

БІОІНЖЕНЕРНІ МЕТОДИ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ

Ситнік О.І.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Методика кріоконсервації, уповільнення росту

При одержанні клітинних ліній з корисними ознаками, постає проблема збереження цих ознак. Рослини можуть зберігати генетичну інформацію в насінні, проте це джерело не цілком надійне, адже з часом через мутації схожість насіння падає. Крім того, деякі рослини розмножуються тільки вегетативно. Цим обумовлена необхідність збереження частини матеріалу *in vitro*. З іншого боку, в деяких випадках вдається одержати нові клітинні лінії, які синтезують більшу кількість вторинних метаболітів, тобто більш продуктивні, які так само потребують збереження.

Для дослідження фізіологічних і біохімічних процесів, що протікають в тканинах, також потрібні стандартні вихідні культури, чим викликана необхідність зберігати матеріал протягом певного проміжку часу, коли йдуть серійні експерименти. Все це робить проблему збереження генофонду вельми актуальною. Проте, найбільш гостро ця проблема стоїть на тлі катастрофічного скорочення та збіднення біорізноманіття, що спостерігається зараз у багатьох наземних та водних екосистемах. Збереження біоматеріалу багатьох рідкісних і зникаючих видів тварин і рослин, у вигляді банків насіння, ембріонів, гамет, зигот, клітинних і тканинних культур, банків ДНК і клонотек, зокрема, з застосуванням методів кріоконсервації, на сьогодні вкрай необхідне для потенційного відтворення видів, повністю зниклих у природних умовах.

Можна, звичайно, пасувати і перевивати клітинні культури. Однак, при цьому виникає небезпека соматоклональної мінливості, накопичення мутацій («генетичний вантаж»), контамінацій (зараження чужорідним генетичним матеріалом, напр., вірусами і пріонами). Це також вимагає певних фінансових і трудових витрат (необхідність частих пересадок, витрати, пов'язані з поживним середовищем і т.д.). Мета дослідників полягає в збільшенні інтервалу між пересадками.

Існують різні підходи до збереження культур:

- Кріозбереження,
- Уповільнення росту,
- Сушка (розпилююча і ліофільна) - для клітин мікроорганізмів.

Кріозбереження

Кріозбереження/кріоконсервація - це заморожування біоматеріалу при наднизьких температурах. Зазвичай його проводять в рідкому азоті, при температурі - 196° С.

Успіх низькотемпературної консервації залежить від ряду чинників:

- Вид і тип клітин,
- Їх концентрація в суспензії,
- Склад середовища для консервування,
- Вид і концентрація кріопротекторів,
- Режим охолодження і відігрівання,

- Спосіб реабілітації клітин після відігрівання.

Істотною роллю в успішному заморожуванні клітин відіграє їх морфологічний стан: клітини, що знаходяться в стаціонарній фазі росту, менш стійкі до шкідливого впливу низькотемпературної консервації, ніж клітини, що знаходяться в експоненційній фазі росту. Клітини для заморожування відбирають в середині експоненційної фази ростової кривої.

Важливе значення має і щільність суспензії, що заморожується. Оптимальні результати по відновленню клітин були отримані при заморожуванні клітинної суспензії щільністю $1 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл.

Для рослинних клітин часто потрібне попереднє культивування в особливих умовах.

До середовища додають різні речовини, наприклад:

- 2-6% маніт або сорбіт для зменшення розміру вакуолей;
- амінокислоти, в першу чергу пролін, який слугує для зв'язування води в клітині (концентрація до 1 моля або 11,5%), аспарагін, γ -аміномасляна кислота;
- *диметилсульфоксид (ДМСО)*, який додають до середовища для передкультивування в концентрації від 2,5 до 10% на 48 годин для збільшення проникності плазматичної мембрани;

- крім того, застосовують штучне загартовування до холоду, коли знижують температуру культивування, імітуючи природний осінній процес підготовки до періоду зимового спокою (застосовується лише для рослин помірного клімату). Клітинні культури витримують кілька діб при температурі $+8 - +10^\circ \text{C}$, а потім при $+2 - +5^\circ \text{C}$ протягом 1 - 6 тижнів.

