

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

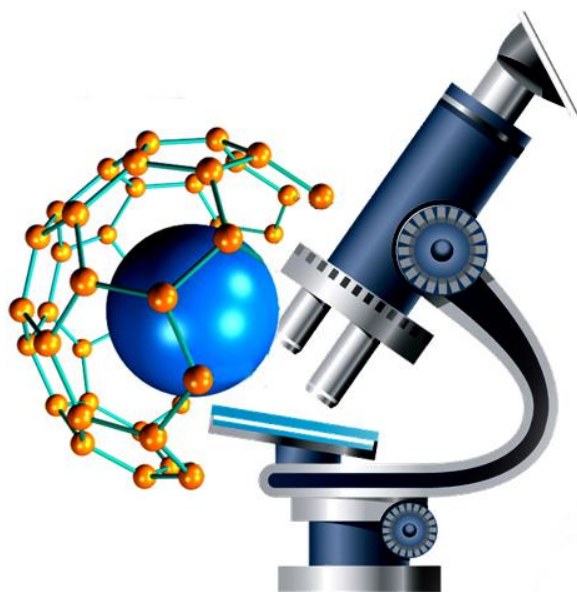
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

БІОТЕХНОЛОГІЯ

**методичні рекомендації для самостійного вивчення та
виконання контрольної роботи з дисципліни
для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр»
спеціальності 204 «ТВППТ» заочної форми навчання**



Миколаїв

2018

УДК 636.082.2
Б63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “ ” _____ р., протокол №__.

Укладач:

О. І. Юлевич – канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету

Рецензенти:

О. А. Горбенко – канд. техн. наук, доцент, завідувач кафедри механізації та електрифікації с.-г. виробництва Миколаївського національного аграрного університету

С. П. Кот – канд. біол. наук, доцент, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

З М І С Т

Загальні вимоги	4
Вступ	5
1. Генетична інженерія	6
1.1. Ферменти генетичної інженерії, визначення нуклеотидної послідовності ДНК	6
1.2. Вектори, що використовують у генетичній інженерії	9
1.3. Способи отримання генів	12
1.4. Лікарські засоби, що отримані за допомогою генетичної інженерії	16
1.5. Основні напрями та методи створення трансгенних тварин	18
2. Клітинна інженерія	24
2.1. Поведінка клітин у культурі	24
2.2. Гібридизація соматичних клітин	26
2.3. Лікарські речовини, що пов'язані з моноклональними антитілами	28
3. Ембріоінженерія	30
3.1. Основні етапи проведення трансплантації ембріонів	30
3.2. Кріоконсервація ембріонів	33
3.3. Монозиготні близнюки	34
3.4. Запліднення <i>in vitro</i>	35
3.5. Регулювання статі тварин	38
4. Клонування тварин	41
4.1. Ембріональне клонування	41
4.2. Соматичне клонування	42
4.3. Створення партеногенетичних тварин	44
4.4. Створення химерних тварин	45
5. Промислова біотехнологія	48
5.1. Стадії біотехнологічного виробництва	48
5.2. Субстрати для біотехнологічних виробництв	50
5.3. Біотехнологічна інтенсифікація процесів рубцевого травлення жуйних	51
5.4. Імобілізовані ферменти	54
6. Біотехнологія і енергетика	58
7. Генно-модифіковані організми (ГМО) і біобезпека	61
7.1. ГМО, агрономічно важливі характеристики рослин; змінені поживні властивості та склад ГМ-продуктів	61
7.2. Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО	64
8. Приклади рішення задач з курсу „Біотехнологія”	67
Питання до контрольної роботи	75
Номера питань до контрольної роботи з „Біотехнології”	87
Список використаної літератури	88

ЗАГАЛЬНІ ВИМОГИ

Навчальна дисципліна «Біотехнологія» є складовою частиною технології виробництва продукції тваринництва і ґрунтується на основі дисциплін фундаментальної і загальнопрофесійної підготовки: анатомії, фізіології, біохімії, генетики, відтворення, розведення, гігієни і годівлі сільськогосподарських тварин. Як результат вивчення цієї дисципліни здобувач вищої освіти повинен знати біологічні особливості відтворення сільськогосподарських тварин та способи її регуляції, біотехнологічні методи розповсюдження цінних у селекційному плані фенотипів, збереження видів і порід, одержання клонованих тварин, регуляції статі, застосування нових генотипів тварин та біологічно активних речовин з метою збільшення ефективності отримання традиційно відомих та нових нехарактерних для цієї галузі продуктів тваринництва.

Згідно з учбовим планом дисципліну «Біотехнологія» здобувачі вищої освіти заочної форми навчання вивчають на третьому курсі. На лекції відводиться 12 годин, на практичні заняття – 14 годин. На лекціях висвітлюються основні, найважливіші питання з дисципліни. Під час практичних занять здобувачі вищої освіти самостійно працюють над завданнями, для виконання яких у них не було умов на виробництві.

Перед написанням контрольної роботи, здобувач вищої освіти вивчає тему за основними підручниками і додатковою літературою, необхідно використовувати також матеріали (статті) міжвідомчих наукових збірників, бюлетенів, авторефератів дисертацій та журналів «Вісник аграрної науки», «Тваринництво України», «Зоотехнія» та інші. В роботі слід стисло, грамотно, змістовно відповідати на контрольні запитання. Робота виконується державною мовою. Обсяг контрольної роботи повинен бути в межах 12-14 сторінок рукописного тексту.

Контрольну роботу треба писати чорнилом, чітко, розбірливо, залишаючи поля для зауважень рецензента. На титульній сторінці слід написати номер контрольної роботи, назву дисципліни, номер варіанта контрольного завдання, зазначити курс, факультет, своє прізвище, ім'я та по батькові, шифр (номер залікової книжки), домашню адресу та дату написання роботи.

В кінці контрольної роботи обов'язково дати за алфавітом список використаної літератури і підписатись.

ВСТУП

Біотехнологія як наука, що використовує біологічні принципи в практичній роботі, виникла в кінці XIX століття, коли досягнення мікробіології стали впроваджувати в народне господарство. Але ще від зародження цивілізації людина виступала в ролі біотехнолога, використовуючи для одержання продуктів харчування результати діяльності мікроорганізмів. Проте цей процес відбувався стихійно.

З історичної точки зору біотехнологія виникла тоді, коли дріжджі вперше були використані для виробництва пива, а бактерії – для отримання йогуртів.

Значні успіхи, що були досягнуті у другій половині XX століття у фундаментальних дослідженнях у галузі біохімії, біоорганічної хімії і молекулярної біології, створили передумови для керування елементарними механізмами життєдіяльності клітини, що стало потужним імпульсом для розвитку біотехнології. З'ясування ролі нуклеїнових кислот у передачі спадкової інформації, розшифрування генетичного коду, розкриття механізмів індукції та репресії генів, удосконалення технології культивування мікроорганізмів, клітин і тканин рослин та тварин дозволили розробити методи генетичної і клітинної інженерії, за допомогою яких можна штучно створювати нові форми високопродуктивних організмів.

Розвиток методів для вивчення структури білків, з'ясування механізмів функціонування і регуляції активності ферментів відкрили шляхи до спрямованої модифікації білків і створили умови створення нового напрямку біотехнології – інженерної ензимології. Імобілізовані ферменти, що володіють високою стабільністю, стають потужним засобом для здійснення каталітичних реакцій у різних галузях промисловості.

Всі ці досягнення поставили біотехнологію на новий рівень, який якісно відрізняється від попереднього можливістю свідомо керувати клітинними процесами. Сучасне визначення **біотехнології** – *це промислове використання біологічних процесів і агентів для отримання високоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослин та тварин із заданими властивостями.*

З розвитком технології рекомбінантних ДНК природа біотехнології змінилася. З'явилась можливість оптимізувати етап біотрансформації більш прямим шляхом, створювати, а не просто відбирати високопродуктивні штами, використовувати мікроорганізми і еукаріотичні клітини як «біологічні фабрики» для виробництва інсуліну, інтерферону, гормону росту, вірусних антигенів та велику кількість інших білків. Технологія рекомбінантних ДНК дозволяє отримати в значній кількості цінні низькомолекулярні речовини і макромолекули, які в природних умовах синтезуються в мінімальній кількості. Рослини і тварини стали природними біореакторами, що продукують нові або змінені генні продукти, які ніколи неможливо було б створити методами мутагенезу і селекції або схрещування.

Таким чином, основними задачами біотехнології можна визначити такі:

- можливість точної діагностики, профілактики і лікування інфекційних і генетичних захворювань;

- значне збільшення врожайності сільськогосподарських культур шляхом створення рослин стійких до шкідників, грибкових та вірусних інфекцій та шкідливого впливу навколишнього середовища;
- створення мікроорганізмів, що продукують різні хімічні сполуки, антибіотики, полімери, амінокислоти, ферменти;
- створення порід сільськогосподарських та інших тварин, спадкові властивості яких поліпшені;
- переробка викидів, що забруднюють навколишнє середовище.

Основними напрямками використання біотехнології у тваринництві є створення штучних, або більш повноцінних кормів, гормональних, ферментних та лікарських препаратів, які стимулюють ріст, продуктивність, відтворну здатність, підвищують стійкість проти захворювань у тварин. Крім того, можливо створювати організми з поєднанням ознак, які не відомі у природі, тобто одержувати гібриди різних видів тварин, так звані, *химери*.

Для сучасної біотехнології характерний комплексний підхід, широке використання досягнень і методів не лише молекулярної біології та генної інженерії, але також і хімії, фізики, біоінформатики. Біотехнологія – міждисциплінарна наука. В останні роки саме міждисциплінарні дослідження набувають зростаючого значення, оскільки вони пов'язані з новими проривами в науці. У зв'язку з цим, останнім часом як окремих напрямків досліджень розглядається створення єдиних технологічних платформ для проведення широкого спектру досліджень. Разом з тим, традиційно, залежно від сфери застосування виділяють «червону» (медичну), «білу» (промислову) і «зелену» (сільськогосподарську) біотехнологію.

Сучасні актуальні проблеми, що стоять перед людством, а саме: нестача продовольства, виникнення нових і особливо небезпечних для здоров'я людини захворювань, нестача енергетичних ресурсів для росту національних економік, проблеми біобезпеки та забруднення навколишнього середовища, є об'єктивною передумовою того, що у XXI столітті біотехнологія стане одним з визначальних чинників соціально-економічного розвитку держав. Використання досягнень біотехнології призводить не лише до створення нових продуктів і послуг, але і до принципових структурних зрушень в економіці і соціальному житті.

1. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

Генетична інженерія – це нова галузь молекулярної біотехнології, яка розробляє методи перенесення генетичного матеріалу від одного живого організму до іншого з метою одержання нової генетичної інформації та управління спадковістю. Розвиток генетичної інженерії пов'язаний з досягненнями сучасної генетики, мікробіології, біохімії та інших наук. Початок генетичної інженерії покладений Полем Бергом в 1972 р., який одержав перші гібридні (рекомбінантні) ДНК. *Рекомбінантні ДНК* – це молекули ДНК, які отримані за рахунок поєднання *in vitro* різнорідних, ніде не існуючих в природі сумісно, фрагментів ДНК.

Генетична інженерія дозволяє, на відміну від статевої гібридизації, вводити в геном організму тільки конкретний ген будь-якого походження поза зв'язку зі статевою сумісністю донора та реципієнта. Інакше кажучи, сутність генетичної інженерії полягає у цілеспрямованому переміщенні окремих генів з одного генетичного оточення – в інше. Внаслідок чого спадкова інформація організму змінюється, йому надаються нові генетичні і, відповідно, біохімічні, фізіологічні властивості, корисні для людини. Одержаний в результаті таких маніпуляцій організм має назву – *трансгенний*.

Об'єктами молекулярної біотехнології є різноманітні біологічні системи: мікроорганізми, клітинні лінії комах, рослин і ссавців, віруси комах, рослин і ссавців, багатоклітинні організми – вибір залежить від мети експерименту. Найчастіше використовують бактерії *E.coli* і одноклітинні дріжджі. Метою генетичної інженерії у відтворенні і селекції с.-г. тварин є створення тварин з новими спадковими властивостями. Задача генетичної інженерії полягає в ідентифікації і виділенні генів, з якими відбувається маніпулювання *in vitro* – клонування, а також у створенні рекомбінантних (гібридних) ДНК. Для методів генетичної інженерії характерно насамперед використання ферментів, які здатні впливати на структуру ДНК, і векторів, які необхідні для перенесення і підтримки у клітинах-реципієнтах чужорідних генів.

1.1. Ферменти генетичної інженерії, визначення нуклеотидної послідовності ДНК

У генетичній інженерії використовують ферменти, які отримані з бактерій або клітин тварин, що культивуються *in vitro* і заражених вірусами. Ці ферменти дозволяють проводити різні маніпуляції з молекулами ДНК: розрізати у певних місцях, з'єднувати різні за походженням фрагменти, синтезувати нові послідовності, які не існують у природі та ін.. До основних ферментів генної інженерії належать: ДНК-полімерази, РНК-полімерази, лігази, нуклеази, рестриктази і зворотна транскриптаза, або ревертаза.

ДНК-полімерази. В основі реплікації ДНК (створення копії, само подвоєння) лежить принцип компліментарності – спарування певних нуклеотидних основ (гуанін до цитозину, аденін до тиміну) і матричний спосіб синтезу дочірної ДНК. Реплікація починається з певної ділянки дволанцюгової

молекули ДНК (*реплікаційної вилки*) і здійснюється одночасно у двох ланцюгах, які поступово роз'єднуються. Дочірній ланцюг синтезується за допомогою ферментів – ДНК-полімераз.

РНК-полімерази. Незважаючи на високу ферментативну активність ДНК-полімераз, вони не здатні ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль виконують РНК-полімерази. Фермент РНК-полімераза знаходить промотори, активує матрицю ДНК і відбувається локальне розплітання подвійної спіралі ДНК. Однак, основна роль РНК-полімераз полягає у каталізі процесу транскрипції (тобто створенні РНК на підставі ланцюга ДНК).

Зворотна транскриптаза (ревертаза). Під час досліджень інфекційних часточок вірусу саркоми Рауса було встановлено, що в них міститься фермент, аналогічний ДНК-полімеразі, але синтезуючий ДНК не на основі ланцюга ДНК, а на ланцюзі РНК. В цьому випадку інформація передається у зворотному напрямку, тобто від РНК до ДНК.

Біологічна роль ревертази полягає в синтезі копій ДНК з геномів РНК у деяких РНК- вмісних вірусів. Віруси, спадкова інформація в яких закодована в РНК а не в ДНК, мають назву *ретровіруси*. Зворотна транскриптаза в ретровірусах здатна синтезувати по матриці РНК комплементарний до неї ланцюг ДНК, руйнувати саму РНК, а потім на основі матриці ДНК синтезувати аналогічний вірусній РНК комплементарний ланцюг ДНК. Після цього здійснюється експресія гена, тобто транскрипція з ДНК на РНК і трансляція, під час якої створюються вірусні білки.

Лігази – це ферменти, які здатні лігірувати (зшивати, з'єднувати) між собою різні фрагменти ДНК.

У клітинах лігази беруть участь як у процесах синтезу ДНК, так і при її *репарації*, тобто відновленні нормальної структури ДНК після часткового пошкодження генетичного апарату. В наш час відомо, що не завжди пошкоджені структури ДНК перетворюються на мутантів. Багато цих структур, особливо в тому випадку коли дія фактора пошкодження була слабкою, відновлюються за допомогою специфічних факторів, що здійснюють репарацію, в тому числі і за допомогою лігаз. Найчастіше для лігірування у генній інженерії використовують лігазу фага Т4. За допомогою лігази Т4 з'єднуються будь-які фрагменти ДНК з будь-якими кінцями: „липкими” або „тупими”.

