные доклады, как «Биоэкономика, основанная на знаниях» (Кристиан Патерман, руководитель Директората по биотехнологии, сельскому хозяйству и пище Европейской комиссии), «Вклад наук о растениях в концепцию биоэкономики, основанной на знаниях» (Марк ван Монтегю, Гентский университет, президент Европейской федерации биотехнологии) и др.

На I сессии, посвященной биотехнологии растений и микроорганизмов и проходившей под председательством М. ван Монтегю и К.Г. Скрыбина, были заслушаны сообщения известных специалистов в данной области: академика РАСХН И.А. Тихоновича — о значении симбиотических систем растения-микроорганизмы для сельского хозяйства, академика РАН и РАСХН И.Г. Атабекова — о получении суперпродуктов вакцин и терапевтических белков в растениях, группы сотрудников Центра «Биоинженерия» РАН — об их последних исследованиях в сфере агробиотехнологии и др.

На II сессии «Промышленная биотехнология и биотопливо» (председатели — профессор В.О. Попов и Альфредо Агилар-Романилос) были представлены материалы о перспективах крупномасштабного производства в промышленной биотехнологии РФ (А.С. Яненко), о переработке лигноцеллюлозной биомассы (А.П. Сеницын, Кристина Круус). Были затронуты также проблемы развития производства биотоплива в России: с докладами выступили А.Р. Аблаев, Р.Г. Васильев, С.Д. Варфаломеев и Н.В. Орлова.

На III сессии «Лесной сектор» (председатели — академик РАН А.С. Исаев, Вильгельм Ворхер) были обсуждены перспективы исследований по направлению «Лесное хозяйство» в рамках РП 7 (Томас Осзако). От российской стороны выступили Н.В. Лукина, А.С. Исаев, Э.Л. Аким, А.А. Бенин, И.В. Перминова, Н.А. Хуторова, А.С. Алексеев.

На IV сессии «Нанотехнологии в пищевой промышленности» (председатели — Мария Смоландер, И.А. Рогов, В.А. Тутельян, Б.Б. Дзантиев) были заслушаны доклады Доминико де Мартиниса, И.А. Рогова,

А.Н. Филиппова, Квазима Чаудри, В.А. Тутельяна, Ганса Баумистера, Б.Б. Дзантиева, С.Г. Игнатова, Антонио Логрико, Б.А. Шендерова. В них были отражены различные аспекты технологий пищевой промышленности в Седьмой рамочной программе.

На V сессии «Здоровье животных» (председатели — И. Рождественский, Е. Балик, Томас Меттенляйтер) с сообщениями выступили К.Н. Груздев, С.В. Шабунин, А.Н. Кричевский, И.А. Трофимов, И.И. Мушкучело, С.М. Лукин, Д.В. Колбасов, В. Смоленский и др. Были рассмотрены вопросы диагностики, мониторинга, профилактики и лечения заболеваний животных, перспективы развития кормопроизводства в России, использования органических отходов животноводства на базе экологически безопасных технологий и др.

На VI сессии «Рыбное хозяйство и аквакультура» (председатели — А.В. Фомин, О.Я. Мезенова, Г.В. Маслова, Торгер Эдвардсен). Докладчики: Ю.П. Мамонтов, С.В. Немцев и др. Были проанализированы различные аспекты морской биотехнологии, в том числе вопросы комплексной переработки гидробионтов, перспективы развития аквакультуры в России, использование вторичных сырьевых ресурсов в рыбной отрасли и т.д.

Важно отметить, что российская сторона представила на данном симпозиуме материалы для трех платформ РП 7: «Здоровье животных», «Рыбное хозяйство и аквакультура», «Лесной сектор».

## НОВОСТИ МИРА НАУКИ

### Нарушение Тонегавой научной этики

**В 2006 году** в США получил огласку инцидент с лауреатом Нобелевской премии Судзуми Тонегавой в связи с его неэтичным поведением. Дело в том, что известный ученый, занимая должность директора созданного им в 1994 г. Пиковеровского института обучения и памяти при Массачусетском технологическом институте, отказал молодому специалисту-нейробиологу Алле Карповой из России в стажировке в его институте. В электронном письме он мотивировал свой отказ тем, что чувствует дискомфорт в связи с появлением в институте молодого специалиста, область исследования которого пересекается с его собственными научными интересами. Комиссия по расследованию указала на неэтичность поведения Тонегавы. В результате он был вынужден добровольно подать в отставку с поста директора института.

Источник: <http://www.yandex.ru/>

## ПУБЛИКАЦИИ

Watson J. D. *Avoid Boring People: Lessons from a Life in Science*. — New York, Knopf, 2007. — 368 p.

