**Лабораторная работа №3 (2 часа)**

**Тема: Строение микробной клетки**

**Цель работы:** изучить прокариотическую бактериальную клетку и эукарио

 тическую животную клетку.

 **Материалы и оборудование:** Микроскоп, схемы эукариотических и прокариотических клеток.

**Т****еоретическое обоснование работы**

*Прокариоты и эукариоты*

Все живые организмы делятся на две основные группы: прокариоты и эукариоты. В основе этой классификации лежат многочисленные структурные различия, из них наиболее основными являются:

1) наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;

2) строение и химический состав клеточной стенки;

3) наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

 В прокариотической клетке, например бактериальной, хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой, в состав которой часто входит пептидогликан, но не хитин или целлюлоза; в клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре; клеточная стенка, если она есть, может содержать хитин или целлюлозу, но не пептидогликан; в цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы (митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласт в клетках растений) (рис. 3).

Рис. 3. Схематическое представление прокариотической бактериальной клетки (А) и эукариотической животной клетки (Б).

Морфология бактерий. Бактерии составляют наиболее обширную и весьма разнообразную группу микроорганизмов. Бактерии в основном представлены одноклеточными организмами, размножающимися простым поперечным делением клетки. Морфологически бактерии различают по форме, величине, взаимному расположению клеток, наличию или отсутствию жгутиков и капсул, способности клеток к спорообразованию и т. д.
По форме бактерии делят на три группы: шаровидные, палочковидные и извитые.
Шаровидные бактерии — кокки (*Соссus*). Направление плоскости деления клетки и характер взаимного расположения клеток используют как систематический признак при выделении родов шаровидных бактерий. Диаметр кокков 0,5- 1,2 мкм.
Моно- или микрококки (род *Мiсrococcus).* Их клетки делятся в любой плоскости и сразу после деления обособляются, располагаясь одиночно.
Диплококки (род *Diplococcus*) и стрептококки (род Streptococcus) образуются при делении клеток в одной плоскости; у диплококков клетки располагаются попарно, у стрептококков соединены в цепочки.
Тетракокки (род *Тetracoccus*) возникают при делении клеток в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, клетки образуют группы по 4 особи.

Escherichia coli. Бактерия Escherichia coli — один из наиболее хорошо изученных организмов. За последние пятьдесят лет удалось получить исчерпывающую информацию о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Это грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Ее средой обитания является кишечник человека, но она также может высеваться из почвы и воды. Благодаря способности размножаться простым делением на средах, содержащих только ионы Na+, K+, Mg2+, Ca2+, NH4+, Сl—, HPO42— и SO42—, микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу), E. coli стала излюбленным объектом научных исследований. При культивировании E.coli на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода, время генерации (т. е. время между образованием бактерии и ее делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37°С составляет примерно 22 мин.

Для каждого живого организма существует определенный температурный интервал, оптимальный для его роста и размножения. При слишком высоких температурах происходит денатурация белков и разрушение других важных клеточных компонентов, что ведет к гибели клетки. При низких температурах биологические процессы существенно замедляются или останавливаются совсем вследствие структурных изменений, которые претерпевают белковые молекулы. Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их можно подразделить на термофилы (от 45 до 90°С и выше), мезофилы (от 10 до 47 °С) и психрофилы, или психротрофы (от -5 до 35 °С). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур, могут быть полезным инструментом для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, которые применяются в промышленных или в лабораторных процессах, а генетически видоизмененные психротрофы используют для биодеградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде, при пониженных температурах.

*E. coli* можно культивировать как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. Однако для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Если целью культивирования бактерий в лаборатории является синтез и выделение определенного белка, то культуры выращивают на сложных жидких питательных средах в колбах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню или термостатируемую комнату и непрерывно встряхивают. Такой аэрации достаточно для размножения клеток, но не всегда - для синтеза белка. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются не содержанием в питательной среде источников углерода или азота, а содержанием растворенного кислорода: при 20°С оно равно примерно девяти миллионным долям. Это становится особенно важно при промышленном получении рекомбинантных белков с помощью микроорганизмов. Для обеспечения условий, оптимальных для максимальной продукции белков, конструируют специальные ферментеры и создают системы аэрации.

