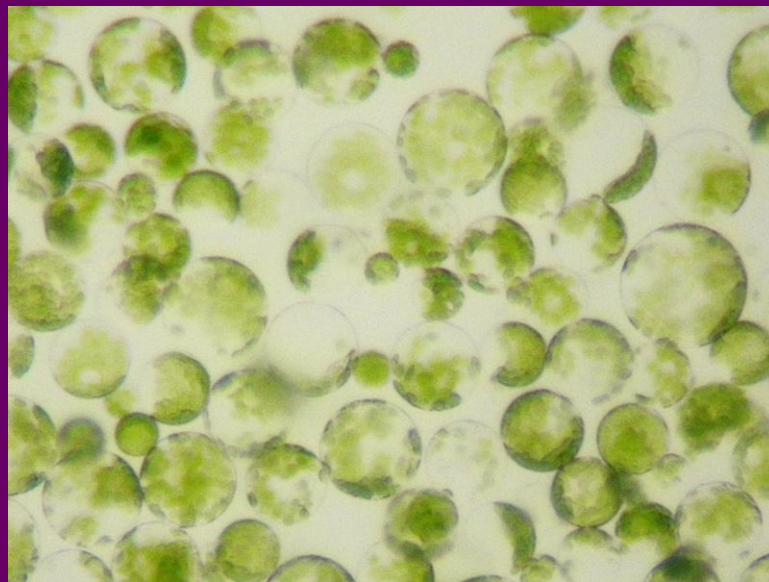


Тақырып

Клеткалық инженерия



Жоспар:

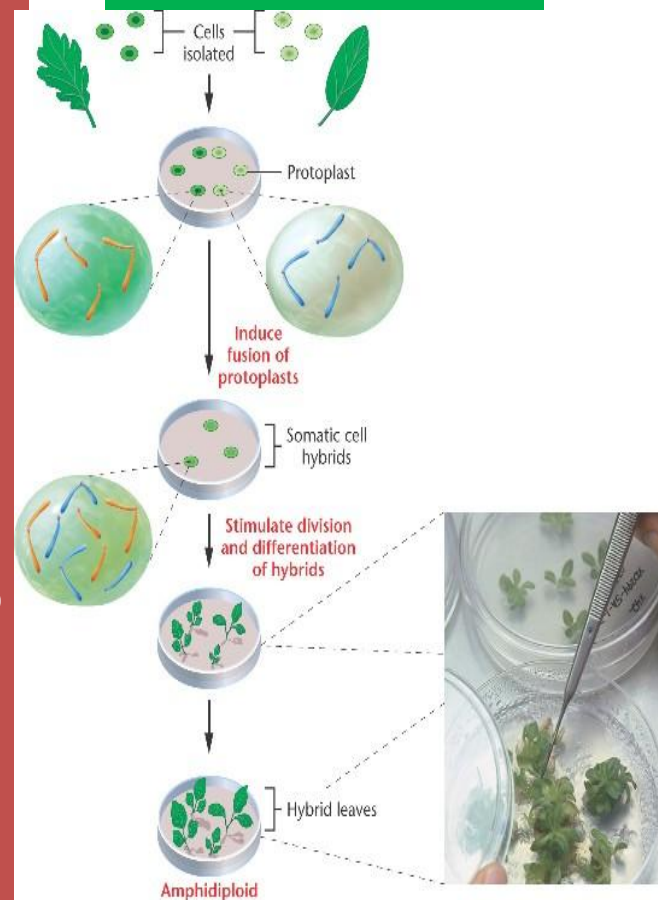
1. Оқшаулап алынған протопласттарды қолдану
2. Протопласттарды қолданудың теориялық және практикалық аясы
3. Протопласттарды бөліп алу
4. Тіршілікке қабілетті протопласттарды алу
5. Протопласттарды өсіру әдістері
6. Протопласттарды құйылыстыру (парасексуалды будандастыру)
7. Парасексуалды будандастыру мүмкіндіктері



Клеткалық инженерия –

клеткаларды *in vitro* жағдайында өсіру, оларды будандастыру және қайта құрастыру арқылы клетканың мүлдем жаңа типін жасау әдістерінің негізінде қалыптасқан биотехнологияның саласы.

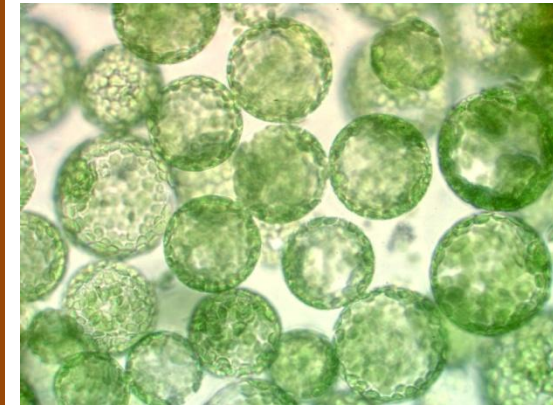
➤ Клетканың қайта құрастыру (реконструкция) – клетканың құрамына кіретін ядроны, цитоплазманы, митохондрияларды, хлоропластарды, хромосомаларды бір клеткадан басқа клеткаға көшіру негізінде мүлдем жаңа клетканы жасау.



Протопласт – целлюлозалық қабықтан айырылған, цитоплазмалық мембранамен қапталған клетка, ол өсімдік клеткасына тән барлық қасиеттерге ие



Протопласттар - өсімдіктердің іргелі физиологиялық проблемаларын зерттеуге қолданылатын бірегей модель болып табылады.