Рестриктази – це група ферментів, які розрізають дволанцюгову молекулу ДНК. Назва рестриктаз складається з початкових букв латинської назви виду бактерій, з якого був виділений фермент, і додаткового позначення, оскільки з бактерій одного виду може бути виділено декілька різних рестриктаз. Залежно від характеру розрізання рестриктази поділяються на дві групи. Рестриктази I типу розрізають молекулу ДНК в будь якому місці і не мають певного *сайту розпізнання, або сайту рестрикції* (специфічна послідовність нуклеотидів, в якій здійснюється розрізання ланцюга). Ці рестриктази не можливо використовувати для рішення задач генної інженерії.

Рестриктази II типу мають певні сайти рестрикції, розпізнають певну послідовність нуклеотидів і гідролізують ланцюг усередині сайту.

Нуклеаза S1 з Aspergillus oryzae специфічно розщеплює одноланцюгові молекули ДНК із утворенням 5'- фосфорильованих моно- і олігонуклеотидів.

Обробка ДНК певною рестриктазою завжди дає однаковий набір фрагментів – за умови, що розщеплення відбувається по всіх сайтах розпізнання. Якщо використовувати декілька рестриктаз і спочатку обробити ДНК кожною з них окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК, або *рестрикційну карту*, тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції вздовж молекули. Чим більше використовується рестриктаз для картирування, тим більш докладна карта.

Секвенування – визначення нуклеотидної послідовності. Методи, що надали можливість ідентифікувати генетично важливі ділянки ДНК, мають велике значення. Існують два основні методи секвенування: хімічний і ферментативний.

Хімічне секвенування засновано на вибірковій хімічній деградації нуклеотидів.

Метод ферментативного секвенування, або метод секвенування шляхом термінації (зупинки синтезу) ланцюга, запропонований Ф.Сенгером у 1977р. В основі методу Сенгера лежить принцип реплікації комплементарного ланцюга ДНК на одноланцюговій матриці, при тому, що під час реплікації відбувається термінація – припинення синтезу дочірнього ланцюга у різних місцях, а наступний ланцюг знову починає синтезуватися від початку матриці до наступної термінації. Основним моментом ферментативного секвенування є термінація синтезу ланцюга, що будується. Агентами термінації, які викликають зупинку реплікації, є дидезоксинуклеотиди (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ) – це нуклеотиди позбавлені 2'- і 3'-гідроксильної груп при вуглеводних атомах цукрового кільця і тому подовження ланцюга, яке відбувається за рахунок приєднання чергового нуклеозидтрифосфату до гідроксильної групи, припиняється.

1.2. Вектори, що використовують у генетичній інженерії

Уведення у клітину і стабільна підтримка генетичної інформації, що міститься у рекомбінантних молекулах ДНК, досягається за допомогою векторних молекул, або векторів. *Векторами називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (перенесення у інші організми).* Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткової генетичної інформації. В якості векторів використовують, як правило, плазміди, бактеріофаги, мобільні елементи, віруси тварин. В наш час створено значну кількість векторів, які розрізняють за профілем їх використання на декілька типів.

1. Вектори для клонування. Використовують для *ампліфікації* (збільшення кількості) шляхом реплікації фрагмента ДНК, що вбудований у

такий вектор. Для цього найчастіше використовують бактеріальні плазмиди і фаги. Для клонування великих фрагментів геному використовують вектори – штучні бактеріальні і дріжджові хромосоми (*BAC* і *YAC*).

2. Вектори експресії. Їх використовують для аналізу певних послідовностей генів і білкових продуктів, а також для отримання певного білку. Існує значна кількість систем експресії, особливо для прокаріотичних організмів. Є також вектори для експресії генів у клітинах дріжджів, рослин і тварин. Вектори експресії для еукаріотів завжди містять промотор, здатний працювати у даному типі організму і сайт поліаденілірування (*poly(A)*-хвіст), який складається приблизно з 200 залишків аденозину. Наявність *poly(A)*-хвосту дозволяє відокремити матричну – мРНК від рибосомальної – рРНК і транспортної – тРНК, а також надає можливість приєднання олігомерів *oligo(dT)*, які ініціюють синтез комплементарних ДНК-копій (кДНК) на підставі мРНК за допомогою ревертази.

3. Вектори для трансформації. Використовують для введення чужорідного фрагмента ДНК у геном реципієнта. Як правило, такі вектори містять специфічні послідовності, які сприяють інтеграції у геном.

Сучасні векторні системи, в основному, бувають поліфункціональні і об'єднують декілька функцій в одному векторі. Часто у складі векторів існує маркерний ген, який після проникнення вектора у клітину надає їй фенотип, який свідчить про наявність у клітині вектора. Тобто бажано щоб вектор мав селективну генетичну ознаку. Такими ознаками буває стійкість до антибіотиків, до іонів важких металів, температурна стійкість.

У цілому до векторних молекул висувають наступні основні вимоги:

1) вектор повинен мати унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз (в найкращому випадку по одному для кожної), що надає можливість вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;

2) вектор повинен володіти певною ємністю і не виключати вбудований фрагмент;

3) вектор повинен бути репліконом, тобто здатним до реплікації в певних клітинах за рахунок послідовності початку реплікації або власної, або клітинного господаря;

4) вектор повинен містити послідовність маркерного гена, за допомогою якої можливо здійснити селекцію клітин з векторною конструкцією.

Векторні конструкції з чужорідним геном використовують для трансформації бактеріальних клітин спеціальних штамів *E.coli*.

Трансформація – це процес переносу генетичної інформації, при якому ДНК, що виділена з клітини-донора, потрапляє у клітину-реципієнт.

Для конструювання векторів у генній інженерії використовують хромосоми вірусів, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин, а також невеликі молекули нуклеїнових кислот, здатних до автономної реплікації в бактеріальних і еукаріотичних клітинах – плазмиди.

Були виявлені плазмиди, які володіють здатністю створювати міжклітинні контакти, за допомогою яких вони переміщуються з однієї клітини в іншу. Створення контактів між донорською і реципієнтною клітинами забезпечується

кон'югативними властивостями плазмід, які мають генетичні системи, що детермінують перенесення плазмід в інші клітини внаслідок кон'югації. Таким чином, *кон'югація* – це процес генетичного обміну, при якому здійснюється перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта при безпосередньому контакті клітин між собою. За здатністю до кон'югативного переносу плазмід поділяються на кон'югативні і некон'югативні. Кон'югативні плазмід містять, так званий фактор фертильності F . Клітини, що містять цей фактор стали називати клітинами F^+ , а клітини, які не містять цього фактора – клітинами F^- . Виявилось, що клітини з фактором F завжди є донорами генетичного матеріалу, а клітини, в яких цей фактор відсутній – реципієнтами.

З клітини-донора в клітину-реципієнт переноситься лише одна нитка плазмідної ДНК починаючи зі специфічного сайту *oriT*, де створюється одноланцюговий розрив. Потім відбувається розподілення ланцюгів ДНК, яке необхідне для ініціації переносу і комплементарного синтезу ДНК як у клітині-донорі, так і у клітині-реципієнті. Етап, що завершує цей процес, пов'язаний з утворенням кільцевих структур плазмідних ДНК.

Бактеріофаги, або просто *фаги*, – це віруси бактерій. Вони здатні проникати у живі клітини і лише в них відтворюватися. У більшості випадків фагові часточки – *віріони*, складаються з ДНК (або РНК) і білка, що створює оболонку (головку, або *капсид*) навколо нуклеїнової кислоти і хвостовий відросток. Інколи, в процесі розмноження фагів у бактеріях створюються часточки, які поряд з фаговою ДНК або замість неї містять фрагменти бактеріальної ДНК. Такі часточки мають назву трансдукуючі. За своїми властивостями вони не відрізняються від звичайних фагових віріонів, але при зараженні ними нових клітин вони передають їм генетичні детермінанти попередніх господарів. Таким чином відбувається процес трансдукції, тобто *трансдукція* – це перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта за допомогою фага.

Однак, нема потреби очікувати коли ДНК фага буде захоплювати фрагмент чужорідної ДНК для її внесення в клітину-реципієнт, якщо можливо штучно створити рекомбінантну ДНК фага і використовувати такий фаг в якості вектора (наприклад, для клонування великих фрагментів ДНК). Тим більше, що фаговий вектор уводить рекомбінантну ДНК при зараженні клітини, тобто *методом інфекції*, що значно ефективніше, ніж шляхом трансформації або трансдукції.

У наш час клоновано більше, ніж 400 генів (в основному у вигляді кДНК, тобто комплементарних зрілим мРНК) різних білків людини, які можуть бути лікарськими препаратами. Більшість цих генів вже експресовані у клітинах-реципієнтах, і їх продукти проходять перевірку на можливість використання для лікування різних захворювань.

Дуже цікавим є використання в якості терапевтичних засобів специфічних антитіл; їх можливо застосовувати для нейтралізації токсинів, боротьби з бактеріями, вірусами, для лікування ракових захворювань. Антитіло або нейтралізує чужорідну клітину, або руйнує специфічну клітину-мішень.

Для розшуку генів або кДНК білків людини використовують різні підходи. В деяких випадках виділяють необхідний білок і визначають амінокислотну послідовність відповідної ділянки молекули. Виходячи з цього, знаходять послідовність нуклеотидів, що її кодує, синтезують відповідний полінуклеотид і використовують його в якості зонда гібридизації для розпізнавання необхідного гена або кДНК з геномних бібліотек. Інший підхід пов'язаний з виробленням антитіл до очищеного білку і використанням їх для скринінгу (тотальний відбір) бібліотек, в яких здійснюється експресія певних генів.

1.3. Способи отримання генів

Розрізняють декілька методів отримання генів:

- хімічний синтез;
- виділення генів з ДНК – рестрикційний метод;
- ферментативний синтез, за допомогою ферменту генетичної інженерії – зворотної транскриптази, або ревертази;
- хіміко-ферментативний синтез;
- отримання фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Хімічний синтез. Знаючи первинну структуру білка і його генетичний код, можна скласти послідовність нуклеотидів у гені заданого білка, а потім синтезувати його. У цей спосіб можна одержати невеликі гени довжиною до двох десятків кодонів. Перший ген було синтезовано у 1969 р. групою Х. Корани. Ген аланінової тРНК дріжджів вони одержали шляхом поєднання синтетичних дрібних фрагментів (від 4 до 13 пар нуклеотидів) у необхідному порядку за допомогою ферменту ДНК-лігази. В одержаному гені не вистачало регуляторних ділянок, тому він був функціонально неактивним. У 1976 р. Х. Корана і співробітники синтезували фрагмент ДНК кишкової палички, який кодував тирозинову тРНК, але до його кінців вони приєднали гібридні «затравки» – тетрануклеотиди ААТТ і ТГАА. Синтезований ген виявився повністю активним. При введенні його в мутантний штам бактеріофага Т4, у котрому цього гена бракувало, бактеріофаг добре розмножувався в клітинах кишкової палички, тобто ставав повноцінним. Група Г. Бойера здійснила хімічний синтез гена гормону соматостатину і ввела його в лактозний оперон кишкової палички поруч із геном β -галактозидази (лактази). У результаті бактерія почала виробляти білок, у якому одна частина була β -галактозидазою, а друга – соматостатином. Отже, транскрипція і трансляція цього гібрида здійснювалася за рахунок використання відповідних регуляторних послідовностей β -галактозидази. Надалі соматостатин було виділено у вигляді пептиду. Ці блискучі експерименти показали можливість створення хімічним шляхом генів, які не відрізняються від природних.

Виділення генів з ДНК – рестрикційний метод. Отримання генів за допомогою специфічних ендонуклеаз – рестриктаз. Ці ферменти були відкриті у 1953 р. у бактерій. За допомогою рестриктаз розщеплюють ДНК бактерій

іншого штаму або клітини-господаря. До теперішнього часу з різних мікроорганізмів виділено понад тисячі різних рестриктаз; в генетичній інженерії використовується близько 200.

Рестриктази гідролізують ДНК суворо по певних специфічних послідовностях, так званих *сайтах рестрикції*. Кожна з рестриктаз розпізнає свій сайт рестрикції і розрізає ДНК або всередині сайту, або в безпосередній близькості від нього.

Однак рестриктази не «вирізують» повністю ген і його потрібно або добудувати хімічним шляхом, або відщеплювати зайві нуклеотидні послідовності. Тому цей метод виділення генів з ДНК має *недоліки*:

1. Досить важко підібрати рестриктази, що дозволяють вирізати з ДНК саме ту ділянку, яка відповідає певному гену. Разом із геном, який потрібен, отримані фрагменти ДНК, як правило, включають зайві нуклеотидні послідовності, що заважають використанню гена. Рестриктаза може відщепити частину нуклеотидної послідовності гена, в результаті ген втрачає функціональну повноцінність.

2. Гени еукаріот мають складну будову: включають екзони та інтрони. Первинна РНК, синтезована на такій ДНК-матриці, піддається модифікації (*сплайсингу*), в результаті ділянки, що відповідають інтронам, відокремлюються, а ділянки, що відповідають ексонам, з'єднуються, утворюють *зрілу матричну РНК (мРНК)*. Наявність інтронів є перешкодою для нормального функціонування трансплантованих генів.

3. При обробці ДНК рестриктазами утворюється суміш фрагментів. Виділити з неї фрагменти, що несуть потрібний ген – складне завдання. Бактеріальна клітина містить близько 5 тис. генів, проте еукаріотична клітина – від 10 до 200 тис. генів.

Ферментативний синтез.

У подальших дослідженнях із синтезу генів почали застосовувати менш трудомісткий і швидший метод – синтез за участю ферменту зворотної транскриптази (ревертази). Цей фермент наявний у деяких РНК-вірусів, у яких генетична інформація зберігається не в ДНК, а в РНК. При вивченні цього ферменту було з'ясовано, що матрицею для утворення ДНК може служити навіть синтетична мРНК. Це відкривало нові шляхи для синтезу різноманітних генів за допомогою матричної РНК. Якщо *in vitro* у спеціальну інкубаційну суміш додати певну мРНК (наприклад, мРНК проінсуліну), то синтезується ген, комплементарний саме цій мРНК, у якому закодована структура відповідного білка (проінсуліну). На мРНК ревертаза синтезує комплементарну їй ДНК-копію (кДНК). Тому роботу починають із виділення та очищення потрібної мРНК із суміші багатьох різних мРНК. Отриману специфічну мРНК використовують як матрицю для ферментативного синтезу кДНК за допомогою ревертази. Для початку реакції синтезу ДНК-ревертазою потрібний «запал» у вигляді невеликого дволанцюжкового відрізка. Цю функцію виконують короткі олігонуклеотиди з 18-20 тимінових залишків (полі-Т), які з'єднуються за принципом комплементарності з полі-А-послідовністю мРНК. В результаті утворюється гібридна мРНК-кДНК молекула, причому на кінці у неї буде

синтезуватися короткий відрізок дволанцюжкової ДНК – *шпилька*. Шпилька служить «запалом» для синтезу другого комплементарного ланцюга ДНК, що здійснюється вже ферментом ДНК-полімеразою. В утвореному гібриді мРНК-кДНК усувається ланцюг мРНК за допомогою ферментів РНКаз, і на одноланцюговій кДНК за допомогою ДНК-полімерази I добудовується другий ланцюг кДНК. У результаті утворюється дволанцюгова кДНК, яка потім з'єднується з необхідним вектором.

Хіміко-ферментативний синтез. Цей метод є альтернативою «вирізанню» генів за допомогою рестриктаз з нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8-16-фрагментів) одноланцюгових фрагментів ДНК (олігонуклеотидів) за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігази з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів. Хіміко-ферментативний синтез дозволяє точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів. Крім того, існує можливість уведення в гени ділянок розпізнання різних рестриктаз, регуляторних послідовностей. Хімічним шляхом синтезують олігонуклеотиди: лінкер, адаптери, праймери, промотори, а гени синтезують ферментативним методом.