**Резюме.** Новая автобиографическая книга Дж. Уотсона в дополнение к его известной «Двойной спирали» (1968). Если последняя охватывала только два года, предшествующих знаменитому открытию, то новая книга под названием «Избегайте скучных людей: уроки жизни в науке» охватывает почти 80 лет. Книга построена по главам, в конце каждой из которых автор делает выводы об уроках за прошедший период. В ней он освещает события от раннего детства до профессорства в Гарварде. Он обсуждает множество личных, общественных, научных проблем, в том числе значение науки для университетов. Описывает разные события, свидетелем которых был. Так, например, он делится своими впечатлениями об эпопее отставки президента Гарвардского университета Ларри Саммерса и поиска его преемника. Книга богато иллюстрирована (65 фотографий). На титульном листе имеется факсимиле подписи автора.

Amon T., Amon B., Kryvoruchko V., Zollitsch W., Ma. *Biogas production from maize and dairy cattle manure. Influence of biomass composition on the methane yield [An article from: Agriculture, Ecosystems and Environment] [HTML] (Digital)*. — Elsevier, 2007.

**Резюме.** Это — электронная версия в HTML статьи из журнала «Agriculture, Ecosystems and Environment». В ней рассматриваются вопросы производства биогаза из маиса (*Zea mays* L.) и навоза крупного рогатого скота.

*Biogas Plants in Europe: A Practical Handbook (Solar Energy R&D in the Ec Series E / Demuyneck M., Nyns E.J. (Eds.)). — Springer, 2007. — 361 p.*

Галынкин В.А., Заикина Н.А., Коваленко А.Е. *Основы биотехнологии высших грибов*. — М.: Проспект Науки, 2007. — 336 с.

**Аннотация.** Книга содержит современные сведения о макромикетах — грибах, образующих крупные плодовые тела, их строении, размножении и экологии, питательной ценности и лечебных свойствах, способах культивирования полезных видов. В ней даны подробные описания грибов, использующихся как в народной меди-

цине, так и для приготовления лекарственных препаратов и пищевых добавок. Книга адресована не только специалистам-технологам по выращиванию пищевых грибов, но и широкому кругу читателей, а также студентам вузов.

Скурко Е.В. *Генно-инженерные биотехнологии: Вопросы правового и экономического регулирования*. — М.: Ось-89, 2007. — 176 с.

**Резюме.** Книга знакомит читателя с основными характеристиками генно-инженерных биотехнологий, а также с актуальными проблемами, существующими в связи с их правовым регулированием, экономическими и торговыми аспектами.

Никульников В., Кретинин В. *Биотехнология в животноводстве. Учебное пособие*. — М.: Колос, 2007. — 544 с.

**Аннотация.** В книге изложены сведения по основам животноводства (скотоводство, свиноводство, овцеводство, козоводство, птицеводство, кролиководство, звероводство, пчеловодство, рыбоводство). Подробно рассмотрено влияние микроорганизмов на качество пищевых продуктов. Охарактеризованы пищевые отравления, а также инфекционные болезни, передающиеся человеку при употреблении недоброкачественных продуктов. Рассмотрены основы промышленной гигиены и санитарии на предприятиях по переработке сырья и продуктов животного происхождения, а также организация микробиологического контроля при производстве продуктов. Дано понятие о пробиотиках и механизме их действия. Пособие адресовано зооинженерам, технологам, специалистам по производству и переработке животноводческой продукции, студентам сельскохозяйственных вузов.

Жимулев И.Ф. *Общая и молекулярная генетика*. / Ред.: Беляев Е.С., Акифьев А.П. 4-е изд. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. — 479 с.

**Аннотация.** Эта книга — учебное пособие нового поколения, которое отражает современное состояние генетики и уровень ее преподавания. По широте охвата актуальных направлений общей и молекулярной генетики, насыщенности новейшим фактическим материалом оно выгодно отличается от предшествующих ему учебных изданий по генетике. В

пособии подробно изложены современные сведения по биотехнологии, молекулярной генетике и генной инженерии, представлены новейшие данные, полученные с использованием методов генного клонирования, полимеразной цепной реакции, трансформации у эукариот. По-новому освещены вопросы генетики определения пола, генетики индивидуального развития, организации хромосом и внехромосомных ДНК. Рассмотрены современные методики молекулярной генетики. Книга предназначена для студентов, аспирантов и преподавателей университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных вузов.

*Егорова Т.А., Живухина Е.А., Клунова С.М. Основы биотехнологии. 3-е изд. — М.: Академия, 2006 г. — 208 с.*

**Аннотация.** 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. Книга предназначена для студентов высших педагогических учебных заведений, обучающихся по специальности «Биология».

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 сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
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 в формате TIF или JPEG. 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 установления (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.



Подписано к печати 30.09.07  
 Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
 Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
 Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.



## ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

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 55 регионах России и объединяет свыше 2000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основной организационной деятельностью 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.: 8-495-648-09-13*

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