Оқшаулап алынған протопласттарды қолдану

Протопласттарды қолданып, физиологиялық зерттеулерді жүргізудің негізгі бағыттары қандай?

1. Клетка қабығын спецификалық ферменттермен бұзу арқылы клетка қабығының құрылымы мен қасиеттерін зерттеу;

2. Клетка қабығының репарациясы мен өсуін зерттеу;

3. Клетка аралық байланыстардан айырылған протопласттардың метаболизмін, өсуі мен дифференциациясын модельдеу;

4. Төмен молекулалы заттардың, бөлшектер мен органеллалардың плазмолемма арқылы тасымалдау механизмін зерттеу;

5. Гормондар мен патогендердің плазмолемма мен протопластқа тигізетін әсерін зерттеу;

6. Плазмолемманың ұйымдастырылуын мен қызметін зерттеу.

Протопласттарды қолданудың теориялық және практикалық аясы

- 1. Клетка қабықшасының химиялық құрамы мен құрылымын зерттеу (сондай-ақ, бұзылуы мен синтезделу кезінде « de novo »).
- 2. Плазмалеммалардың қасиетін, трансмембраналық орын ауыстыру механизмдерін зерттеу.
- 3. Органеллаларды «жұмсақ жолмен» бөліп алу.

- 4. Протопласттар құйылысуы кезінде клеткалардың дифференциалдану заңдылығын, бұдан клеткасын алуда ядро мен цитоплазманың өзара әрекеттесуін бақылау, сомалық будандарды зерттеу.
- 5. Бөтен органеллаларды ендіру.
- 6. Бөтен гендерді өсімдік клеткасына ендіру (трансгенез).

Протопласттарды бөліп алу



Механикалық әдіс

Протопласттарды механикалық жолмен алғаш рет 1892 ж. Дж. Клеркер бөліп алған.

Бұл әдіс плазмолизденген клеткалардың клетка қабығын кесіп, протопластарды сыртқа шығаруға негізделген.



Энзимологиялық әдіс

1952 жылы Салтон лизоцим ферментімен бактерияның клетка қабығын бұзған.

1960 жылы Коккинг томаттың тамыр ұштарын зең саңырау-құлақтары (*Myrothecium verrucaria*) өсірілген культуралық сұйықтықтан алынған гидролиздік ферментпен өңдеп, алғаш рет протопласттарды оқшаулап алған.

Протопласттарды бөліп алу әдістерінің өзара ерекшеліктері



Механикалық әдіс

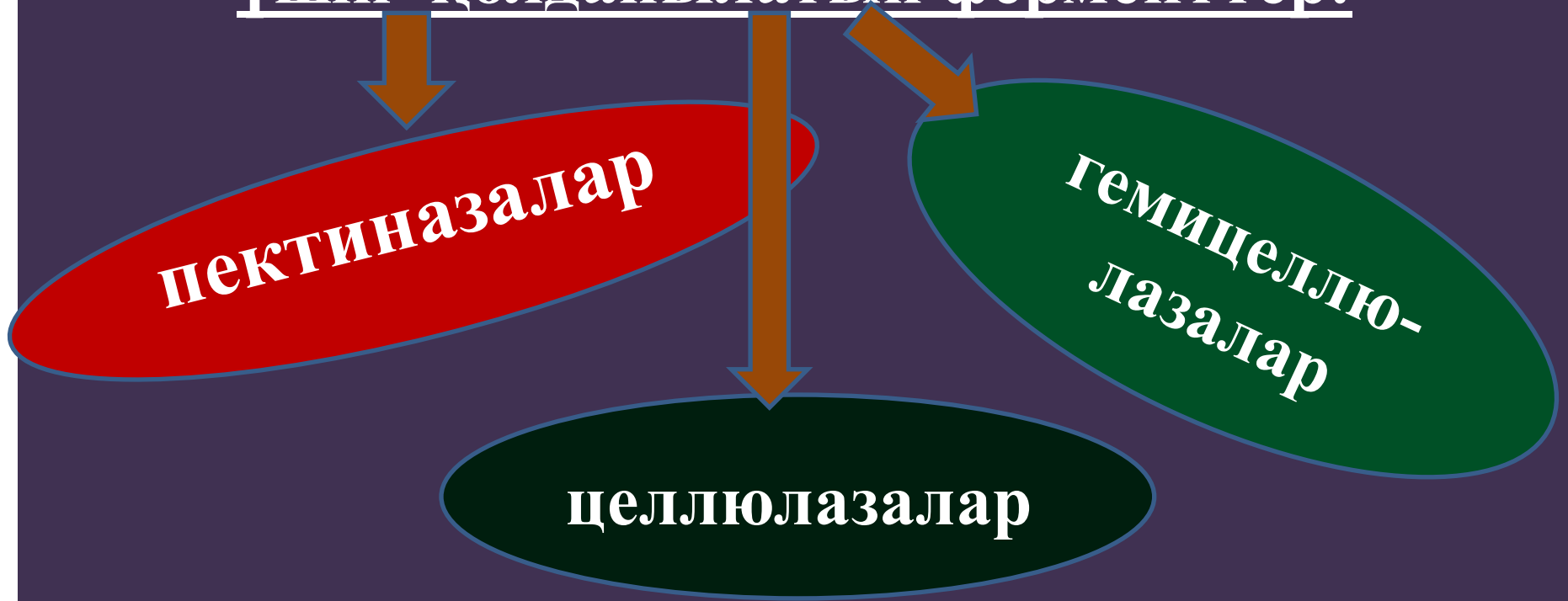
- өнімділігі төмен,
- ұлпаларды тек экстенсивті плазмолизде ғана қолдануға болады,
- қиын әрі ұзақ



Энзимологиялық әдіс

- протопласттарды көп мөлшерде бөліп алуға болады (1 грамм ұлпа немесе клеткалардан 10 млн.),
- клеткалар осмотық стреске шалдықпайды,
 - клеткалар зақымданбайды,
 - тез орындалады

Клетканы қабығынан ажырату
үшін қолданылатын ферменттер:



- Ферменттердің комбинациялары мен өзара қатынасы әр клетканың түріне қарай таңдалады.