Лінкер (англ. «*link*» – з'єднувати) – короткий дволанцюговий олігонуклеотид, що містить сайти розпізнання для ряду рестриктаз.

Адаптери – це лінкери, що містять більше одного сайту впізнавання рестриктазою, він призначений для з'єднання фрагментів з несумісними кінцями.

Праймери – короткі одноланцюгові фрагменти, комплементарні початку або кінцю гена.

Промотор (80...100 нуклеотидів) – фрагмент ДНК, що розпізнається РНК-полімеразою.

Застосування цього методу обмежене можливостями отримання інформації про нуклеотидну послідовність гена. Ця послідовність може бути відтворена на основі первинної структури відповідного білка. Методом хіміко-ферментативного синтезу отримано гени соматостатину, А- і В-ланцюги інсуліну, проінсуліну та ін.

Отримання фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Чисельні (ампліфіковані у мільйон разів) копії певних фрагментів ДНК отримують *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яку поширено використовують у наш час. Вперше її запропонували у 1985 році Р.К. Сейки, С. Шарф, Ф. Фалуна, К.Б. Муллис, Г.Е. Хорн, Х.А. Ерліх і Н. Арнхейм. ПЛР високо специфічна і чутлива, за її допомогою можна виявити, розмножити і дослідити навіть одиничну копію гена у вихідному матеріалі. Зазвичай 30 циклів ампліфікації протікає протягом трьох годин.

Типова ПЛР-ампліфікація складається з багаторазового повторення наступних реакцій:

1. *Денатурація.* Перший етап ПЛР полягає у тепловій денатурації зразка ДНК шляхом витримання його при температурі 95°C протягом принаймні

1 хв. Крім ДНК в реакційній суміші міститься надлишок двох праймерів, термостабільна ДНК-полімераза *Taq*, що виділена з бактерій *Thermus aquaticus*, і чотири дезоксирибонуклеотида.

2. *Ренатурація (відпал)*. Температуру суміші повільно знижують ~ до 55°C, при цьому праймери з'єднуються із комплементарними послідовностями ДНК.

3. *Синтез*. Температуру підвищують до ~ 75°C – величини, оптимальної для ДНК-полімерази *Taq*. Починається синтез комплементарного ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера.

Для здійснення ПЛР необхідно знати послідовність як найменш 17 п.н. з обох боків дослідного фрагменту ДНК. Зазвичай синтезують два дезоксинуклеотиди довжиною 20-30 основ, які являють собою кінцеві послідовності фрагменту ДНК, що нас цікавить. Використовуючи комплементарні до цих ділянок олігомери – праймери, запускають *ампліфікацію* (процес збільшення копій гена). Надлишкову кількість праймерів змішують з геномною ДНК, а потім послідовно здійснюють реакції денатурації, відпалу (ренатурації) і нарощування ланцюга (подовження праймера). Теплова денатурація супроводжується розплітанням подвійної спіралі ДНК. При зниженні температури має місце відпал олігонуклеотидів, тобто здійснюється гібридизація олігонуклеотидних праймерів зі своїми комплементарними послідовностями. Ріст ланцюга праймерів каталізує ДНК-полімераза в присутності дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, і в результаті добудовується новий комплементарний ланцюг ДНК.

При повторних циклах теплової денатурації, відпалу і синтезу нові ланцюги ДНК, що створилися, виступають у якості шаблонів (матриць) для праймерів, що викликає експоненціальне нарощування ділянки ДНК, обмеженої праймерами, що входять до складу цих фрагментів.

Для здійснення ПЛР необхідно:

- два синтетичних олігонуклеотидних *праймери* (короткі олігонуклеотиди, які гібридизуються із матрицею і слугують запалом при її копіюванні) довжиною приблизно 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів, що *фланкують* (оточують) послідовність-мішень, яку розмножують; їх 3'-гідроксильні кінці після *відпалу* (процес утворення дволанцюгових молекул (ДНК-ДНК або ДНК-РНК) з одностанцюгових полінуклеотидних комплементарних ланцюгів) з ДНК повинні бути орієнтовані назустріч один одному;

- ДНК-матриця довжиною від 100 до ~ 35 000 п.н.;

- термостабільна ДНК-полімераза, яка не втрачає активність при температурі 95°C і вище;

- набір з чотирьох дезоксирибонуклеотидів (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);

- іони Mg^{2+} , що необхідні для роботи полімерази. Буферний розчин, що забезпечує відповідні умови реакції – рН, іонну силу розчину. Містить солі, бичачий сироватковий альбумін.

Метод ПЛР має надзвичайно широке застосування. Його використовують кожного разу, коли є необхідність детектувати й дослідити невелику кількість ДНК, у тому числі, у складі неочищеного біологічного матеріалу. ПЛР застосовують також у комбінації з клонуванням: ампліфікований ДНК-продукт можна клонувати й використати, наприклад, для експресії білка; ампліфікація за допомогою ПЛР стає в пригоді для збільшення невеликої кількості клонованої ДНК.

В даний час ПЛР широко використовується в наукових і діагностичних лабораторіях в багатьох галузях. Крім простого подвоєння послідовностей ДНК, метод ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК), клонування будь-яких послідовностей в пробірці, виділення нових генів, секвенування. Також ПЛР широко використовується в біологічній і медичній практиці, в першу чергу, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, ступеня споріднення, популяційних досліджень, в криміналістиці – скрізь, де потрібно встановити унікальну послідовність ДНК, спираючись на мінімальну кількість вихідного матеріалу, що її містить.

1.4. Лікарські засоби, що отримані за допомогою генетичної інженерії

З розвитком технології рекомбінантних ДНК, з'явилася можливість створення нового покоління вакцин, що позбавлені недоліків традиційних вакцин. Для їх розробки використовують такі методи генної інженерії:

1. *Модифікація патогенного мікроорганізму за рахунок делеції* (вилучення) з генома ділянки гена, що відповідає за вірулентність. Такий вірус можна використовувати як живу вакцину, оскільки вирощування в культурі виключає імовірність спонтанного відновлення цілого гена.

2. *Створення живої непатогенної системи*, що містить окремі антигенні детермінанти неспорідненого патогенного організму. Така система здатна викликати імунну відповідь на патогенний мікроорганізм.

3. *Створення субодиничних вакцин*, які використовують у разі, коли патогенний мікроорганізм не здатний рости в культурі. Тоді ділянки генів цього мікроорганізму, що відповідають за синтез білків антигенних детермінант, вилучають, клонують і здійснюють їх експресію (процес реалізації генетичної інформації) у клітинах-господарях, наприклад, в *E. coli*.

4. *Створення системи специфічного руйнування клітин-мішеней*. Деякі патогенні мікроорганізми діють не безпосередньо на організм, а на окремі його клітини, які після інфікування починають виробляти речовини, що небезпечні для організму. Для таких захворювань можна сконструювати ген, що відповідає за синтез химерного білка, одна частина якого зв'язується з інфікованою клітиною, а друга – руйнує її. Ця система не є дійсною вакциною, хоча вона і діє лише на інфіковані клітини.

Субодиничні вакцини. Як правило, вакцини містять непошкоджені патогенні мікроорганізми, але вони повинні бути неживі або атенуєвані.

Антитіла, що виробляються у відповідь на їх уведення, зв'язуються з поверхневими білками патогенного організму і запускають імунну відповідь. Однак, що стосується вірусів, було показано, що для здійснення синтезу антитіл в організмі-власника достатньо очищених поверхневих білків вірусу (білків *капсиду* або зовнішньої оболонки). Вакцини, що містять лише окремі компоненти патогенного організму, мають назву «субодиничні» і створюються за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Переваги їх полягають у тому, що такі вакцини стабільні, безпечні, їх хімічні властивості відомі, в них відсутні додаткові білки і нуклеїнові кислоти, які можуть викликати небажані побічні ефекти в організмі господаря. Недоліками є те, що очищення таких вакцин досить дороге, а будова білка (*антигенної детермінанти*) буває, що відрізняється від цього білка у складі вірусного капсиду або оболонки, а це може викликати зміну його антигенних властивостей.

Пептидні вакцини. Чи може невелика ділянка білкової молекули (домен) бути ефективною субодиничною вакциною й індукувати вироблення антитіл? Здається, що ті домени, які доступні для антитіла (тобто ті, що перебувають на поверхні вірусу), мають імуногенні властивості, а внутрішні домени несуттєві, якщо вони не впливають на конформацію імуногенного домена. Якщо це припущення вірне, то короткі пептиди, що імітують *епітопи* (антигенні детермінанти), можна використовувати для створення вакцин.

І все-таки існує кілька обмежень використання коротких пептидів як вакцини:

- епітоп, що використовується для створення ефективною пептидною вакциною, повинен являти собою коротку, але безперервну ділянку білкової молекули, а це буває не завжди;
- конформація пептиду повинна бути такою ж, як і в епітопі у інтактній вірусній частці;
- ізольований епітоп може не володіти достатньою імуногенністю.

У майбутньому синтетичні пептидні вакцини можуть стати високо-специфічними, відносно недорогими, безпечними й ефективними альтернативами традиційним вакцинам, хоча для цього слід провести ще чимало досліджень.

Атенуовані вакцини. У деяких випадках, як живі вакцини, можна використовувати генетично модифіковані (рекомбінантні) мікроорганізми (бактерії або віруси). Такі вакцини містять або непатогенні мікроорганізми, що синтезують антигенні детермінанти певного патогенного агента, або штами патогенних мікроорганізмів, у яких модифіковані чи *делетировані* (вилучені за рахунок делеції) гени вірулентності. У цьому разі основні антигенні детермінанти є складовими компонентами бактеріальних або вірусних часток і мають таку ж конформацію, яку вони набувають у хвороботворному мікроорганізмі. Ізольований антиген часто втрачає вихідну конформацію й викликає лише слабку імунну відповідь.

Інший спосіб одержання непатогенних штамів, придатних для створення на їхній основі живих вакцин, полягає у видаленні з генома патогенних

бактерій хромосомних часток, відповідальних за незалежні життєво важливі функції. При цьому краще делетирувати принаймні дві такі частки, оскільки імовірність їхнього одночасного відновлення дуже мала. Передбачається, що штам з подвійною делецією буде мати обмежену здатність до проліферації й знижену патогенність, але забезпечить вироблення імунної відповіді.

Векторні вакцини. Ще одним напрямом створення живих вакцин є використання вірусу коров'ячої віспи, або вірусу вісповакцини (ВВВ). Геном вірусу повністю *секвенований* (визначена нуклеотидна послідовність). ДНК ВВВ реплікується у цитоплазмі інфікованих клітин завдяки наявності у вірусі генів ДНК-полімерази, РНК-полімерази і ферментів, що забезпечують синтез мРНК. Тому, якщо у геном ВВВ вбудувати чужорідний ген таким чином, щоб він був під контролем ВВВ-промотора, то відбуватиметься його експресія незалежно від регуляторних і ферментних систем господаря. Оскільки геном ВВВ має досить великий розмір, в одну ДНК можна вбудовувати декілька чужорідних генів, однак кожен під контролем окремого ВВВ-промотора, для запобігання рекомбінації між різними ділянками вірусної ДНК. ВВВ використовується для створення так званих *векторних вакцин*, за допомогою яких відбувається доставка і експресія в організмі-господаря генів, що відповідають за вироблення антигенних білків і, як наслідок, синтез захисних антитіл організмом тварини. Перевагами ВВВ є те, що він: 1) має широкий спектр господаря; 2) зберігає життєздатність протягом багатьох років; 3) не володіє онкогенною дією; 4) здатний реплікуватися в клітині-господарі і збільшувати кількість антигена, який активує утворення антитіл і стимулює імунну відповідь організму; 5) здатний вмщувати декілька генів антигенних білків і при цьому його власна вірулентність зменшується ще більше.

1.5. Основні напрями та методи створення трансгенних тварин

Ідея генетичної зміни тварин шляхом введення генів у запліднену яйцеклітину була реалізована у 1980 р. Тварину, генотип якої був змінений за рахунок введення чужорідної ДНК, назвали *трансгенною*, ДНК, що вводиться – *трансгеном*, а весь процес – трансгенною технологією, або *трансгенозом*.

Одним із основних напрямків генної інженерії на першому етапі була зміна спадковості тварин відносно збільшення швидкості росту, підвищення надоїв і поліпшення якості продукції.

В наш час основними напрямками створення трансгенних тварин є:

- тварини стійкі до захворювань;
- тварини з покращеним складом м'яса і молока;
- тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення.

Трансгенні тварини стійкі до захворювань. Резистентність – це спадкова генетично зумовлена сприйнятливність тварин до певних мікроорганізмів, вірусів, шкідників або токсинів. Тому можливо отримати трансгенних тварин з чужорідними генами, які забезпечують несприйнятність цих тварин до певних захворювань. Вторгненню і розмноженню збудників запобігають, головним

чином, імунні механізми і експресія генів, що відповідають за синтез таких речовин, як інтерферони, нейропептиди, гормони і інтерлейкіни.

Досліджується можливість отримання трансгенних тварин, які здатні збільшити вміст лактоферину в тканинах молочної залози з метою підвищення резистентності до маститу.

Значний інтерес представляють дослідження стосовно отримання трансгенних тварин з генами антисмислової РНК (асРНК). Експресія її у клітинах викликає наступну гібридизацію зі смисловою РНК вірусу і, відповідно, інгібування реплікації вірусного геному. Створені трансгенні кролі, кури, велика рогата худоба з геном асРНК проти вірусу лейкозу, стійкі до зараження лейкозом.

Трансгенні тварини з покращеним складом молока. Одна з цілей трансгенезу великої рогатої худоби – зміна вмісту в молоці різних компонентів. Її можна досягнути як кількісно – за рахунок зміни співвідношення компонентів молока, так і якісно – шляхом додавання інших компонентів, які відсутні у складі природного молока, але вони посилюють його поживну цінність. В молоці містяться чотири основні компоненти: жир, білок, лактоза і транспортний компонент.

З економічної точки зору існує інтерес збільшити вміст казеїну в молоці, що поліпшує процеси виробництва сиру. Зменшення кількості лактози в молоці також було б корисно і не лише для людей, які не здатні розщеплювати її із-за недостатнього синтезу ферменту лактази, а й для молочної промисловості, оскільки збільшило б ефективність виробництва сиру. Проблема була вирішена за рахунок створення трансгенних корів, у молочній залозі яких відбувалась експресія лактази, яка гідролізувала лактозу безпосередньо в тканинах вимені.

Трансгенні тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення. Молоко поряд з харчовою цінністю може використовуватися в якості транспортного засобу для інших речовин, які збільшують не лише його поживні, але також і функціональні властивості. Використання молока доцільно тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості і його можна надаювати за необхідністю без шкоди для тварини. Запропоновано новий термін «*біофармінг*», який означає процес отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів. Наприклад, лактоферин, білок молока людини з бактеріостатичними властивостями, який посилює адсорбцію заліза. Він міститься у молоці корів у незначній кількості і його збільшенням можна досягти декілька цілей. Оскільки він покращує адсорбцію заліза, то за його рахунок можна збільшити збереженість нащадків, крім того, він контролює розмноження бактерій.

Синтез молочною залозою лізоциму не тільки здійснює антибактеріальний вплив, але і зменшує імовірність захворювання на мастити, викликає специфічний пасивний імунітет у новонароджених.

Таким чином, внаслідок додаткової секреції білків людини можливо зробити молоко корів більш адекватним для використання людиною. Включення лактоферину, лізоциму і імуноглобулінів людини мають додаткову терапевтичну користь.

Одним з основних етапів в отриманні трансгенних тварин, які продукують гетерогенний білок з молоком, є ідентифікація промотора, що буде спрямовувати експресію у секреторний епітелій молочної залози. В наш час виділені промотори α S1-казеїну, β -казеїну, α -лактоальбуміну, β -лактоглобуліну і сироваткового кислого протеїну (WAP).