Saccharomyces cerevisiae. Дрожжи Saccharomyces cerevisiae - это непатогенные одноклеточные микроорганизмы с диаметром клетки примерно 5 мкм, которые во многих отношениях представляют собой эукариотический аналог E. coli. Их генетика, молекулярная биология и метаболизм детально изучены. S. cerevisiae размножаются почкованием и хорошо растут на такой же простой среде, как и Е. coli. Их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления алкогольных напитков и хлеба. В настоящее время ежегодно во всем мире расходуется более 1 млн. тонн S. cerevisiae. Дрожжи S. cerevisiae представляют также большой научный интерес. В частности, они являются наиболее удобной моделью для исследования других эукариот, в том числе человека, поскольку многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления S. cerevisiae, сходны с таковыми у человека. Это открытие способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Широко используемая генетическая система дрожжей (искусственная хромосома) является непременным участником всех исследований по изучению ДНК человека. В 19% г. была определена полная нуклеотидная последовательность всего набора хромосом S. cerevisiae, что еще более повысило ценность этого микроорганизма для научных исследований. Такая работа на эукариотах была выполнена впервые.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто приходится подвергать ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения — во многих случаях это необходимо для правильного функционирования белка. К сожалению, *E. coli* и другие прокариоты не способны осуществлять эти модификации, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae*, а также другие виды дрожжей: *Kluyveromyces lactis, Saccharomyces diastaticus, Schizisaccharomyces pombe, Yarrowia lipolytica, Pichia postons, Hansenula pofymorpha*. Наиболее эффективными продуцентами полноценных рекомбинантных белков являются *P. pastoris и H. polymorpha.*

*Культуры эукариотических клеток*. При всех различиях между типами эукариот методические подходы к культивированию клеток насекомых, растений и млекопитающих имеют много общего. Сначала берут небольшой кусочек ткани данного организма и обрабатывают его протеолитическими ферментами, расщепляющими белки межклеточного материала (при работе с растительными клетками добавляют специальные ферменты, разрушающие клеточную стенку). Высвободившиеся клетки помещают в сложную питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу и факторы роста. В этих условиях клетки делятся до тех пор, пока на стенках емкости с культурой не образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, то рост прекратится. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут. Культивируемые клетки сохраняют некоторые свойства исходного клеточного материала, поэтому их можно использовать для изучения биохимических свойств различных тканей.

Часто некоторые клетки перевиваемых первичных клеточных культур претерпевают генетические изменения, в результате которых ускоряется их рост. Культуры клеток, которые при этом приобретают селективные преимущества, оказываются способными к неограниченному росту in vitro и называются устойчивыми клеточными линиями. Одни клеточные линии сохраняют основные биохимические свойства исходных клеток, другие нет. У большинства клеток, способных к неограниченному росту, имеются значительные хромосомные изменения, в частности отмечается увеличение числа одних хромосом и потеря других. В молекулярной биотехнологии устойчивые клеточные линии иногда используют для размножения вирусов и для выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК. Кроме того, они применяются для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков.

**Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Изучить строение прокариотической бактериальной клетки и эукариотической животной клетки.

2. Сделать сравнительную характеристику прокариотической и эукариотической клеток.

3. Ознакомиться с наиболее хорошо изученными прокариотами и культурами эукариотических клеток.

Контрольные вопросы:

1.  Кто такие прокариоты?

2.  Кто такие эукариоты?

3.  Перечислите основные свойства *Escherichia coli.*

4.  Что означает термин «грамотрицательный»?

5.  Перечислите основные свойства *S. cerevisiae.*