Клетка қабығын ыдырататын ферменттер

Фермент аты	Өндіруші
Целлюлаза	R-10, Жапон, және т.б. фирмалар
Целлюлизин	Calbiochem USA
Дрейселаза	Kyoto Hakko, Japan
Гемицеллюлаза	Sigma, UK
Мейселаза	Tokio, Japan
Мацерозим	R-10, Japan
Пектолиаза	R-10, Japan
Розим	Rohm a. Haas, USA
Рогамент	Rohm, Darmstadt
Ксилоназа	Russia

Протопласттарды бөліп алу

3 сатылы жүзеге асады:

1

- ферменттермен өңдеу

2

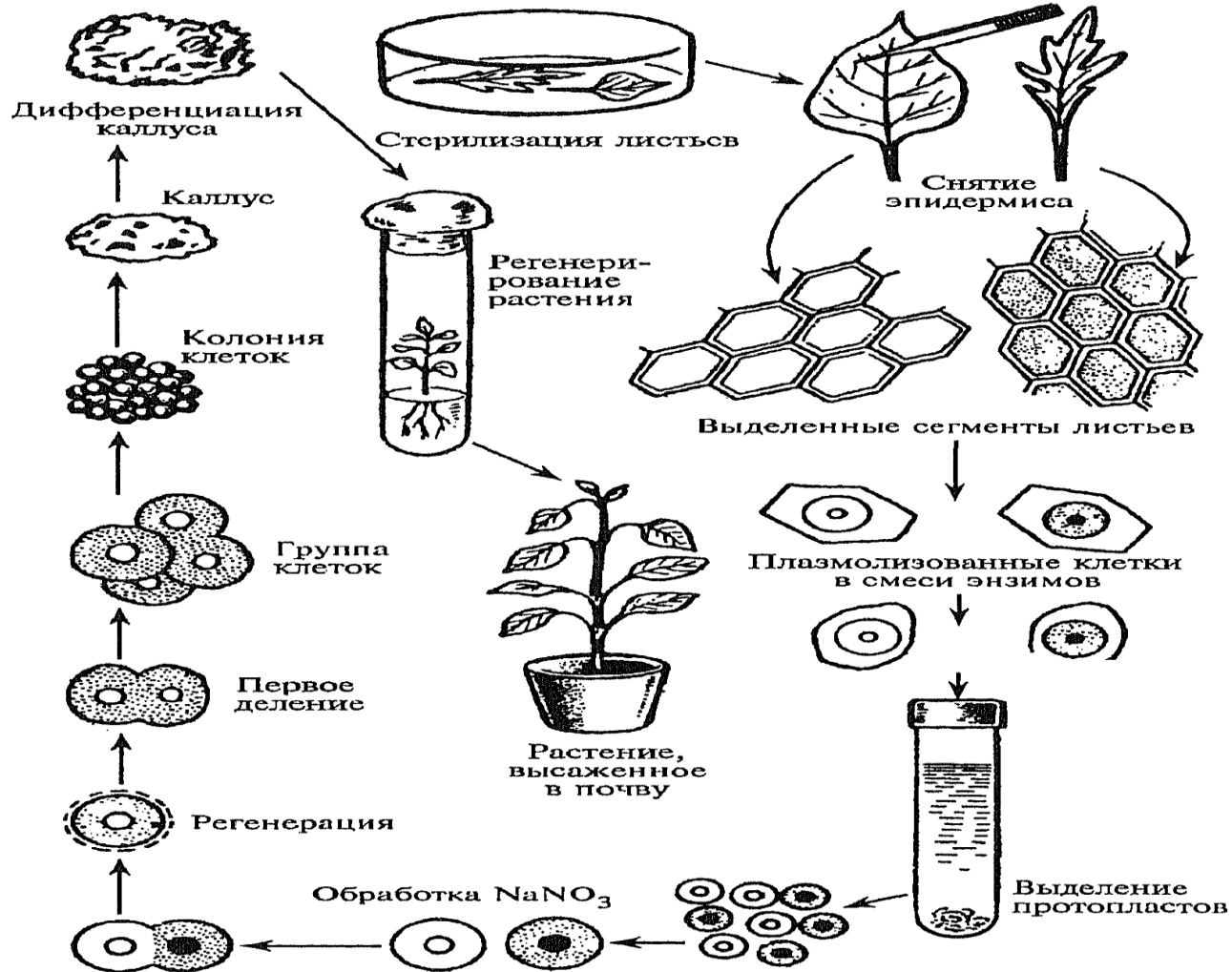
- протопласттарды клеткалық қабықтардан бөліп алу

3

- интактты протопласттарды клеткалық қалдықтардан (сынықтардан) тазарту



Протопласттарды алу



Жапырақ клеткаларынан протопласттарды оқшаулап алу, өсіру және өзара құйылыстыру нәтижесінде сомалық будандарды алу процесі



Картоп протопластарын бөліп алу , өсіру және регенерация

Nicotiana tabacum жапырақтарынан протопласттарды (Такебе әдісі) бөліп арудың стандартты әдістемесі:



➤ Клетканың су алмасу процесінің реттелуі клетка қабығымен тығыз байланысты.