Серед рекомбінантних білків, отриманих з молока трансгенних тварин, відомі наступні: білок С людини, який запобігає утворенню тромбів; VIII і IX фактори зсідання крові проти гемофілії; тканинний плазмінно-генний активатор, який використовується для лікування венозних тромбів і емболії легеневої артерії; лактоферин; інтерлейкін-2; альфа-1-антитрипсин для лікування емфіземи легень; моноклональні антитіла для лікування різних форм раку.

Отримані трансгенні вівці з геном хімозину, які продукують з молоком у середньому 200-300 мг ферменту хімозину в 1 л молока. Це джерело отримання хімозину – основного компоненту для виробництва сиру – може замінити традиційний спосіб отримання його з сичугу молочних телят і ягнят, його вартість буде в 5-10 разів меншою.

Трансгенні тварини можуть стати донорами органів і тканин для пересаджування людині. Основна проблема міжвидової трансплантації – це гіпергостре відторгнення. Воно пояснюється тим, що антитіла організму господаря зв'язуються з антигенними детермінантами на поверхні клітин пересаженого органу, виникає гостра запальна реакція і швидка втрата трансплантованого органу.

У природних умовах реакція запалення блокується особливими білками (супресорами). Було припущено, що якщо тварина-донор матиме один або декілька білків людини – інгібіторів запального процесу, то пересаджений орган буде захищений від первинної запальної реакції. Вважають, що на першому етапі ця технологія буде використана для заміни інсулінотерапії у хворих на діабет пересадкою людині тканин острівців Лангерганса, що синтезують інсулін.

Існує декілька методів за допомогою яких трансген вводять у геном тварини.

Використання ретровірусних векторів. Перевага цього методу полягає в його ефективності і відносній простоті виконання. Використання ретровірусів дозволяє вбудовувати в РНК фага зрілу мРНК трансгена без створення на її основі ДНК. Літичний цикл розвитку фага дає можливість отримувати одразу до 100 копій вектора. Однак, існують і певні недоліки при використанні цього методу. Розмір трансгена не повинен перебільшувати 8 т.п.н., а це, у свою чергу, може позбавити його регуляторних послідовностей, які необхідні для експресії. Крім того, незважаючи на те, що ретровірусні вектори створюють так, щоб вони були не здатні до реплікації, може виникнути імовірність подвоєння вірусу в організмі тварини, що заборонено, у випадку використання тварини для їжі, або отримання комерційного продукту.

Метод мікроін'єкції ДНК. Отримання трансгенних тварин шляхом мікроін'єкції гена включає вилучення ембріонів на стадії пронуклеуса хірургічним шляхом або після забою донорів. Для отримання запліднених

яйцеклітин, необхідних для мікроін'єкції, у тварин гормональною обробкою викликають суперовуляцію за схемою визначеною для кожного типу тварин, а потім вилучають яйцеклітини при промиванні яйцепроводів. Для ін'єкції піпетку через прозору оболонку і клітинну мембрану вводять у пронуклеус, після чого додають в нього 1-2 пкл розчину ДНК. Про точність операції свідчить набухання пронуклеусу. Лише візуальне збільшення об'єму ядра вказує, що розчин ДНК дійсно потрапив у пронуклеус. Проведення мікроін'єкцій трансгена при заплідненні *in vitro*, а не лише при отриманні від донорів хірургічним шляхом, або після забою, (ембріонів великої рогатої худоби) зробило цей метод доступним для більшості лабораторій. Однак ефективність методу залишається дуже низькою. Необхідно як найменш 100 вагітностей після пересадки ін'єктованих ембріонів, щоб отримати одну трансгенну тварину, у геномі якої вбудований трансген здатний передаватися спадково нащадкам.

Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин. Клітини, що отримані з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферувати (рости і розвиватися) в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь-які типи клітин, в тому числі і в клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти. Такі клітини називають *тотипотентними ембріональними стовбуровими клітинами (ES)*. *Тотипотентність* – здатність створювати цілий організм з однієї клітини. ES-клітини в культурі легко модифікувати методами генної інженерії без втрати їх тотипотентності. Наприклад, в певний сайт неістотного гена в їх геномі можна вбудовувати функціональний трансген. Потім можна відібрати клітини, що змінилися, культивувати їх і використовувати для отримання трансгенних тварин. Це дозволяє запобігти випадкового уведення, що властиве методу мікроін'єкцій.

Використання сперматозоїдів у якості векторів трансгену. Використання сперматозоїдів у якості носіїв для транс гена, можливо, здатне забезпечити інтродукцію їх у геном зародка у найбільш оптимальний для цього період. Однак, це залежить від місця, в яке потрапляє чужорідна ДНК. Встановлено, що для бугаїв і кнурів здатність до зв'язування трансгена обмежена, головним чином, екваторіальною зоною і постакросомальною ділянкою головки сперматозоїда. Потрапляння чужорідної ДНК у залишки цитоплазми біля основи хвоста не призводить до трансгенезу.

Сперматозоїди мають спонтанну тенденцію до зв'язування трансгена, що присутній у культуральному середовищі. Експерименти показали, що з'єднання чужорідної ДНК і її проникнення в головку сперматозоїда можливе лише в тому випадку, коли сім'яна плазма ретельно відділена.

Недавні дослідження виявили, що перенесення трансгенів за допомогою сперматозоїдів у геном зиготи може здійснюватися не лише в умовах *in vitro*, але і при заплідненні *in vivo*. В цих експериментах відмиті від сім'яної плазми сперматозоїди кнура утримували в культуральному середовищі з плазмідною, яка містила трансген, протягом 30 хвилин, після чого оброблені сперматозоїди центрифугували до об'єму 1 мл і вносили в кожен ріг матки за допомогою

ін'єкції по 0,5 мл трансформованих сперміїв. Відсоток запліднення свиноматок склав 73 (16 свиноматок з 22), і 10 з 48 (21%) поросят виявилися трансгенними.

Використання сперматозоїдів в якості носіїв трансгена при заплідненні *in vivo* значно спрощує технологію отримання трансгенних тварин і може значно збільшити частоту інтеграції чужорідних генів.

Контрольні запитання

1. Що таке кодон?
2. В чому різниця між ДНК і РНК?
3. На підставі чого визначена загальна кількість кодонів?
4. Що таке правило виродження, яке значення воно має для експресії генів?
5. В чому різниця будови генів прокаріот і еукаріот?
6. Яку функцію в процесі експресії генів грає ділянка термінусу?
7. З яких генів складається модель оперона?
8. В чому полягає основна догма молекулярної біології?
9. Які регуляторні елементи процесу транскрипції існують у еукаріот?
10. Які мутанти мають назву конститутівні, мутації в яких генах оператора викликають їх утворення?
11. Що таке регулон, які види регулонів існують?
12. В чому полягає роль атенуаторів і енхансерів, на яких ділянках ДНК вони розміщені?
13. Які молекули мають назву «векторні» і які вимоги до них надаються?
14. Які існують способи отримання генів?
15. Вкажіть основні етапи здійснення ПЛР.
16. Які компоненти необхідні для здійснення ПЛР?
17. Які існують способи створення вакцин?
18. Які вакцини мають назву субодиничні?
19. Що таке атенуйована вакцина?
20. В чому полягає перевага пептидних вакцин?
21. Чому живі вакцини більш ефективні, ніж вбиті?
22. Що таке векторні вакцини? На підставі чого їх створюють?
23. В чому полягає перевага векторних вакцин?
24. Яким чином можливо зменшити побічні ефекти при вакцинації векторними вакцинами?
25. Які тварини називаються трансгенними?
26. Що таке трансгеноз?
27. Які існують способи введення трансгена в організм тварини?
28. Які переваги та недоліки існують при введенні трансгена за допомогою ретровірусів?
29. Чому мікроін'єкція трансгена робиться у чоловічий пронуклеус?
30. Яких тварин називають мозаїками, в чому особливості будови їх геному?
31. Що таке спрямований «нокаут» і для чого його використовують?

32. В чому полягають особливості ембріогенезу овець і як вони впливають на процес трансгенезу?
33. З яких стадій складається процес отримання трансгенних корів?
34. Які дослідження зробили метод мікроін'єкцій для В.Р.Х. більш ефективним і доступним?
35. Які існують особливості внесення трансгена при використанні в якості векторів сперматозоїдів?
36. В чому полягає суть методу створення трансгенних тварин *in vivo* за допомогою сперматозоїдів в якості векторів?
37. Які існують особливості створення трансгенних птахів?
38. Які існують особливості створення трансгенних риб?
39. Що визначає поняття конструкція трансгена для «всіх риб»?
40. Які існують напрямки створення трансгенних тварин?
41. Чому ген гормону росту виявив невисоку ефективність для сільськогосподарських тварин?
42. В яких напрямках змінюють властивості молока?
43. В чому полягає перевага використання трансгенних тварин для виробництва білків людини?
44. Що визначає поняття «біофармінг»?

2. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

Клітинна інженерія – це галузь біотехнології, яка включає питання використання клітин, що культивуються, різні маніпуляції з цими клітинами, а також конструювання нових форм за допомогою гібридизації клітин.

Можна назвати три основні напрямки створення нових технологій на основі використання клітин тваринного походження, що культивуються в культурі.

Перший – отримання промисловим шляхом цінних біологічно-активних речовин, що створюються клітинами, в першу чергу на підставі гібридомних технологій.

Другий – технології, що пов'язані з маніпуляціями з ембріональними клітинами тварин, головним чином, проблеми клонування тварин.

Третій – технології, які пов'язані з генетичними маніпуляціями на тканинах і клітинах.

В наш час, коли існує значна потреба у біологічно активних речовинах, що синтезуються клітинами людини і тварин, дуже цікавим було б отримати ці речовини з клітин відповідних органів, які б вирощувалися у культуральних середовищах. Як правило, здатністю синтезувати специфічний для даного органу або тканини продукт володіють диференційовані клітини. Введення таких клітин у культуру викликає певні труднощі, які пов'язані з їх властивостями.

По-перше, диференційовані клітини при введенні їх в культуру обмежено або зовсім не розмножуються. В тому випадку, коли адаптація нормальних клітин до культивування відбувається, вони втрачають здатність синтезувати специфічний продукт. Клітини, які набули властивості до необмеженого росту в культурі і зберегли функціональні особливості, часто отримують властивість злочисності, що значно обмежує їх практичне використання.

По-друге, для клітинних культур властива обмежена тривалість життя, навіть у тому випадку, коли їх постійно пересаджують на свіже культуральне середовище (після 50-100 подвоювань клітинні культури гинуть). Чим молодше вік джерела, з якого отримані клітини, тим більшу кількість разів вони здатні подвоюватися.

2.1. Поведінка клітин у культурі

Поведінка клітин у культурі характеризується двома основними параметрами: контактним гальмуванням і адгезією.

Контактне гальмування – або регуляція клітинного росту, залежить від кількості клітин на одиниці площі. Максимальна щільність для нормальних клітин – $10^4/\text{см}^2$, для пухлинних клітин – $10^6/\text{см}^2$. Нормальні клітини, що ростуть на поверхні субстрату, створюють моношар, а ріст пухлинних клітин характеризується безладністю у зв'язку з чим утворюється багатошарова структура.

Адгезія, тобто з'єднання клітин між собою і субстратом, що пригнічує

процеси росту клітин, у пухлинних клітин виражена значно менше, ніж у клітин з нормальною програмою розвитку.

Меншу здатність до адгезії і нижчу ступінь контактного гальмування пухлинних клітин, в першу чергу, пов'язують із нерівномірним розташуванням на їх поверхні рецепторів, які реагують на *мітогени* – речовини, що прискорюють подвоєння клітин і *халогени* – речовини, що затримують процес подвоєння. Таким чином, пухлинні клітини зберігають здатність до тривалого розмноження в культурі.

Зміна ростових властивостей клітин, що культивуються, називається трансформацією. Трансформація – процес незворотний і, мабуть, включає генетичні зміни. Зміна ростових властивостей є однією з адаптивних особливостей, що дозволяє клітинам проліферувати в умовах, несприятливих для нетрансформованих клітин. У такий спосіб в умовах, які обмежують ріст нормальних клітин, трансформовані клітини будуть рости до більш високої щільності популяції, що, очевидно, буде пов'язано з їхньою зниженою потребою у факторах росту. Є докази, що основна зміна за трансформації пов'язана зі зміною транспортування поживних речовин через клітинну мембрану, а це, у свою чергу, може зробити клітини менш залежними від геометричних факторів росту.

Трансформовані клітини здатні рости в умовах, в яких геометричні характеристики, а саме, відношення площі поверхні до об'єму, менш сприятливі. Отже, трансформовані клітини будуть рости в суспензійних культурах, утворюючи сферичні клони.

Старіння, безумовно, залежить від генетичних факторів, тому що кожний вид має характерну тривалість життя, але варіабельність усередині популяцій за цим показником свідчить також про вплив фенотипу. За адаптування диплоїдних клітин людини (лінія *WI38*) вже із самого початку було показано, що клітини, які культивуються, можуть виявляти феномен старіння й мають обмежений час життя (50 ± 10 подвоєнь популяції). Залежні від віку зміни, що при цьому спостерігалися, включали подовження міжмітотичних інтервалів ($19 \pm 25\%$ – $31 \pm 41\%$ /год.), зміну метаболізму, рівнів ферментів і експресії продукту. Слід зазначити, що не встановлено чіткого зв'язку між тривалістю життя залежно від походження клітини (миша, людина) і потенціалом подвоєння їх клітин у культурі.

Межа або ліміт Хейфліка (англ. *Hayflick limit*) – межа розподілу соматичних клітин, названа на честь її відкривача Л. Хейфліка. У 1965 році Хейфлік спостерігав, як клітини людини, що подвоюються в клітинній культурі, гинуть приблизно після 50 подвоєнь і проявляють ознаки старіння за наближення до цієї межі.

Такий ліміт був знайдений у культурах усіх цілком диференційованих клітин як людини, так й інших багатоклітинних організмів. Максимальне число подвоєнь залежить від типу клітин і ще більше розрізняється залежно від організму. Для більшості клітин людини межа Хейфліка дорівнює 52 подвоєнням.

Межа Хейфліка пов'язана зі скороченням теломер, ділянок ДНК на

кінцях хромосом. Переважна більшість соматичних клітин не мають активної теломерази, і тому при кожному подвоєнні клітини теломери скорочуються, оскільки ДНК-полімераза не здатна реплікувати кінці молекули ДНК (можливо, теломери інколи скорочуються під впливом деяких інших факторів). Коли після певного числа подвоєнь теломери зникають зовсім, клітина зазвичай стає заблокованою на певній стадії клітинного циклу або запускає програму *апоптозу*, тобто самогубства.

2.2. Гібридизація соматичних клітин

Перспективний шлях зберігання цінних специфічних функцій у клітинних культурах полягає в отриманні гібридних клітин, що утворюються внаслідок злиття нормальних диференційованих і трансформованих (тих, що набули властивості до безобмеженого росту у культурі) клітин.

Основою клітинної інженерії є гібридизація соматичних клітин – злиття нестатевих клітин з утворенням єдиного цілого. Злиття клітин може бути повним або клітина-реципієнт отримує тільки окремі частини клітини-донора.

Зливатися можуть як клітини різного типу, що належать одному й тому самому виду (наприклад, мишачі фібробласти і мишачі лімфобласти), так і клітини тварин різних видів (наприклад, миша/людина, хом'як/курка, комар/людина). В першому випадку, батьківські клітини, що зливаються, розрізняються між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями, а продукти злиття є *внутривидовими гібридами*. В другому випадку створюються *міжвидові гібриди*, що відрізняються від початкових батьківських клітин, в першу чергу, генотипово. Багатоядерні клітини (*полікаріони*), що створилися в наслідок злиття клітин двох різних типів (А і В), можуть бути у трьох комбінаціях – АА, ВВ, АВ. Полікаріони, що містять ядра тільки одного клітинного типу (АА і ВВ), називаються *гомокаріонами*; полікаріони, до складу яких входять ядра обох батьківських типів (АВ), належать до *гетерокаріонів*. Злиття у гетерокаріонах ядер після злиття клітин викликає створення клітинного гібриду – *сінкаріону*.