Процес заморожування рослинних клітин від тваринних відрізняє, в основному, наявність етапу попереднього культивування.

Кріопротектори - речовини, що дозволяють понизити шкідливу дію фізико-хімічних факторів при кріоконсервуванні. До них відносяться сахароза, декстран, етиленгліколь, полівінілпіролідон, *диметилсульфоксид (ДМСО)*, гліцерин. Для визначення токсичності кріопротектора, клітини витримують при кімнатній температурі за різних його концентрацій протягом 30 - 50 хвилин, після чого визначають їх життєздатність. Додатково оцінюють його протективні властивості шляхом пробного заморожування і відтавання культур. *Найбільш часто в якості кріопротекторів використовують гліцерин і ДМСО.* Перед додаванням кріопротектора, суспензію клітин концентрують шляхом центрифугування, надосадову рідину зливають. Кріопротектори вносять в культуру за годину до заморожування, що призводить до зміни проникності мембрани, зміни точки замерзання і відтавання.

Програми охолодження можуть бути різними, але для всіх них характерна повільна швидкість охолодження. При заморожуванні відбувається утворення льоду всередині і зовні клітин. Характер цих змін залежить від досліджуваного зразка і обробки кріопротекторами, але головним чином, від швидкості охолодження.

При повільному охолодженні відбувається утворення позаклітинного льоду, що призводить до зневоднення клітини до того, як буде досягнута точка замерзання цитоплазми.

При швидкому охолодженні клітини швидше заморожуються зсередини, повільніше зневоднюються, що призводить до утворення кристалів льоду всередині клітини. У цьому випадку клітини пошкоджуються. Зазвичай охолодження проводять в два етапи.

Заморожування клітин: а) швидке, б) повільне, поетапне

1-й етап: від +20 до -28 °C зі швидкістю 1 градус за хвилину (для рослинних клітин швидкість заморожування 0,5 градуса за хвилину до -35° C), витримують при цій температурі 15 хвилин.

2-й етап: занурення у рідкий азот (миттєве охолодження до -196 °C).

Заморожування проводять у спеціальних апаратах. При їх відсутності - на спиртовій бані (0,5 - 1 літр спирту наливають у термос з металеву колбою, занурюють в нього ампули на 15 хвилин і додають при помішуванні рідкий азот або сухий лід; доводять температуру до -32° C (температура повинна бути не вище -28 і не нижче -32° C). Далі переносять ампули в рідкий азот.

При розморожуванні ампули пінцетом переносять у водяну баню з температурою +37 - +40° C, ампула об'ємом в 1 мл розморожується протягом 0,5 - 1 хвилини.

Після розморожування клітини відмивають або в ростовому середовищі (тварини), або в підтримуючому середовищі. Рослинні клітини також можна відмивати 3 - 10% розчином сахарози.

Далі клітини перевіряють на життєздатність за допомогою вітальних барвників, що забарвлюють мертві клітини. Остаточним критерієм служить чітке відновлення зростання на стандартних поживних середовищах, що використовуються для даної культури.

Перевиваємі культури тваринних клітин після розморожування мають підвищену чутливість до вірусів, яка виявляється протягом перших двох пасажів. Далі чутливість, як правило, повертається до початкової.

Способи уповільнення росту

Уповільнення зростання можна добитися наступними методами:

1. Зберігання під шаром мінерального масла (для бактеріальних і грибних культур).

2. Зміна газового складу і атмосферного тиску всередині культуральної ємності.

3. Зміна світлового режиму.

4. Охолодження до температури припинення активного росту.

5. Застосування гормональних і осмотичних інгібіторів. З гормональних інгібіторів найбільш часто використовують хлорхолінхлорид (для рослинних клітин), з осмотичних - маніт в концентрації 3-6%.

6. Заміна CaCl₂ на Ca(NO₃)₂ в поживних середовищах.

Для таких культур, як картопля, в якості способу, що дозволяє зберегти генофонд, рекомендується клубнеутворення у пробірках.