➤ Протопласт жалаңаштанғанда су алмасуды бақылайтын бір компонент жойылады, сондықтан протопласттарды бөліп алатын орта мен өсіру орталарының осмостық қысымы маңызды роль атқарады.

➤ Бөліп алынатын орта аздап гипертоникалық болуы керек, бұл ортада протопласттар аздап плазмолизденген күйде болады. Бұл жағдайдар клетканың метаболизмін тежейді және клетка қабығының регенерациясын тежейді.

Қолданылатын осмотық стабилизаторлар

➤ қанттар:

- ✓ глюкоза,
- ✓ маннит,
- ✓ сорбит,
- ✓ ксилоза

➤ иондық осмотиктер (0,3 - 0,8 моль/литр):

- ✓ CaCl_2 ,
- ✓ KCl ,
- ✓ Na_2HPO_4

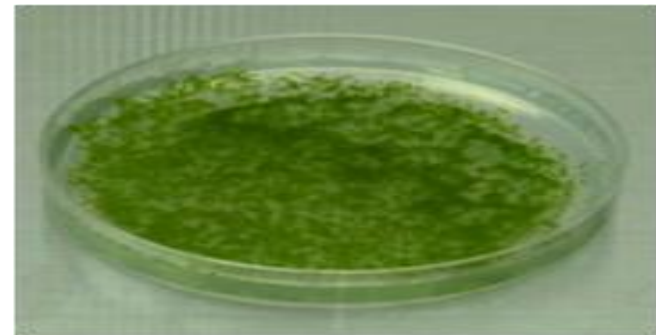
Әр бір ерітіндінің концентрациясын өсімдік объектісіне қарай таңдайды.

➤ Ұлпаларды ферменттармен өңдеу Петри табақшаларында жүргізіледі, бұл жағдайларда Петри табақшасын 15° С бұрышта ұстайды

Ферменттерден
протопласттарды бөлу

центрифугалау

флотация




Центрифугалау әдісі

Фильтрациялау -
сұйық қоспаны 40 мкм фильтрден өткізеді.
(Фильтрде клетка қалдықтары қалып қояды)



қоспаны центрифугалау
(протопласттар тұнбаға түседі, ал клетка сынықтары
супернатантта қалады)



екінші рет центрифугалау
(ферменттен протопласттар жуылады)



протопласттарды қоректік ортаға отырғызу

Флотация

Флотация әдісін О. Гамбург және оның әріптестері 1981 жылы ұсынған.

Бұл әдіс әлсіреген протопласттарға арналған.

Яғни, протопласттардың тығыздығы органеллалар мен клетка қалдықтарының тығыздықтарына қарағанда төмен болады.

Сондықтан протопластар бар қоспаға сахароза (манит, сорбит) қосып 40 – 80 - 350 g

центрифугалайды. Бұл жағдайда таза пртопласттар қалқып ерітіндінің бетіне шықса, ал клетка қалдықтары тұнбаға түседі.

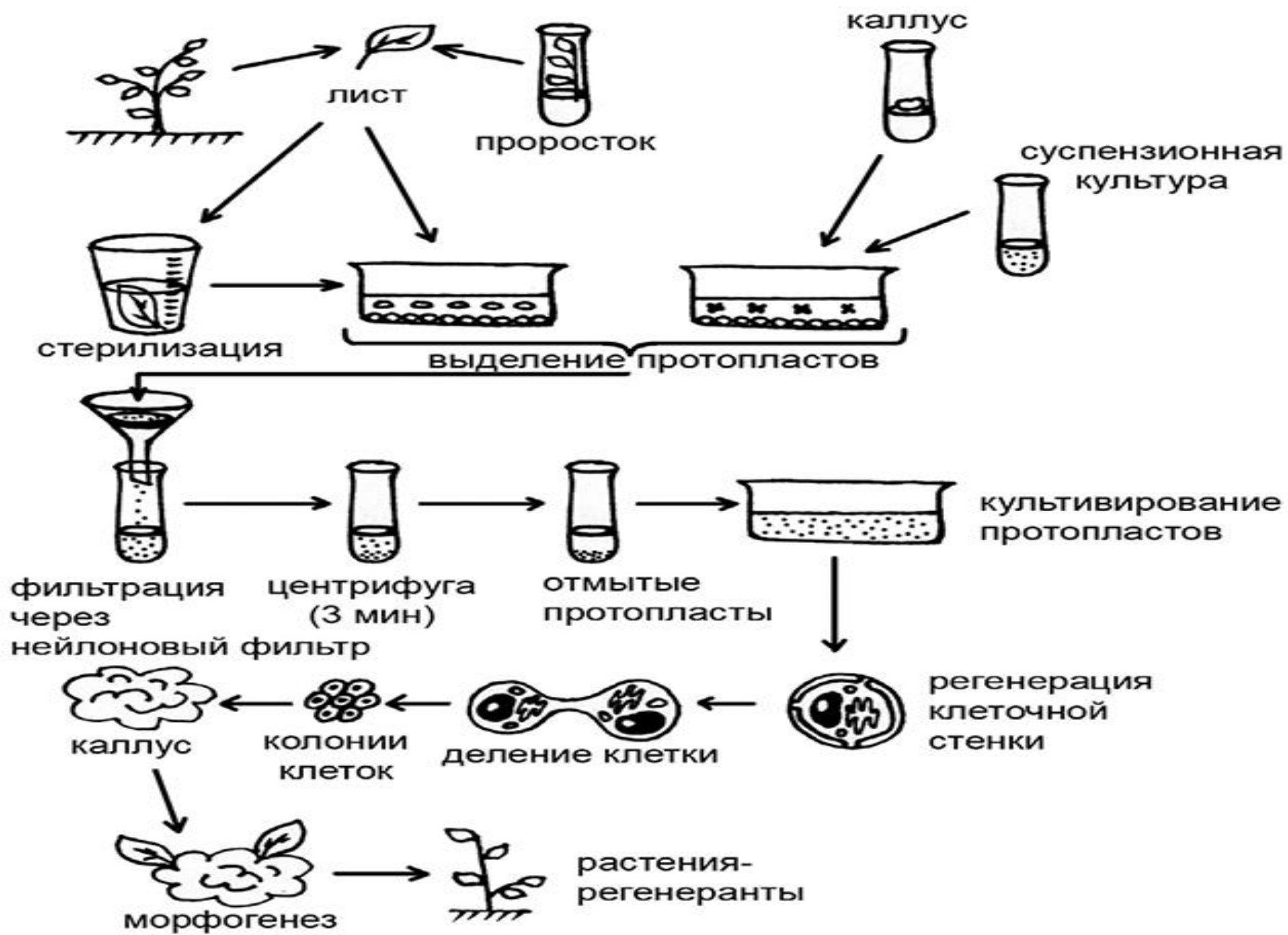
➤ Протопласттарды суспензиалық және клеткалық культуралардан да бөліп алуға болады.