При потрапленні в організм тварини або людини чужорідного агента – бактерій, вірусів, «чужих» клітин – лімфоцити мобілізуються для знешкодження агента, що був введений. Існує декілька популяцій лімфоцитів, їх функції розрізняються. Продуктом, так званих, Т-лімфоцитів є лімфоцити Т-кіллери («вбивці»), що безпосередньо атакують чужорідний агент з метою його інактивації. Основна функція В-лімфоцитів полягає в створенні імунних білків (імуноглобулінів), що знешкоджують чужорідний агент шляхом зв'язування з його поверхневими ділянками (*антигенними детермінантами*), тобто В-лімфоцити вироблюють імунні білки, які є антитілами до чужорідних агентів – антигенів. Однак, розмноження клітин В-лімфоцитів в культурі не дало позитивних результатів із-за незначної продуктивності клітин та неможливості їх тривалого існування в поживних середовищах. Цю проблему можна вирішити за рахунок злиття В-лімфоцита з пухлинною клітиною імунної системи – *мієломою*. Гібридна клітина, що створюється в результаті –

гібридома – поєднує в собі здатність тривалого розмноження в культурі, як ракова клітина, зі здатністю біосинтезу *моноклональних антитіл – моноатів*, як лімфоцитарна клітина. Моноклональні антитіла однорідні за своїми властивостями, володіють однаковою спорідненістю до антигена і зв'язуються з однією єдиною антигенною детермінантою.

Загальна схема отримання гібридом на основі мієломних клітин і імунних лімфоцитів включає наступні етапи.

1. Отримання мутантних пухлинних клітин, що гинуть при наступній селекції гібридомних клітин. Відбір таких мутантів пухлинних клітин відбувається за допомогою токсичних речовин. У середовищі, що містить ці речовини, здатні існувати тільки мутантні клітини, які позбавлені можливості синтезувати певні ферменти, що необхідні для запасного шляху біосинтезу нуклеотидів.

2. Отримання лімфоцитів – продуцентів антитіл до заданих антигенів. Тварину (мишу, пацюка, кроля) імунізують введенням антигену у черевну порожнину, внутрішньо або підшкірно. Для отримання гібридом людини використовують імунізацію лімфоцитів людини в культурі тканин, що є більш складною і багатоетапною процедурою.

3. Злиття лімфоцитів з пухлинними клітинами. В якості агента, що сприяє злиттю, використовують поліетиленгліколь (ПЕГ), або вірус Сендай, інколи потужне електричне поле.

4. *Скринінг* – тотальний відбір гібридомних клітин. Використовують селективне середовище ГАТ (аббревіатура речовин, що в ньому містяться – гипоксантін, аміноптерін і тимідін). На цьому середовищі батьківські мієломні клітини гинуть, як генетично дефектні за ферментами запасних шляхів біосинтезу нуклеотидів. Батьки-лімфоцити, що не злилися з мієломними клітинами, також гинуть, оскільки вони не здатні рости поза організмом у заданих умовах. Гібридомні клітини поєднують в собі здатність до необмеженого росту і до синтезу нуклеотидів по запасних шляхах і тому накопичуються у культурі.

5. Перевірка здатності гібридомних клітин продукувати моноклональні антитіла до заданого антигену. Для цього використовують метод імуносорбентів, при якому, якщо антитіла, що синтезуються гібридомою, дійсно зв'язують заданий антиген, то добавка до них другого антитіла, що зшито з ферментом, викликає створення комплексної сполуки і початок ферментативної реакції зі зміною кольору розчину.

6. Клонування гібридомних клітин, що пройшли перевірку на утворення моноклональних антитіл, з постійним контролюванням на стабільність їх імунних властивостей.

7. Масове культивування гібридом, виділення, концентрування і очищення синтезованих антитіл.

8. Зберігання моноклональних антитіл. Культуральна рідина з моноклональними антитілами добре зберігається протягом одного року за температури 4°C у присутності 0,1% азиду натрію. Вона може зберігатися

невизначено довго за температури -70°C ; при цьому необхідно запобігати повторного заморожування-відтаювання.

2.3. Лікарські речовини, що пов'язані з моноклональними антитілами

Часто ліки, які використовують при певних захворюваннях, не виявляють необхідну ефективності, що може бути пов'язано з тим, що вони не доходять до органу чи клітини у необхідній концентрації. Для полегшення доставки лікарської речовини до місця дії можна приєднувати її молекули до моноклональних антитіл специфічних по відношенню до певних ділянок поверхні визначених клітин, наприклад, пухлинних.

Для цього потрібно, щоб моноклональне антитіло було в необхідній кількості і достатньо очищене, зв'язувалося з високоспецифічним білком клітини-мішені і за необхідності мало здатність проникати у середину пухлини. У цьому разі доза лікарської речовини, що необхідна для лікування, значно зменшується порівняно з безпосереднім використанням.

Першою стадією отримання гібридних моноклональних антитіл, які містять два різних центри для зв'язку з антигенами, один з яких спрямований до певного антигена, а інший – до ферменту або лікарської речовини, є створення звичайної гібридомі, що синтезує моноклональні антитіла. Цю гібридомі, яка відіграє роль мієломної клітини, зливають з лімфоцитами, отриманими при імунізації мишей іншим антигеном (ферментом або лікарською речовиною). Внаслідок злиття і відбору створюється вторинна гібридома, що здатна синтезувати антитіла подвійної специфічності.

Застосування моноклональних антитіл. Найбільш широко використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Якщо до антитіл приєднати радіоактивні або магнітоактивні матеріали й увести їх у живий організм, то можна виявити в ньому патологічні зони. Такі моноати приєднуються до уражених хворобою клітин організму, а відповідні індикаторні матеріали дозволяють з'ясувати їхнє місцезнаходження.

Моноати використовуються й у процесах очищення речовин. Сучасні технології засновані на приєднанні антитіл до твердої матриці носія. До них додають суміш молекул, що містить антиген, який шукають. Потім комплекси антиген-антитіло відмиваються від домішок, не пов'язаних з матрицею. Після руйнування ковалентних зв'язків антиген-антитіло в розчині залишаються вільні антигени.

Якщо отримати антитіла певного типу й імунізувати ними тварину, то утворюються анти-антитіла (анти-ідіотипні антитіла). Вони діють на імунну систему як псевдоантиген і тому можуть бути використані для її стимуляції. На цьому принципі засновано одержання вакцин нового типу. Набори моноатів можуть бути також призначені для боротьби з алергенами.

Моноклональні антитіла застосовуються у медичній терапії для знайдення «мішені». Припускається, що різні ракові захворювання обумовлені активацією ендогенних генів, які викликані хімічними агентами, внутрішніми

хромосомними перебудовами. Ці гени кодують певні білки, і тому ракові клітини можуть містити унікальні білки на поверхні клітин. Можливо, саме ці білки беруть участь у супресії росту здорових клітин. Інактивуючи ці білки, можна гальмувати ріст ракових клітин.

Завдяки високій специфічності моноанти широко використовуються як зонди для точного визначення природи молекул поверхні клітин і клітинних органел. З їхньою допомогою також можна проводити детекцію активності ферментів.

Метод молекулярної гібридизації (ММГ) – заснований на принципі взаємодії вірусних геномів з комплементарними до них ділянками ДНК, які помічені радіоізотопами або ферментами, чи фарбами. Для визначення структури вірусних геномів використовують моноанти. Певне антитіло здатне зв'язуватися з певною антигенною детермінантою або певною речовиною, що синтезує вірус. Знаючи структуру антитіла можна з'ясувати структуру антигена і на підставі цього визначити ділянку гена, що відповідає за синтез антигена. Ділянку ДНК гена, що було визначено, можливо синтезувати або виділити з генома вірусу і використовувати для проведення досліджень.

Контрольні запитання

1. Вкажіть показники, які характеризують поведінку клітин у культурі.
2. В чому полягає різниця між трансформованими та диференційованими клітинами?
3. Якими властивостями клітинного розвитку пояснюють ліміт Хейфліка?
4. Які види гібридних клітин створюються при злитті двох або більш різнорідних клітин?
5. З яких етапів складається схема утворення сінкаріонів?
6. Створення гібридом. Які клітини при цьому використовуються?
7. Вкажіть особливості процесу створення моноклональних антитіл.
8. Які існують способи культивування гібридом?
9. З яких етапів складається схема отримання гібридом?
10. Як здійснюється скринінг гібридомних клітин?
11. Вкажіть напрями використання моноклональних антитіл.
12. Вкажіть недоліки, що здатні моноклональним антитілам.
13. Яким чином моноклональні антитіла використовують у медицині?
14. В чому полягає перевага застосування моноклональних антитіл зв'язаних з лікарськими речовинами?
15. На чому заснований метод молекулярної гібридизації (ММГ)?

3. ЕМБРІОІНЖЕНЕРІЯ

Розробка методу штучного запліднення сільськогосподарських тварин і його практичне застосування забезпечили великий успіх в області поліпшення генетики тварин. Використання цього методу в сполученні з тривалим збереженням сперми в замороженому стані відкрило можливість одержання десятків тисяч нащадків від одного бугая-поліпшувача в рік. Цей прийом, власне кажучи, вирішує проблему раціонального використання поліпшувачів у практиці тваринництва.

Що стосується самок, то традиційні методи розведення тварин дозволяють одержувати від них лише декілька нащадків за все життя. Низький рівень відтворення у самок і тривалий інтервал часу між поколіннями (6-7 років у великої рогатої худоби) обмежують генетичний прогрес у тваринництві. Рішення цієї проблеми вчені бачать у застосуванні трансплантації ембріонів. Суть методу полягає в тому, що генетично видатні самки звільняються від необхідності виношування плоду і вигодовування потомства. Крім того, їх стимулюють з метою збільшення виходу яйцеклітин, що потім вилучають на стадії ранніх зародків і пересаджують менш цінним у генетичному відношенні реципієнтам.

3.1. Основні етапи проведення трансплантації ембріонів

Основні етапи проведення трансплантації ембріонів з метою одержання якнайбільше нащадків від однієї тварини такі: підбір донорів статевих клітин; підбір реципієнтів; суперовуляція; осіменіння; вилучення і оцінка ембріонів; культивування та зберігання ембріонів; пересадка ембріонів реципієнтам.

Відбір донорів – це цілеспрямований вибір корів, які характеризуються високими показниками молочної продуктивності. При підборі донорів враховують не лише власну продуктивність, а й оцінку за походженням, віддаленими родичами. Основні вимоги до корів-донорів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Мінімальні вимоги до корів-донорів

Показник	Значення ознаки
Надій за стандартну лактацію, кг	6000 і більше, або на 50-60% вище стандарту породи
Жирномолочність, %	3,9 і більше
Індекс осіменіння в групі корів-донорів	Не більше 1,5
Сухостійний період, днів	Не більше 85-90
Вік корів, роки	Від 3 до 8
Бонітувальний клас	Еліта-рекорд

Додатково враховують стан статевих органів і вибраковуюють корів з порушеними статевими циклами, кістою яєчників. Враховують також реакцію на декілька гормональних обробок.

Найважливішим критерієм при відборі є висока племінна цінність тварини. Оцінний критерій для корів молочних порід – 7-12 тис. кг молока в рік жирністю 3,6-4,3%.

Оцінка корів-донорів за власною продуктивністю охоплює 2 лактації, що підвищує ступінь її надійності. Крім того, враховують результати оцінки за продуктивністю батька і матері донора.

Відбір донорів-матерів майбутніх бугаїв проводять ще більш ретельно. Крім рівня молочної продуктивності і жирномолочності, використовують ряд додаткових ознак: властивості молоковіддачі, форму вимені і сосків, спадкоємну схильність до маститу, вміст білка в молоці, показники відтворної функції за кілька отелень, міцність кістяка і копит.

Тварини, визнані донорами, повинні бути здоровими, мати середню або заводську вгодованість і непорушений обмін речовин, нормальний статевий цикл. Ретельними клініко-гінекологічними дослідженнями у них виключають патологічні процеси в репродуктивних органах (ендометрит і ін.), а також структурні зміни на основі перенесених хвороб. Ідеальний вік корів для включення в групу донорів – 4-5 років. По досягненні 8-річного віку суперовуляторна відповідь на обробку гонадотропінами починає знижуватися.

На суперовуляцію корів-донорів звичайно ставлять не раніше 60 днів після отелення. Ембріони від них одержують 2-3 рази, з перервою в 45 днів, після чого повертають у стадо для природного відтворення. Максимально можливе число суперовуляцій – 8.

Щодо вибору тварин, яким трансплантують ембріони, одержані від донорів, як *реципієнтів* використовують гінекологічно здорових корів після двох-трьох нормальних статевих циклів. При цьому їх племінні й породні якості вирішального значення не мають. Але у реципієнтів низької вгодованості, які не були запліднені у перше осіменіння, ембріони можуть погано приживлятися. Більшість спеціалістів вважають, що кращими реципієнтами є повновікові телиці з високими племінними кондиціями. Це пояснюють тим, що групове утримання телиць значно простіше порівняно з індивідуальним утриманням корів, і у телиць, на відміну від корів багатократна синхронізація статевого циклу за допомогою простагландинів не викликає труднощів. У середньому для одного донора відбирають 5-6 реципієнтів, тому що при вилученні отримують 6-7 ембріонів. Як правило, це телиці 16-18-місячного віку живою масою 360-380 кг. За три тижні до пересадження ембріонів реципієнтів переводять на поліпшену годівлю з вільним доступом до сіна. До початку гормональної обробки у донорів і реципієнтів визначають наявність і тривалість статевих циклів.

Способи синхронізації статевої охоти і овуляції у тварин засновані на двох підходах.

Перший підхід заснований на видаленні або припиненні функції жовтого тіла. Внаслідок цього всі тварини відповідної групи входять у фолікулярну фазу

статевого циклу в один тої самий час і таким чином в них одночасно настає стан охоти. Для здійснення цього поширено використовується так званий лютеолітичний фактор простагландин $F_{2\alpha}$ (ПГФ-2 α).

Другий підхід до синхронізації охоти заснований на гальмуванні розвитку фолікулів у період штучного подовження лютеїнової фази циклу до такої тривалості, доки не відбудеться регресія жовтого тіла у всіх оброблених тварин. Припинення впливу затримуючого фармакологічного агента супроводжується ростом і розвитком фолікулів у всіх тварин і приводить їх одночасно у фолікулярну фазу циклу з наступним синхронним проявом охоти і овуляції. Більшість способів синхронізації охоти, заснованих на цьому підході, базується на використанні прогестерону або його синтетичних аналогів – прогестагенів. Уведення останніх протягом декількох днів забезпечує прояв статевої охоти одночасно у всіх тварин незалежно від того, в якій фазі циклу вони знаходилися на початку обробки.

Для *штучного осіменіння* корів-донорів використовують тільки сперму від видатних бугаїв-плідників, оцінених за якістю нащадків, дочка яких на 1,5-2,0% перевищують за продуктивністю середню популяції. Запліднювальна здатність сперми таких бугаїв повинна бути не менше 70% при високій точності її оцінки. Осіменяють корів-донорів подвійною порцією сперми.

День, коли корову-донора штучно осіменяли, називають датою запліднення. У біотехнології його називають день-нуль і від нього починають підрахунок розвитку ембріона *in vivo* до його вимивання.