➤ Протопласттарды бөліп алу клеткалардың логарифмдік өсу фазасының аяғында оптималды болады, себебі клетка қабықтары оңай бұзылады әрі протопласттар өміршеңдігі жоғары болады.

➤ Осыдан кейін протопласттарды клеткаларды өсіретін жағдайларда өсіреді.

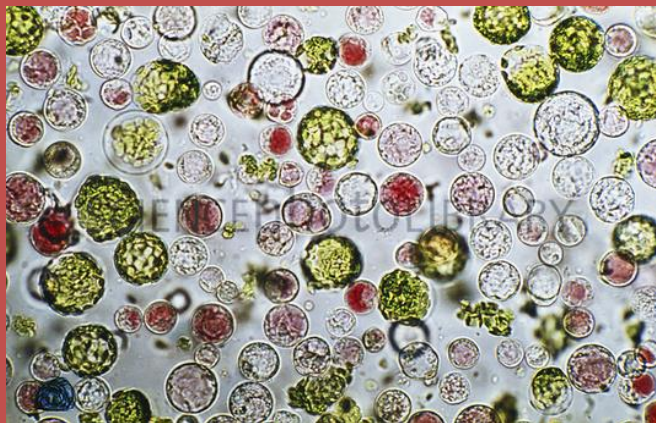
➤ Қоректік орта құрамына: осмостық стабилизаторды, бейорганикалық тұздарды, көміртек көздері, азот, витаминдер, фитогормондарды, протекторлар (декстран, 0,5 % калий сульфаты) қосады.

➤ Орта: рН 5,4 - 5,8; температура 22 - 28° С, жарық 2000 лк аспауы тиіс.



Тіршілікке қабілетті протопласттарды алу

Протопласттарды флуоресцеиндиацетатпен (ФДА) бояу



ФДА флуоресценциясы жоқ қосылыс, протопластар мембранасы арқылы жеңіл өтеді, тірі протопласттың ішінде ыдырайды

Флуоресцеин (протопласттардың бүтін мембраналар ұстап қалады)

Флуоресцеин + УК сәуле = жасыл сәлені тартады (жасыл түске боялады)

➤ Протопласттар суспензиясының сапасы тіршілікке икемді протопласттардың санымен белгіленеді.

Протопласттардың саны Фукс-Розенталь камерасында есептеледі.

➤ Протопласттардың тығыздығы суспензияның маңызды сипаттамасы, ең жақсы суспензияның 1 мл-де 10^5 - 10^6 протопласт болу қажет.



Протопласттардың бөлініп алынған мөлшері мен олардың өміршеңдігі:

- Өсімдік түріне;
- Өсімдік жасына;
- Өсімдіктің физиологиялық күйіне (генетикалық және эпигенетикалық ерекшеліктеріне тәуелді)

Протопласттарды өсіру әдістері



Тамшыларда
өсіру әдісі

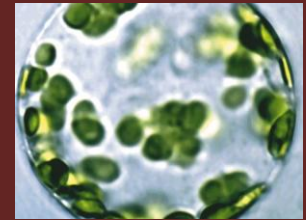


Платирование
(бекіту) әдісі

1. Тамшыларда өсіру. Протопластарды пластикалық Петри табақшаларында 1 мкл микротамшыларда өсіреді (Ю. Глеба 1978 ж ұсынған).

2. Платирование (бекіту) әдісі. Протопластар суспензиясын Петри табақшаларын құйып, оның үстіне бірдей көлемде 1% агар қосылған қоректік орта (45°C) қосады.

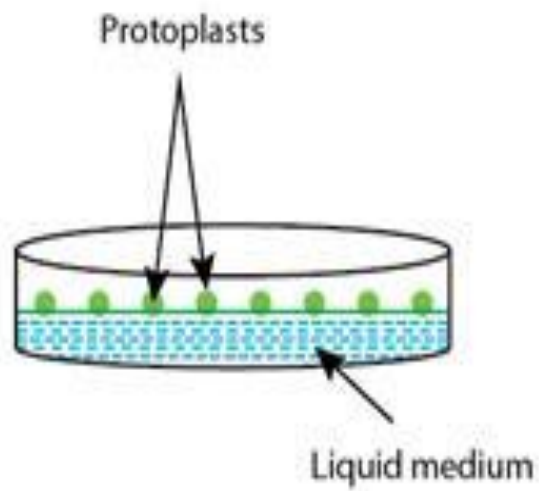
➤ Қоректік орта қатқаннан кейін Петри табақшаларын аударады.



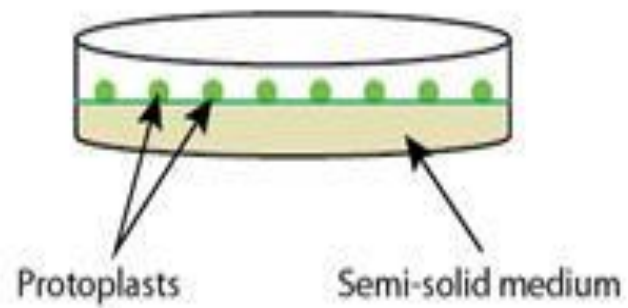
➤ Протопластарды өсіру 28°C –та жүргізеді. Бұл жағдайда протопластар бір-бірінен физикалық оқшауланған жағдайда және бекітілген күйде өседі. Бұл интактты протопластың дамуын (клетка қабығының қалыптасуы, бөлінуі, өсуі мен дамуы) бақылауға мүмкіндік береді.

➤ Кей жағдайларда протопласттарды өсірудің екінші технологиясында бағушы протопласттар мен клеткаларды қолданады. Бағушы протопласттар мен клеткалардың бөлінуін тежеу мақсатында оларды алдын ала рентген немесе γ -сәулемен сәулелендіреді.

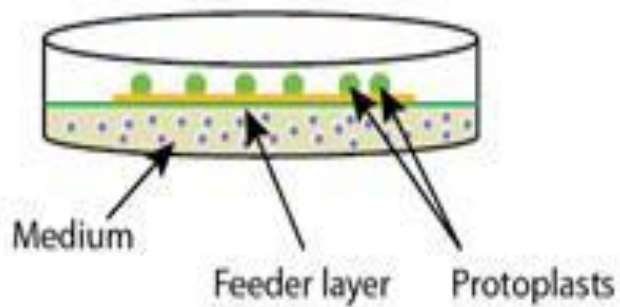
➤ Бағушы протопласттар мен клеткаларды өміршен протопласттармен араластырып өсіргенде, алдыңғылар соңғылардың өсуіне қолайлы жағдай тудырады.



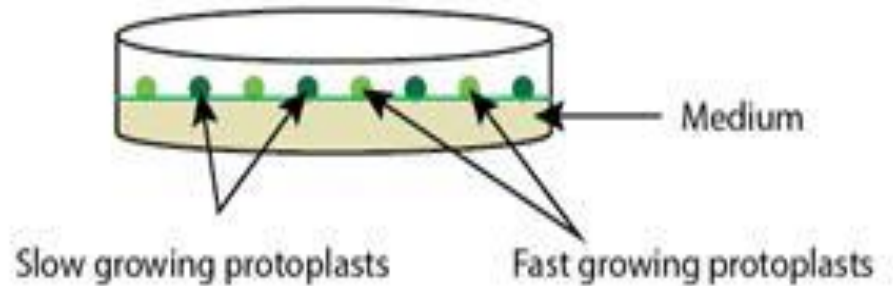
(i). Protoplasts culture in liquid medium