Можливі три способи *вилучення ембріонів* – після забою корови-донора, хірургічним і не хірургічним шляхом. При першому способі враховують час, який минув від запліднення тварини. Відомо, що яйцеклітини корови через три доби на четверту переходять із яйцепроводів у роги матки. Тому, якщо зиготи вимивають через три доби, то достатньо промити живильним середовищем яйцепроводи, де знаходяться ембріони. Якщо вилучати їх у пізніші строки, то ембріони будуть перебувати у рогах матки, що потребує значної кількості живильного середовища. Зазначений спосіб майже не застосовують, оскільки він призводить до загибелі генетично цінних тварин.

Хірургічний спосіб полягає в лапаротомії по білій лінії черева з використанням загальної анестезії. Ембріони вилучають, вимиваючи їх з матки. Нині цим способом користуються з науковою метою для одержання та пересадки ембріонів на дуже ранніх стадіях розвитку.

Вилучення ембріонів нехірургічним шляхом – найбільш поширений у практиці спосіб. Основна його перевага – це простота виконання. Ембріони вилучають переважно на 7-8-й день після осіменіння донора. Нині сконструйовані спеціальні прилади та обладнання для проведення цієї роботи.

Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для трансплантації. Тому їх необхідно *оцінити* за деякими морфологічними ознаками. За життєздатністю ембріони ділять на п'ять категорій (за даними Шульган І. З. та Шаловило С. Г.):

I – відмінні, ідеальні, відповідають дню вимивання, однорідні, округлої форми з непошкодженою прозорою оболонкою, чіткими, однаковими за величиною бластомерами;

II – добрі, у яких декілька клітин відокремлені від загальної маси, бластомери не однакові за величиною, розміщені щільно й несиметрично;

III – задовільні, неоднорідні, в перивітеліновому просторі можуть бути включення (відокремлені клітини), бластомери частково ущільнені;

IV – незадовільні, що мають зону пелюциду не округлої форми, наявність дегенерованих клітин, порушення зв'язку між бластомерами – ущільнення й зморщення бластомерів;

V – дегенеровані, які не відповідають стадії розвитку ембріона. На 7-й день мають 8 бластомерів, спостерігається дефект прозорої оболонки, значне ущільнення бластомерів.

Для пересадки використовують в основному ембріони I-IV категорій.

На сучасному рівні техніки трансплантації рекомендують *пересаджувати ембріони* одразу після вилучення їх з рогів матки донора й оцінки. При цьому також використовують методи хірургічної і нехірургічної пересадок.

Ефективність пересадки ембріонів у значній мірі визначається синхронністю прояву охоти донора і реципієнта. У великої рогатої худоби максимальне число вагітностей одержують після синхронного пересадження.

Введення ембріонів в обидва роги матки забезпечує високу ефективність пересадження. Цей прийом успішно використовують для одержання двійнят. Процедура одержання двійнят включає пересадження 7-денних ембріонів заплідненій тварині в ріг, протилежний яєчнику з жовтим тілом, але цінність цього методу знижується через виникнення клітинного химеризму при різностатевих двійнятах, що в окремих випадках може призвести до фримартинізму – стерильності самок, які розвиваються у парі з бичком.

3.2. Кріоконсервація ембріонів

Застосування методу трансплантації ембріонів зажадало розробки ефективних методів їх збереження в період між вилученням і пересадженням. Виживання ембріонів деякою мірою може бути збільшено охолодженням їх нижче температури тіла. Зменшення температури зберігання ембріонів від 37°C до 10° і 0°C пригнічує або зупиняє їх розвиток, але обмінні процеси протікають на рівні, що забезпечує збереження до 5-6 діб. Для тривалого збереження ембріонів необхідно не тільки загальмувати їх розвиток, але і значно знизити або цілком зупинити обмінні процеси. Такий стан ембріонів досягається при температурі -195°C або нижче.

Але при заморожуванні ембріонів нижче 0° С в них можуть виникати наступні пошкодження:

- створюватися кришталіки льоду;
- зникати вода;
- збільшуватися концентрація розчинених речовин у клітині (тобто осмотичний шок).

При дуже повільному заморожуванні кристалі льоду не утворюються, але спостерігається зневоджування клітини, швидке заморожування, навпаки, викликає утворення кристалів. Для вирішення цієї проблеми використовують кріопротектори, які поділяють на дві групи:

- внутрішні – це ті, що вводять всередину клітини для запобігання створення льоду. В якості таких кріопротекторів використовують диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь, етанол та ін.

- зовнішні кріопротектори нездатні потрапляти всередину ембріона, але вони запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє всередину клітини, а внутрішній кріопротектор виходить назовні повільно, що викликає набухання і пошкодження ембріона. Завдяки дії зовнішніх кріопротекторів надходження води в ембріон уповільнюється, а вихід внутрішнього кріопротектора прискорюється, що запобігає виникненню осмотичного шоку. В якості зовнішніх кріопротекторів використовують полівінілпіролідон (ПВП), а в основному розчин сахарози.

3.3. Монозиготні близнюки

Темпи селекційного прогресу сільськогосподарських тварин значною мірою гальмують низькі темпи розмноження. Тому одержання від однієї особини великої кількості нащадків сприяє завданням селекціонера по створенню високопродуктивних стад тварин. Але запроваджуючи трансплантацію ембріонів, слід пам'ятати, що при цьому одержують не ідентичних донору тварин. Це пов'язано з рекомбінаційною мінливістю, яка виникає в процесі перекомбінації спадкового матеріалу батьків. Тому створені у період відбору й підбору унікальні генотипи в наступних поколіннях можуть не відтворюватися.

Тому назріло питання одержання генетично подібних тварин, тобто особин з ідентичним генотипом. Як відомо, до них належать однойцеві близнюки, що є цінними об'єктами для генетичних досліджень. Всі онтогенетичні зміни, які відбуваються з ними, та реалізований рівень продуктивності будуть залежати лише від умов середовища.

Але частота народження близнят досить низька. Наприклад, корови народжують близнят один раз на 500-2000 отелень. Тому розраховувати на ініціацію спонтанного отримання двійнят або трійнят досить складно, а селекція на багатоплідність неефективна через низький рівень успадкування. Враховуючи ці обставини, спробували розділити ранні ембріони на окремі бластомери і пересадити їх реципієнтам. Частина з них можна зберігати в умовах глибокого заморожування. Це дає можливість нагромаджувати частини ембріонів, які потім, за результатами продуктивності їх генетичних аналогів, що трансплантувалися реципієнтам, відбирати та проводити клонування найбільш цінних особин. Таким же чином можна зберігати генофонд деяких порід та видів тварин.

У практиці використовують два способи розділення ембріонів – перев'язуванням і розрізанням. У першому випадку зародки відбирають за

допомогою мікроманіпулятора, не порушуючи прозорої оболонки, потім перев'язують їх синтетичною ниткою діаметром 15 мкм посередині. Розділені половини окремо дробляться, утворюючи зародки. Ембріони також розрізують ножом навпіл або на більшу кількість частин.

Розділення зародків проводиться на предметному склі в краплі середовища Дюльбекко скляною мікроголкою діаметром 10-15 мкм. Мікроголка виконує при цьому дві функції: розділення ембріона на частини і його фіксацію, що усуває необхідність застосування мікроприсоски.

Розділення ембріонів мікроголкою, на відміну від мікроскальпеля, дає змогу одержувати частини зародків із найменшою кількістю пошкоджень. Це зумовлено тим, що голка не має гострих та ріжучих сторін і під час розділення зародка на частини вона лише розриває зв'язки між бластомерами, а не розрізає їх як лезо.

Після розділення ембріона на дві частини одержані половинки переносили в термостат і культивували протягом 3-х год. Якщо за цей час половинки зародків компактизувалися (набували кулько подібну форму), їх пересажували реципієнтам без попереднього поміщення в зону пелюциду.

Нещодавно розроблений новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що розширюється, (поблизу від внутрішньої клітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася. Таким методом вже отримані дві пари монозиготних телят-близнюків. Як відзначають автори, даний спосіб, на відміну від звичайного, приводить до дуже малих клітинних витрат при поділі.

3.4. Запліднення *in vitro*

Запліднення *in vitro* дозрілих у культуральному середовищі ооцитів, виділених з яєчників забитих тварин, є ефективним способом одержання ембріонів великої рогатої худоби. Вдосконалювання методів культивування ооцитів і ранніх ембріонів, запліднення *in vitro* дозволило досягти прогресу в одержанні телят з ембріонів, отриманих *in vitro*. Отримані поза організмом бластоцисти великої рогатої худоби можна кріоконсервувати. Пересадження таких ембріонів після розморожування дозволяє одержати телят.

Прикладне значення методів дозрівання і запліднення ооцитів *in vitro* полягає в одержанні додаткової кількості дешевих ембріонів, насамперед, у одноплідних тварин. Ці методи дозволяють, по-перше, одержати ембріони від високоцінних донорів, що не реагують або слабо реагують на гормональну обробку, по-друге, використовувати генетичний потенціал видатних за племінними і продуктивними якостями тварин після їх вибракування за віком або по інших причинах, по-третє, збільшити поголів'я нащадків, наприклад, шляхом підсаження отриманих поза організмом морул і бластоцист низькопродуктивним реципієнтам, зокрема, для виробництва дешевої яловичини.

Запліднення яйцеклітин ссавців *in vitro* включає наступні основні етапи: дозрівання ооцитів, капацитацію сперматозоїдів, запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку ембріонів.

Хоча більшість ооцитів, витягнутих з фолікулів яєчників, відновляють мейоз і досягають метафази II, їх запліднення часто не забезпечує повноцінного розвитку зародків. Припускають, що основною причиною цього є неповноцінне дозрівання ооцитів.

Однією з причин може бути те, що при дозріванні ооцита *in vitro* у цитоплазмі не виробляється в достатній мірі фактор, що контролює формування і розвиток чоловічого пронуклеуса. Вважають, що для появи в цитоплазмі ооцита фактора, що викликає дозрівання чоловічого пронуклеуса, необхідно забезпечити індуктивний вплив нормального оточення ооцита у фолікулі протягом не менше 6 годин після початку мейотичного дозрівання.

Це було підтверджено в досліджах по заплідненню *in vitro* ооцитів свиней, вилучених з фолікулів на різних стадіях мейозу. Встановлено, що стероїдні гормони не потрібні для запуску мейозу у ссавців, але необхідні для повного фізіологічного дозрівання ооцита.

Важливим етапом у розробці методу запліднення ссавців було відкриття явища капацитації сперміїв.

Грунтуючись на спостереженнях по вивченню проникнення сперміїв в яйцеклітини пацюка в різний термін після спарювання Аустин ввів термін *капацитація*. Він означає, що у спермії повинні відбутися деякі фізіологічні зміни до того, як сперматозоїд набуде здатність до запліднення.

Капацитація включає початкову зміну мембрани спермія, що дозволяє йому пройти другу фазу (акросомну реакцію). У даний час першу фазу позначають як власне капацитацію, а другу – як акросомну реакцію.

Розроблено кілька методів капацитації еякуйованих сперміїв домашніх тварин. Для видалення білків з поверхні сперміїв, які, очевидно, гальмують капацитацію сперміїв, було використано середовище з високою іонною силою.

На підставі дослідів по заплідненню *in vitro* вважають, що найбільш ефективним способом видалення сім'яної плазми і розріджувача сперми у бугаїв є центрифугування, режими якого можуть бути різними. Для звільнення від плазми і розріджувача також застосовують метод *swim-up*, що полягає у спливанні сперматозоїдів з активним поступальним рухом із дна пробірки в поверхневий шар чистого середовища, це дозволяє відбирати найбільш життєздатні гамети. Іншим ефективним методом добору сперматозоїдів бугаїв з високою рухливістю для запліднення *in vitro* є їх розподіл по градієнтах концентрації у перколі.

Ефективним способом прискорення капацитації сперматозоїдів бугаїв є їх обробка розчином з високою іонною силою (380-390 мОсм/кг), що характеризується підвищеною концентрацією хлориду натрію. Після обробки сперміїв середовищем з високою іонною силою їх відмивають від цього середовища центрифугуванням і інкубують протягом деякого часу в ізотонічному середовищі для «докапацитації».

Капацитацію сперматозоїдів бугаїв можна індукувати за допомогою фолікулярної рідини корови, теплова обробка фолікулярною рідиною при 56°C дозволяє запобігти згортанню її білків і, також, уникнути злипання чоловічих гамет.

На ефективність капацитації сперматозоїдів і запліднення яйцеклітин *in vitro* впливає також рН середовища. У свиней і овець зареєстрований найвищий відсоток пенетрації при капацитації сперматозоїдів кнурів у середовищі з рН 7,8 з наступним заплідненням ооцитів у середовищі з рН 7,4. Для великої рогатої худоби – навпаки, рН середовища 7,4 є оптимальним для капацитації сперматозоїдів, а рН 7,8 – для запліднення ооцитів.

При проведенні дослідів по заплідненню *in vitro* велике значення має концентрація сперматозоїдів під час запліднення. Запліднюваність *in vitro* яйцеклітин тварин залежить також від тривалості спільної інкубації зі сперматозоїдами – найвищий відсоток дроблення був отриманий після 24-годинного запліднення.

Значний інтерес представляють дослідження з пошуку нових технологій одержання ембріонів *in vitro*.

Пенетрація яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них сперматозоїдів за допомогою заточеної мікропіпетки. Як показали експерименти на кроликах, такі яйцеклітини можуть нормально розвиватися *in vitro* до стадії бластоцисти, а пересаджування їх реципієнтам приводить до народження нащадків. Основною проблемою при цьому є загибель багатьох яйцеклітин через ушкодження в процесі мікроін'єкції. Однак цей спосіб запліднення жіночих гамет, при якому капацитація й акросомна реакція сперматозоїдів не є необхідними, має ту перевагу, що дозволяє використовувати для запліднення не тільки нормальні, але і нерухливі, мертві, дефектні сперматозоїди або їх голівки. Була здійснена успішна спроба запліднення *in vitro* ооцитів корів шляхом ін'єкції в їх цитоплазму сперматозоїдів (по одному в кожену яйцеклітину), що вважалися біологічно мертвими внаслідок втрати рухової активності після заморожування-відтаювання. У результаті трансплантації морул і бластоцист, отриманих *in vitro* із запліднених цим методом яйцеклітин, були отримані телята.

Є також методи мікрomanipуляцій з дозрілими ооцитами тварин, які засновані на порушенні цілісності їх прозорої оболонки з наступним перенесенням жіночих гамет у суспензію капацитованих сперматозоїдів. Вони полягають в проколюванні (або просвердлюванні) прозорої оболонки або її механічному «частковому розсіченні» (*partial zona dissection — PZD, або ЧРО*). Проколювання оболонки здійснюють за допомогою мікроголки, просвердлювання – під впливом кислого розчину (наприклад, розчину Тироде, рН 2-3), що виділяється з кінчика мікропіпетки.

Проколювання прозорої оболонки ооцитів миші, що овульовали, дозволяє перебороти *in vitro* нездатність сперматозоїдів мишей деяких генотипів до запліднення.

Метод часткового розсічення прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів може бути використаний для подолання незапліднюваності яйцеклітин.

Так, в результаті розсічення мікроголкою невеликої ділянки прозорої оболонки зрілих ооцитів одноденного віку людини, що не запліднилися при першому заплідненні *in vitro*, біля половини яйцеклітин (45%) формували чоловічий і жіночий пронуклеуси після повторного запліднення, але при цьому 23% зигот були поліспермними. Кількість партеногенетичних яйцеклітин, що розвивалися, була незначною – 3,4%.

ЧРО значно підвищує запліднюваність яйцеклітин спермою зі зниженою концентрацією життєздатних чоловічих гамет, а також зі зниженою рухливістю і виживаністю сперматозоїдів,

Численні експерименти показали, що культивування ембріонів великої рогатої худоби в культуральних середовищах, як правило, приводить до зупинки дроблення ембріонів на 8-16-клітинній стадії їх розвитку. Спроби вдосконалювання середовищ і методики культивування ранніх ембріонів, починаючи з одноклітинної стадії, не привели до рішення цієї проблеми – лише одиничні ембріони розвивалися до морули і бластоцисти, тобто стадій, при досягненні яких ембріони можуть бути пересажені реципієнтам нехірургічним способом. Другим критичним етапом у розвитку ембріонів великої рогатої худоби є перехід від морули до бластоцисти.