(ii). Protoplasts culture in solid medium



(iii). Protoplasts culture with feeder layer

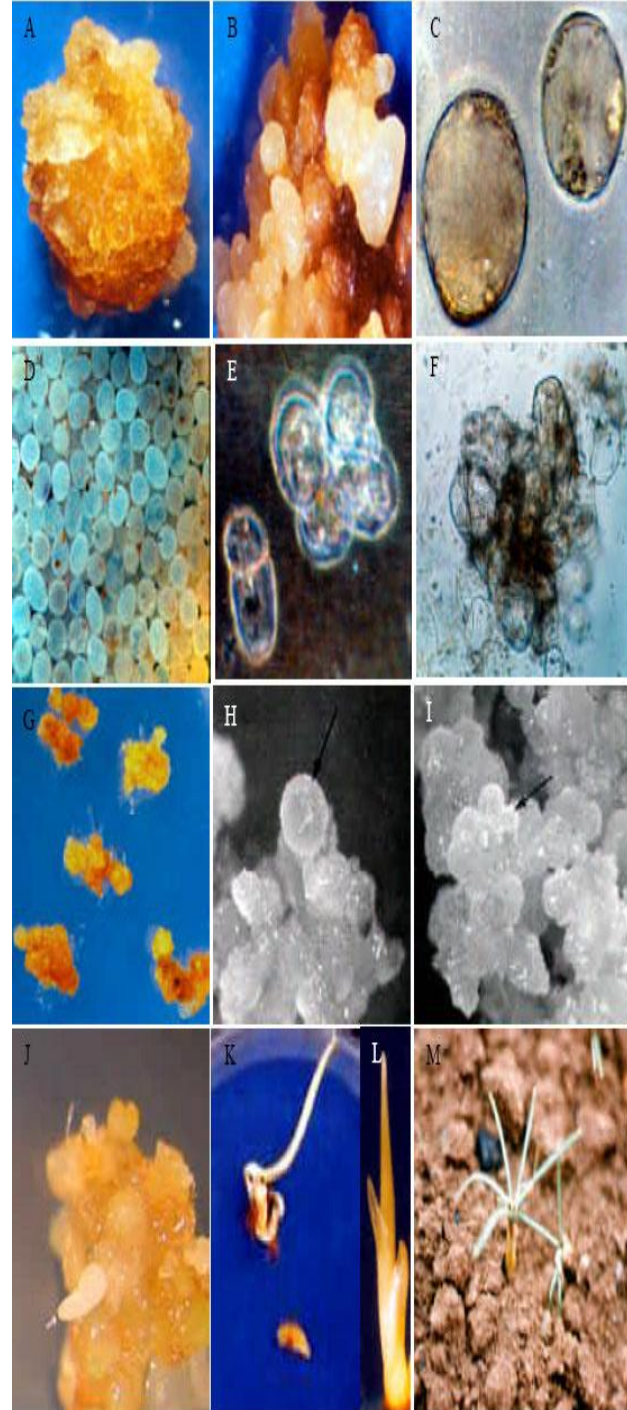


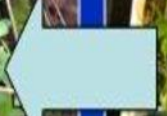
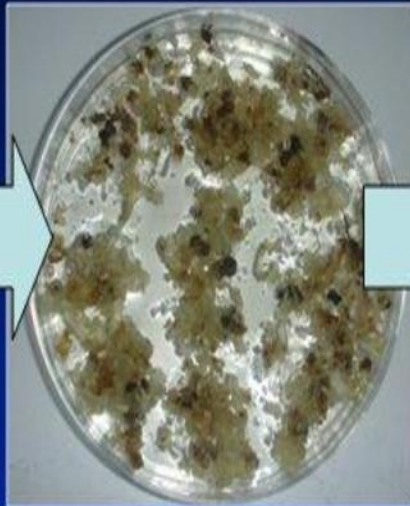
(iv). Co-culture of slow and fast growing protoplasts

➤ Протопласттарды ферменттік ерітіндіден жуып тазартқаннан кейін, бірден клетка қабығының қалыптасуы жүзеге асады.

➤ Ал клеткалардың бөлініп-өсуі мен олардан регенеранттар өсіріп алу бірқатар қиындықтар тудырады.

➤ Өсімдіктердің регенерациясы эмбриогенез немесе каллустың түзілуі мен ондағы морфогенездің жүруі арқылы жүзеге асады. Ол үшін қоректік ортаға ауксиндер мен цитокининдер қосады.





өсімдіктен алынған
ұлпаның түрі мен
спецификалық күйі

протопласттарды бөліп
алу әдісі

Протопласттардан қалыптасқан клеткалардың
пролиферациясына әсер ететін факторлар

қоректік орта
құрамы

протопласттарды қоректік
ортаға отырғызу жиілігі
(ТЫҒЫЗДЫҒЫ)

Протопласттарды құйылыстыру (парасексуалды бұдандастыру)

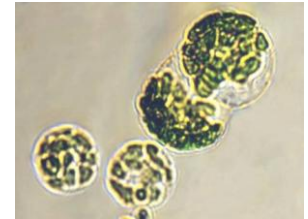
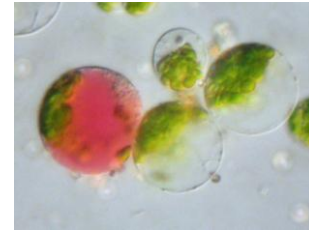
- Клетка қабығы қалыптаспаған жалаңаш протопласттарды өзара құйылыса алады. Протопласттардың құйылысуы – парасексуалды немесе сомалық бұдандастыру әдісі деп аталды.
- Парасексуалды бұдандастыруда өсімдіктің диплоидты клеткалары өзара құйылысады.
- Протопласттар құйылысқанда алдымен олар бір-біріне тоғысып жабысады, оны агглютинация деп атайды. Осыдан кейін олардың мембраналары да қосылып, екі протопластан үлкен протопласт пайда болады.

➤ Протопласттардың құйылысуы кездейсоқ жүзеге асуы мүмкін. Ол жас ұлпалардан немесе суспензиялық культуралардан алынған протопласттарда жүреді.

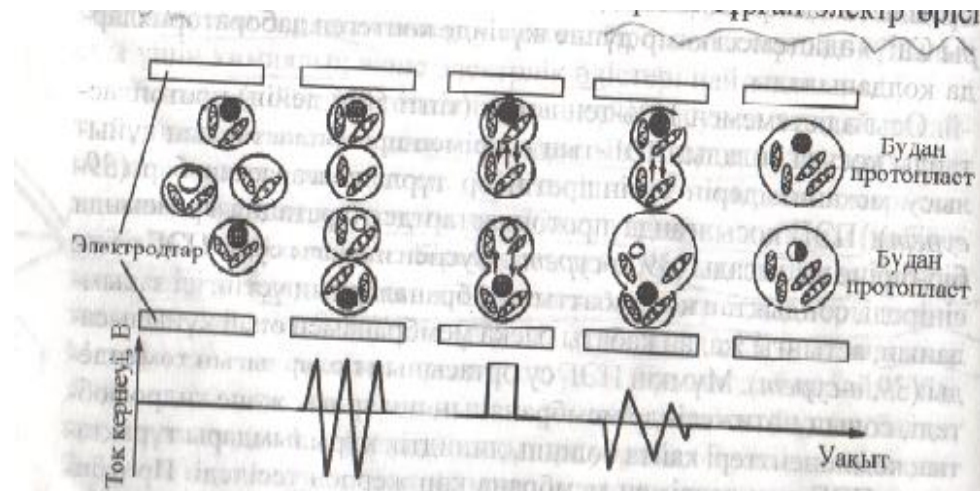
➤ Протопласттардың құйылысуын арнайы әдістермен жүзеге асыруға болады.

Прото-
пласттар-
дың
құйылыс-
тыру

Химиялық әдіс



Электрлік әдіс



- Химиялық әдіс протопласттардың құйылысуына жағдай жасайтын, плазмолемманың электрлік зарядын өзгертетін заттарды суспензияға қосуға негізделген.
- Фюзоген (протопласттардың құйылысуына жағдай жасайтын зат) – ПЭГ (полиэтиленгликоль).
- ПЭГ- суда жақсы еритін полимер, суспензияның осмотық қысымын көтереді.

Химиялық әдістің кемшіліктері

- ПЭГ -пен өңдеу нәтижесінде протопласттардың көбі зақымданып құриды.
- Екі протопластан да көп протопласттар қосылса, тіршілікке икемсіз будан протопласттар түзіледі.

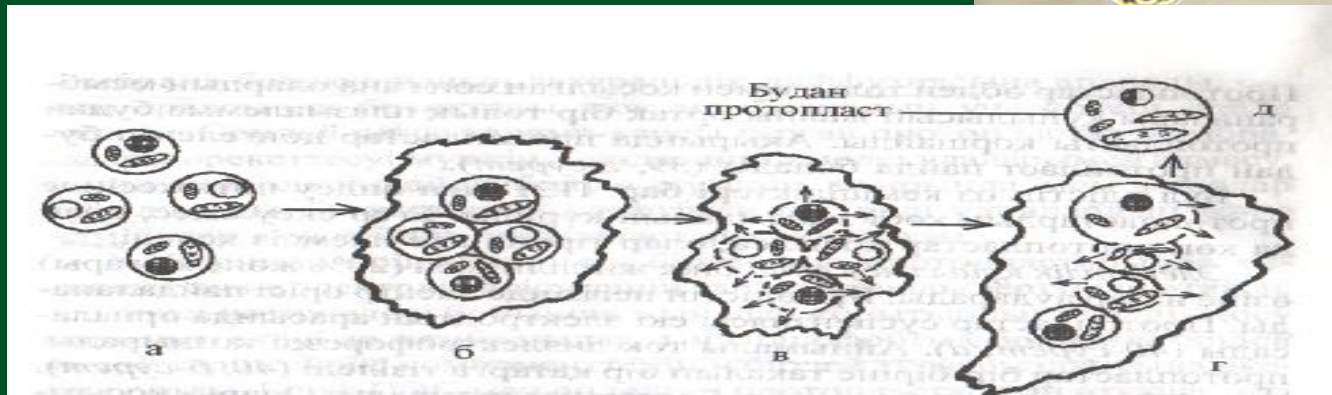
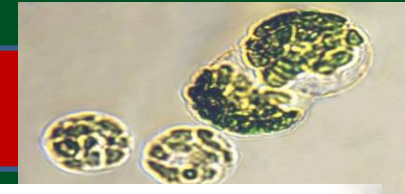
Протопласттардың өзара құйылысуы

Протопласттар суспензиясын 20-30 % ПЭГ ерітіндісімен өңдеу

15 минуттан кейін 100-300 мМ Ca^{2+} бар сілті (рН 9-11) ерітіндісімен ПЭГ -ті суспензиядан шаю

Протопласттар өзара бір-бірімен тоғысқан мембраналар арқылы құйылысады

Будан протопласт



Электрлік құйылысу – электр өрісін пайдалануға негізделген (Г. Циммерман әріптестерімен 1981 ж. ұсынған)

- Протопласттар суспензиясы екі электродтың арасында орналасады.
- Айнымалы ток диэлектрфорезді қоздырады, протопласттар бір-біріне тақалып бір қатарға тізіледі. Бұл тізбектер тек электр өрісі болған кезде тұрады.
- Оларға қосымша қатты электр импульсын (600 В/см, 10-20 мкс) бергенде, қатты қосылып тұрған плазмалық мембраналарда тесіктер пайда болып, протопласттар бір-біріне құйылып кетеді.
- Басылып бара жатқан айнымалы электр сигналы цитоплазмалар араласып жатқанда, протопласттарды біріктіріп ұстап тұрады.
- Электр тоғын өшірген соң қосылған протопласттар дөңгеленеді.

Парасексуалды будандастыру мүмкіндіктері:

- Өсімдіктердің (организмдердің) филогенетикалық алыс түрлерін будандастыру;
- Ассиметриялық будандарды алу;
- Үш немесе одан да көп клеткаларды будандастыру;
- Ата-аналық генотиптер жиынтығына ие будандарды алу;
- Мутацияны гетерозиготалы күйге көшіру арқылы протопласттарды құйылыстырып өміршең формаларды алу;
- Гетерозиготалы өсімдіктерді алу т.б

➤ **Парасексуалды будандастыру ядролық және ядродан тыс геномдарды талдауға және зерттеуде маңызы зор.**

➤ **Цитоплазмалық геном бірқатар белгілерді – фотосинтездің жылдамдығын, патогендерге, абиотикалық факторларға төзімділікті т.б. кодтайды.**

PAXMIET!!!