Подолання блокування дроблення можливо шляхом пересадження ембріонів у яйцепровід проміжного реципієнта. Як проміжних реципієнтів, що забезпечують розвиток ранніх ембріонів великої рогатої худоби *in vivo* до морули-бластоцисти, використовують кролиць. До недоліків цього способу, що обмежують його масове застосування, відносяться не лише використання в дослідах живих реципієнтів і необхідність проведення хірургічної трансплантації, але і можливі втрати ембріонів при їхньому вилученні з реципієнтів.

Імовірно, ефективним способом розвитку ембріонів сільськогосподарських тварин може стати їх культивування в ізольованих яйцепроводах.

3.5. Регулювання статі тварин

Генетичний механізм визначення статі забезпечує розподіл нащадків за статтю у співвідношенні 1 : 1. Популяція чоловічих гамет має гетерогенність (XY), а жіночих – гомогенність (XX). На підставі цього можуть бути розроблені методи розділення сперми самців на гамети, що містять X- і Y-хромосоми і, таким чином, з'явиться можливість штучно регулювати співвідношення статі у сільськогосподарських тварин. В цьому випадку запліднення яйцеклітин сперматозоїдами з X-хромосомами викликає появу самок, а сперматозоїдами з Y-хромосомами – самців.

Диморфізм сперміїв самців, що містять різні статеві хромосоми, полягає в тому, що спермії з Y-хромосомами мають меншу масу і величину. У ссавців розміри X-хромосоми звичайно більші порівняно з розмірами Y-хромосоми. Так, середній розмір X-хромосоми великої рогатої худоби складає 6,17 мкм, а у Y-хромосоми – 2,22 мкм. На підставі цього були розроблені різні методи:

центрифугування, седиментації (осадження), електрофорезу, фільтрації, цитофлуорометрії, імунологічні та ін.

З розвитком методів трансплантації і клонування ембріонів все більшого значення набуває *попередній відбір ембріонів за статтю* і особливостями каріотипу. Впровадження методу визначення статі ембріонів перед їх трансплантацією дозволить цілеспрямовано одержувати бугаїв-трансплантантів для племпідприємств, успішніше вирішувати ряд інших практичних питань у тваринництві. Наприклад, для розширеного відтворення стада у товарних господарствах, що спеціалізуються по виробництву молока, бажано одержувати теличок, а в товарних господарствах, що спеціалізуються по виробництву яловичини – бичків. Впровадження методів ідентифікації статі в доімплантаційних ембріонів дозволить уникнути одержання безплідних теличок-фримартинів при трансплантації реципієнтові двох ембріонів.

З цією метою використовують методи визначення каріотипу зародка (наявність X і Y хромосом) або імуногенетичне визначення наявності спеціальних H-Y антигенів, які містяться в зародках чоловічої статі.

Перші ознаки диференціації статі у ссавців виявляються в ембріогенезі дуже рано. Такою ознакою є статевий хроматин, або тільце Барра. Статевий хроматин можна виявити в інтерфазних ядрах клітин, в яких тільце Барра міститься у вигляді забарвленого дисковидного тільця. Тільце Барра, як правило, (60-70%) міститься в ядрах клітин тварин жіночої статі. Його нема або небагато, лише в окремих ядрах (5-10%), у тварин чоловічої статі. Тому тільце Барра має назву жіночий статевий хроматин.

Необхідно відмітити, що у всіх видів ссавців утворення статевого хроматину суттєво випереджає диференціювання гонад. Тому статевий хроматин може бути раннім маркером статі, хоча він не має відношення до детермінації і диференціації статі.

Другою ознакою статі, яка рано з'являється в ембріогенезі, є H-Y-антиген, здатний викликати в організмі імунну реакцію. Була встановлена унікальна консервативність цього гену. Оскільки диференціація сім'яників в ембріогенезі відбувається раніше, ніж диференціація яєчників, а саме процес диференціації здійснюється під впливом H-Y-антигена, це визначає, що антиген спрямовує морфогенез сім'яників і визначає первинну стать. Якщо видалити H-Y-антиген, гонадні клітини XY починають морфогенез яєчників. H-Y-антиген впливає і на статеві ознаки теличок із різностатевих двоен. Якщо від корів отримують різностатевих двійнят, то в середньому 90% теличок залишаються стерильними. Це пояснюється тим, що H-Y-антиген переміщується від близнюка-бугая по загальному кровоносному руслу, зв'язується з рецепторами клітин яєчника і тоді статеві залози у теличок складаються в значній мірі з сім'яникової тканини і в меншій – з оваріальної. Народжуються так звані телички-фримартини.

Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією H-Y-антигена за допомогою антитіл до нього. Виявлення зв'язування антитіл до H-Y-антигена з чоловічими ембріонами здійснюється двома методами.

- характерною рисою першого, більш простого методу, є

культивування клітин ембріонів у середовищі з комплементом, що приводить до лізису клітин ембріонів чоловічої статі.

- більш практичним є другий метод, що не ушкоджує ембріони, сутність якого полягає в одержанні і використанні вторинних флуоресцентних антитіл до антигена НУ. Ефективність цього методу стосовно до ембріонів великої рогатої худоби складає 85-87% .

Перспективним підходом до ранньої діагностики статі ембріонів великої рогатої худоби є створення специфічного для ДНК Y-хромосоми молекулярного зонда.

Становить інтерес визначення статі ембріонів великої рогатої худоби шляхом культивування *in vitro* 2-5 клітин компактизованих ембріонів. Цей метод заснований на тому, що при додаванні в спеціальне середовище, клітини ембріонів чоловічої статі, на відміну від ембріонів жіночої статі, добре розмножуються, що дозволяє вже через 3 години після початку аналізу зробити висновок про стать ембріона. Ефективність цього методу складає 90-95%.

Був розроблений ефективний спосіб відбору ембріонів великої рогатої худоби за статтю перед їх трансплантацією із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що забезпечує ампліфікацію специфічних повторюваних послідовностей ДНК Y-хромосоми (потім ДНК піддають електрофорезу в 2%-м агарозному гелі, що фарбують бромистим етидієм і досліджують під ультрафіолетовим світлом). ПЛР дозволяє по єдиному бластомеру, взятому шляхом біопсії, встановити стать доімплантаційного ембріона з дуже високою точністю (95,4%) за відносно короткий час.

Контрольні запитання

1. Основні етапи трансплантації ембріонів
2. Вимоги до корів-донорів ембріонів
3. Вимоги до корів реципієнтів ембріонів
4. Препарати, за допомогою яких викликають суперовуляцію
5. Способи вилучення ембріонів
6. Показники, за якими здійснюють оцінку життєздатності вилучених ембріонів
7. Методи пересадки ембріонів
8. Способи зберігання ембріонів
9. Види кріопротекторів, їх значення
10. Перспективи використання монозиготних близнюків
11. Способи створення монозиготних близнюків
12. Шляхи дозрівання ооцитів *in vitro*
13. Способи капацитації сперматозоїдів
14. Методи запліднення яйцеклітин *in vitro*
15. На підставі чого розроблені методи розподілу чоловічих гамет за статтю?
16. Методи визначення статі ранніх ембріонів

4. КЛОНУВАННЯ ТВАРИН

Суть клонування полягає у принципово новому методі відтворення тварин, коли ембріон утворюється не шляхом запліднення жіночої статеві клітини чоловічою, а в результаті пересадки ядра з диплоїдним набором хромосом у яйцеклітину, з якої вилучено власний генетичний матеріал.

Такий спосіб утворення організмів принципово відрізняється від усіх існуючих у природі, оскільки формування генотипу тварин відбувається не шляхом спонтанного комбінування генів гаплоїдних жіночої і чоловічої статевих клітин під час запліднення, а шляхом активізації вже сформованого набору хромосом диплоїдної клітини. Це дозволяє створювати великі групи (клони) генетично ідентичних особин, коли донором генетичного матеріалу є популяція ембріональних клітин з одного зародка, або навіть одержувати генетичні копії існуючих тварин, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму.

4.1. Ембріональне клонування

В залежності від типу клітин-донорів генетичного матеріалу можна умовно виділити декілька типів клонування. Якщо донорами ядер є ранні зародки, то ми маємо так зване *ембріональне клонування*. До ембріонального клонування можна віднести і таке, коли донорами ядер є ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), але цей тип відрізняється від першого можливістю маніпулювати з великою кількістю клітин, які, крім того, можна розмножувати шляхом культивування поза організмом.

Клонування ембріонів шляхом пересадження ядра включає три основних етапи: отримання клітин-реципієнтів, виділення інтактного ядра донора, пересадження ядра в енуклеювану яйцеклітину. На відміну від амфібій, пересадження ядра у ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібний четвертий етап – активація ооцита і злиття мембран яйця й ооцита. Під дією електричного імпульсу відбувається активація ооцита і злиття мембран між ядром клітини донора і енуклеюваним ооцитом-реципієнтом. Технологія пересадження ядер клітини сприяла успішному одержанню клонованих живих кроликів, мишей, овець, кіз, великої рогатої худоби і свиней.

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. У якості клітин-реципієнтів використовують або зрілі ооцити на стадії метафази II, тобто яйцеклітини, або зиготи. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*. Вибір клітин-реципієнтів є досить суттєвим моментом клонування, тож слід враховувати фізіологічні процеси, що відбуваються під час клітинного циклу. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. Крім того, через непрозорість цитоплазми зигот великої рогатої худоби виникає

необхідність центрифугувати зародки, а це зменшує їх життєздатність. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

Перші досліді з мікрomanipуляцій показали, що безпосереднє введення піпетки з пронуклеусом або ядром бластомера, що міститься в ній, в ооплазму зиготи або яйцеклітини ссавців викликає незворотні ушкодження плазматичної мембрани реконструйованої зиготи та її загибель через великі розміри ін'єкційної піпетки.

Для полегшення введення бластомерів у перивітеліновий простір ооцитів, жіночі гамети дозволяється попередньо поміщати до гіпертонічного середовища.

Уведення ядра або пронуклеуса під прозору оболонку в перивітеліновий простір, як правило, не призводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму. ПЕГ широко використовується за роботи з рослинними і соматичними клітинами, однак, у дослідженнях на ембріонах звичайно не застосовується через варіабельність активності, сильно виражену токсичну дію на клітини, складність його видалення з плазматичної мембрани, що викликає лізис клітин і перешкоджає розвитку ембріонів. Більш вдалим у цьому відношенні є вірус Сендай. Але і він має ряд недоліків, що обмежують його застосування для роботи з ембріонами. До них відносяться ризик збереження вірулентності вірусних часток, варіабельність властивостей різних партій, низька, на відміну від його використання за злиття каріопластів яйцеклітин і бластомерів ранніх ембріонів, ефективність для клітин більш пізніх ембріонів. Крім того, бластомери ембріона отримані злиттям каріопласта з яйцеклітиною, вже не можуть бути використані як донори ядер, оскільки повторне застосування цього фузогена неможливе внаслідок втрати клітинних рецепторів, що відповідають за зв'язування з вірусом. Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можливо, здійснюючи серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко заміняємі залежно від бажання експериментатора, параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

4.2. Соматичне клонування

Принципово вищим ступенем клонування є так зване «соматичне» клонування, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму. Якщо в перших двох типах клонування можна отримати копії ембріона і невідомо, які властивості будуть мати тварини з цих зародків, то в останньому – копіюється існуючий дорослий організм. Отримання генетичних копій тварин відкриває неймовірні перспективи як для науки, так і для виробництва, але й реалізація соматичного клонування набагато складніша. Це викликано ступенем диференціації генетичного матеріалу клітин, що є донорами ядер для

пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріона (2-4 клітини) всі бластомери є тотіпотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо. Ядра 8-32 клітинних зародків вже диференційовані, але ступінь їх спеціалізації ще не високий і вони здатні активізуватися в цитоплазмі енуклеюваної яйцеклітини, а створений ядерно-цитоплазматичний гібрид спроможний розвинути в повноцінний зародок. Більш високий ступінь диференціації ембріональних стовбурових клітин, що отримують з внутрішньоклітинної маси бластоцисти, робить задачу реконструювання ембріона з їх ядер ще важчою. Набагато складніша задача – активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому випадку, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто, певною мірою, схожа на ембріональну клітину.

У лютому 1997 року з'явилося повідомлення, що в лабораторії Яна Уілмута в Рослінському інституті (Единбург, Шотландія) розробили ефективний метод клонування ссавців і на основі його використання вивели ягня Доллі. Насамперед, необхідно було виділити ооцити (яйцеклітини). Їх вилучали з овець породи шотландська чорноморда, помістили у штучне поживне середовище із додаванням ембріональної телячої сироватки за температури 37°C і провели операцію енуклеації (видалення власного ядра). Після цього виникла потреба забезпечення яйцеклітини генетичною інформацією від організму, який належало клонувати. Для цієї мети використали різні клітини донора, але найбільш зручними виявилися диплоїдні клітини молочної залози дорослої вагітної вівці. Ці клітини виводили зі стадії росту клітинного циклу, розбавляючи сироватку, і через п'ять днів з'єднували з енуклеюваним ооцитом. Останній потім активували до розвитку за допомогою електричного струму. На стадії морули або бластоцисти ембріони (від одного до трьох) трансплантували в матку прийомної матері, де вони могли розвиватися до народження.

З 236 дослідів успіх мав лише один, внаслідок чого і народилося ягня Доллі, яке містить генетичний матеріал дорослої вівці, що вмерла три роки тому. Точними молекулярно-генетичними дослідженнями було доведено, що Доллі є клонованою твариною.

Таким чином, принаймні в деяких випадках, було доведено здатність ядер соматичних клітин забезпечувати нормальний розвиток ссавців. Отже, одержання клону принципово можливе. Однак, це ще не означає одержання точної копії клонованої тварини. Насправді одержати абсолютно точну копію даної конкретної тварини (а саме така кінцева мета ставиться в експериментах по клонуванню) набагато складніше, ніж це здається за поверхневого знайомства із проблемою.

І справа зовсім не в технічній розробці методів клонування, а в тому, що структурно-функціональні зміни ядер у процесі індивідуального розвитку тварин досить глибокі: одні гени активно працюють, інші інактивуються й «мовчать», при цьому сам зародок являє собою своєрідну мозаїку статей розподілу таких функціонально різних генів.

Відомо, що в соматичних клітинах у ході їхнього розвитку хромосоми послідовно коротшають на своїх кінцях, у зародкових клітинах спеціальний фермент – теломераза добудовує, відновлює їх, тобто отримані дані знов-таки свідчать про істотні розходження між зародковими і соматичними клітинами. І отже, постає питання, чи здатні ядра соматичних клітин повністю й еквівалентно замінити ядра зародкових клітин у їхній функції забезпечення нормального розвитку зародка.

Виникає проблема – як повернути ядра соматичних клітин, що змінилися, до вихідного стану, щоб вони могли забезпечити нормальний розвиток тієї яйцеклітини, у яку їх трансплантували. Успіх буде залежати від того, чи вдалося знайти таку соматичну клітину, ядро якої ще не втратило свого потенціалу, і так, щоб ще й не ушкодити це ядро в процесі складних хірургічних маніпуляцій. Крім того, умови розвитку в матці різних прийомних матерів будуть розрізнятися, а існує таке поняття, як норма реакції, тобто певні межі коливань прояву даного гена у фенотиповій ознаці. Це значить, що в різних умовах розвитку зародка однакові гени будуть виявляти свою дію по-різному. Але ж таких генів тисячі. Отже, імовірність повної подібності клонованих тварин буде не дуже велика.

Таким чином, у наш час можливо розглядати як науковий напрямок з певними досягненнями тільки клонування ембріональне. І хоча з загальнобіологічної точки зору соматичне і ембріональне клонування суттєво відрізняються, з погляду на використання цього методу в народному господарстві, зокрема в тваринництві чи фармацевтичній промисловості, різниця між ними може бути невеликою. Це можливо за рахунок використання біотехнології, в якій комбінуються клонування як метод розмноження організмів і кріоконсервація як метод уведення останніх в анабіоз. Запропонована біотехнологія дозволяє і у разі використання ембріонального клонування передбачати ознаки нащадків за рахунок того, що поки більшість ембріонів клону зберігається в замороженому вигляді – у рідкому азоті, 1-2 з них пересаджуються реципієнтам і перевіряються за якістю нащадків. Для повторного розмноження і отримання чисельних нащадків використовуються тільки ембріони тих клонів, що мають необхідні господарсько-корисні ознаки. За кількісними та якісними показниками ембріональне клонування наближається до соматичного саме при повторному (багаторазовому) розмноженні зародків, коли клоновані ембріони попереднього покоління є донорами ядер для наступного циклу реконструкції. У цьому разі кількість зародків зростає в геометричній прогресії, а ефективність реалізації біотехнології отримання нащадків з прогнозованими ознаками наближається до значень, що задовольняють практиків.

4.3. Створення партеногенетичних тварин

В ембріогенетиці проводять широкомасштабні дослідження щодо генетичного клонування (тиражування) шляхом безстатевого розмноження. Відомо, що у природі багато рослин розмножуються вегетативно і висаджені

частинки рослини здатні до клонування ідентично їй подібних. У тваринництві близьким до цього є явище *партеногенез* – розмноження жіночої гаметі без участі ядра гаметі чоловічої статі. Таке явище інколи спостерігають у ящірок та птиці, зокрема індиків.

Практично питання використання партеногенезу вирішено позитивно у шовкопряда завдяки працям Б. Л. Астаурова і Х. Хасімото, В. А. Струнникова. Цього досягли впливом високих і низьких температур та іонізуючої радіації на запліднені яйцеклітини. У випадку, коли гинуть жіночі ядра, таку різновидність безстатевого розмноження називають андрогенезом, а якщо чоловічі – партеногенезом. У шовкопряда великі дози фізичних і хімічних факторів призводять до амейотичного партеногенезу, коли одержують самок, що повністю копіюють генотип матері. При малих дозах цих факторів стимулюється мейотичний партеногенез, де розвиваються тільки самці, повністю гомозиготні за всіма генами.

Класичні досліди М. Сурані зі співавторами, проведені на мишах, показали, що ні подвійна доза материнських генів (партеногенетичні ембріони), ні подвійна доза батьківських генів (андрогенетичні ембріони), ні наявність у ембріоні диплоїдних одноматеринських і одnobатьківських клітин не достатні для нормального ембріонального розвитку, що для завершення ембріогенезу клітина повинна мати і материнські, і батьківські хромосоми.

Чоловічий геном необхідний для утворення позазародкових тканин, а жіночий – для проходження визначених стадій ембріогенезу. В іншій роботі, проведеній також на мишах, показано, що чоловічий геном необхідний для розвитку трофектодерми (ТЕ) і надалі – плаценти, але до 8-клітинної стадії участь батьківського геному в повноцінному розвитку мишачих ембріонів не обов'язкова. Гаплоїдний набір не достатній для проліферації клітин, тому виживають тільки диплоїдизовані клітини. Нормальний розвиток ембріонів можливий лише в тому випадку, якщо бластоцисти містять як клітини внутрішньої клітинної маси (ВКМ), так і клітини трофектодерми. Це пояснюється тим, що клітини ВКМ і ТЕ відрізняються рядом властивостей. Клітини ТЕ під індукційним впливом ВКМ проліферують і з них створюються позазародкові тканини, клітини ВКМ не утворюють зародкових оболонок, але формують тіло зародка, тобто його тканини й органи.

4.4. Створення химерних тварин

У наш час одним з перспективних напрямків біотехнології є штучне одержання химер або генетичних мозаїків. Сутність такого біотехнічного методу, заснованого на досягненнях клітинної інженерії і мікрomanipуляцій на ранніх ембріонах, полягає в штучному об'єднанні ембріональних клітин двох і більше тварин, що належать не тільки до однієї породи, а й до різних порід і навіть видів. Отримані тварини – химери мають ознаки різних генотипів. Сучасна мікрохірургія дозволяє одержувати химер, що мають чотирьох і більше батьків.

Одержання химерних тварин становить великий інтерес для експериментальних досліджень у генетиці, біології розвитку й імунології, однак можливості використання химерних ембріонів у відтворенні і селекції сільськогосподарських тварин обмежені. Проте, можна відзначити ряд проблем тваринництва, рішення яких може бути знайдене за допомогою химер. Так, химерні ембріони можуть бути використані для збереження життєздатності коштовних ембріонів, ушкоджених при маніпуляціях або кріоконсервації, вивчення можливості одержання тварин, що сполучають такі ознаки, як продуктивність і стійкість до захворювань, одержання трансгенних тварин.

Існують два основних методи одержання химерних зародків – агрегаційний і ін'єкційний. При першому способі два або більше ембріони або їхні частини агрегують в один ембріон, при другому – окремі клітини або кілька клітин (аж до фрагментів ВКМ) одного ембріона ін'єктують в інший ембріон.

Ефективним способом агрегації ембріонів, звільнених від прозорої оболонки, є їх центрифугування. Центрифугування мишачих ембріонів при 1500-2000 об/хв протягом 5-10 хвилин викликало 100%-у агрегацію зародків, наступне культивування і трансплантація яких привели до народження химерних мишей.

Агрегації клітин можна досягти підштовхуванням ембріонів, позбавлених прозорої оболонки й володіючих високими адгезивними властивостями, один до одного доти, поки вони не злипнуться.

Химерні тварини не передають нащадкам характерну для них генетичну мозаїчність. Подібно до гетерозиготних або гібридних тварин у нащадків відбувається розщеплення, внаслідок чого порушуються цінні генетичні комбінації. Хоча химерні тварини підтримують господарсько-важливі ознаки лише протягом одного покоління, у розведенні великої рогатої худоби вони можуть викликати великий практичний інтерес. Наприклад, можна створити химерних тварин, що поєднують такі ознаки, як молочна і м'ясна продуктивність, що є антагоністами і несумісні в одному організмі. Створення ін'єкційних химер шляхом уведення в ембріон певних ліній клітин дозволить поліпшити імунну систему і підвищити резистентність до ряду хвороб.

Однак, химерні ембріони становлять великий інтерес для вивчення можливості розробки методів клонування дорослих тварин шляхом партеногенезу.

Для мишей і великої рогатої худоби показано, що пересадження химерних ембріонів, що складаються з клітин звичайних (отриманих у результаті запліднення) і диплоїдних гомозиготних гіногенетичних зародків, привело до народження живого потомства, органи і тканини якого походили як від звичайних, так і партеногенетичних бластомерів. Наступні експерименти підтвердили участь партеногенетичних клітин химерних зародків миші в розвитку ембріона. Для завершення ембріогенезу і народження химерного потомства миші може бути досить однієї клітини 8-бластомерного звичайного ембріона, агрегованого з 4-бластомерним партеногеноном.

Більш простий спосіб одержання химерних ембріонів з використанням ЕС-клітин запропонували С. Вуд зі співавторами. Звільнені від прозорої оболонки 8-клітинні ембріони мишей культивували на моношарі ЕС-клітин, після чого ембріони з ЕС-клітинами, що прикріпилися до них, переносили в звичайне середовище і культивували до стадії бластоцисти; у процесі культивування ЕС-клітини колонізували ВКМ бластоцист. Цей спосіб, відзначають автори, є ефективним для одержання химер, скорочує час і спрощує маніпуляції в порівнянні з введенням ЕС-клітин у порожнину бластоцисти.

Використання химерних ембріонів може розширити можливості дослідників у рішенні ряду фундаментальних проблем біології розвитку.

Контрольні запитання

1. Шляхи клонування тварин.
2. Проблеми, що виникають при пересадці ядер соматичних клітин.
3. Схема пересадки ядер бластомерів у зиготу.
4. Способи пересадки ядер з соматичних клітин в енуклеювану яйцеклітину сільськогосподарських тварин.
5. Основа методу отримання гомозиготних тварин.
6. Шляхи відновлення диплоїдного набору у зиготі, що містить гаплоїдний набір хромосом.
7. Проблеми, що виникають при отриманні гомозиготних тварин.
8. Різновиди партеногенезу, що існують.
9. Різниця між нащадками, які були отримані при використанні різних механізмів диплоїдизації партеногенезу.
10. Стимулятори, що викликають партеногенетичний розвиток яйцеклітини.
11. Яких тварин називають химерними?
12. Способи створення химерних тварин.
13. Агрегаційне створення химерних тварин.
14. Ін'єкційний метод створення химерних тварин.
15. Яким чином визначають химерність тварин?
16. Переваги, що існують при використанні методу створення химерних тварин.

5. ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Промислова біотехнологія – це наука про одержання різних цільових продуктів на основі життєдіяльності мікроорганізмів. Її основою є робота з мікробними організмами. А тому, промислова мікробіологія (або технічна мікробіологія) в даний час є самостійною і найбільш великотоннажною галуззю сучасної промислової біотехнології. Величезна різноманітність мікроорганізмів, які утилізують як ростові субстрати різні сполуки, у тому числі відходи, дозволяє отримувати широкий спектр біологічно активних сполук, а також здійснювати корисні для людини реакції, включаючи знешкодження відходів, трансформацію і здобуття енергії, і багато іншого.

У даний час в різних процесах промислової мікробіології одержують близько 200 сполук, що мають комерційну цінність. Найважливішими серед них є: амінокислоти, антибіотики, антиметаболіти, антиоксиданти, білки, вітаміни, гербіциди, інсектициди, коферменти, ліпіди, нуклеїнові кислоти, органічні кислоти, пігменти, полісахариди, протипухлинні агенти, ферменти, нуклеотиди, емульгатори.

Процеси промислової біотехнології можна поділити на дві великі групи за характеристикою цільового продукту – виробництво біомаси і отримання продуктів метаболізму. В першому випадку мета виробництва полягає в отриманні клітинної маси продуцента, поза залежністю від того, жива культура буде використовуватися далі, або біомаса нежиттєздатних клітин, як джерело білку, вітамінів або інших цінних речовин для кормовиробництва. До другої групи належать усі процеси, де цільовим продуктом стає один або декілька метаболітів, а клітини продуцента не потрібні, а іноді навіть небезпечні після завершення фази біосинтезу; це, наприклад, отримання продуктів бродиння, ферментів, амінокислот, антибіотиків та ін.

5.1. Стадії біотехнологічного виробництва

Основними стадіями біотехнологічного виробництва можна вважати п'ять операцій: підготовка сировини, підготовка біологічно діючого начала, стадія ферментації, виділення і очищення цільового продукту, приготування товарних форм продуктів.

У загальному вигляді будь-який *біотехнологічний процес включає три основні стадії*: предферментаційну, ферментаційну і постферментаційну.

На предферментаційній стадії здійснюють зберігання та підготовку культури продуцента (інокулята), отримання та підготовку поживних субстратів і середовищ, ферментаційної апаратури, технологічної та рециркулюючої води і повітря.

Підтримання і підготовка *чистої культури* є дуже важливим моментом предферментаційної стадії, оскільки продуцент, його фізіолого-біохімічні характеристики і властивості визначають ефективність усього біотехнологічного процесу. У відділенні чистої культури здійснюють зберігання виробничих штамів і забезпечують їх реактивацію і напрацювання

інокулята в кількостях, необхідних для початку процесу. При вирощуванні посівних доз інокулята застосовують принцип масштабування, тобто проводять послідовне нарощування біомаси продуцента в колбах, бутлях, далі в серії послідовних ферментерів. Кожен наступний етап даного процесу відрізняється за обсягом від попереднього зазвичай на порядок. Отриманий інокулят по стерильній посівній лінії скеровується далі в апарат, в якому реалізується ферментаційна стадія.

Приготування поживних середовищ здійснюється в спеціальних реакторах, обладнаних мішалками. Залежно від розчинності і сумісності компонентів середовищ можуть бути застосовані окремі реактори. Дозування живильних компонентів підбирається й здійснюється індивідуально на кожному виробництві відповідно до «Технологічного регламенту» конкретного процесу. В якості дозуючого обладнання при цьому застосовуються вагові і об'ємні пристрої, що використовуються в харчовій та хімічній промисловості. Транспорт речовин здійснюється насосами, стрічковими і шнековими транспортерами.

Сипучі компоненти подають у ферментери за допомогою вакуумних насосів. Часто застосовують принцип попередніх сумішей, тобто солі попередньо розчиняють і потім транспортують по трубопроводах, дозуючи їх подачу за обсягом. В силу виняткового різноманіття біотехнологічних процесів і застосовуваних для їх реалізації середовищ, методів і апаратури розгляд даних елементів далі буде пов'язано з конкретними біотехнологічними виробництвами.

Стадія ферментації є основною стадією в біотехнологічному процесі, оскільки в її ході відбувається взаємодія продуцента із субстратом і утворення цільових продуктів. Ця стадія здійснюється в біохімічному реакторі (ферментері) і може бути організована в залежності від особливостей використовуваного продуцента і вимог до типу і якості кінцевого продукту різними способами. Ферментація може проходити в строго асептичних умовах і без дотримання правил стерильності (так звана «незахищена» ферментація); на рідких і на твердих середовищах; анаеробно і аеробно. Аеробна ферментація, в свою чергу, може протікати поверхово або глибинно (у всій товщі живильного середовища).

Культивування біологічних об'єктів може здійснюватися в періодичному і проточному режимах, напівнеперервному з підживленням субстратом. При періодичному способі культивування ферментер заповнюється вихідним живильним середовищем і інокулятом мікроорганізмів. Протягом певного періоду часу в апараті відбувається взаємодія мікроорганізмів і субстрату, що супроводжується утворенням в культурі продукту.

Біохімічні перетворення в цьому апараті тривають від десятків годин до кількох діб. Регуляція умов усередині ферментера – найважливіше завдання періодичного культивування мікроорганізмів.

При цьому відбуваються суттєві зміни фізіологічного стану біооб'єкта, а також ряду параметрів середовища. В результаті цього створюються умови для максимальної продукції того чи іншого цільового продукту. Періодично

ферментер спорожняють, здійснюють виділення та очистку продукту, і починається новий цикл.

Постферментаційна стадія забезпечує одержання готової товарної продукції і також, що не менш важливо, знешкодження відходів та побічних продуктів. В залежності від локалізації кінцевого продукту (клітина чи культуральна рідина) і його природи на постферментаційній стадії застосовують різну апаратуру, методи виділення і очищення. Найбільш трудомістким є виділення продукту, що накопичується в клітинах. Першим етапом постферментаційної стадії є фракціонування культуральної рідини і відділення зваженої фази – біомаси. Найбільш поширений для цих цілей метод - сепарація, здійснювана в спеціальних апаратах – сепараторах, які працюють за різними схемами залежно від властивостей оброблюваної культуральної рідини. Для підвищення ефективності процесу сепарації застосовують попередню спеціальну обробку культури – зміна рН, нагрівання, додавання хімічних агентів.

Для збільшення термінів придатності біотехнологічних продуктів здійснюють їх зневоднення і стабілізацію. В залежності від властивостей продукту застосовують різні методи висушування. Сушка термостабільних препаратів здійснюється на підносах, стрічковому конвеєрі, а також у киплячому шарі. Особливо чутливі до нагрівання препарати висушують у вакуумсушильних шафах при зниженому тиску і температурі та у розпилювальних сушарках. Стабілізацію властивостей біотехнологічних продуктів зумовлює додавання в якості наповнювачів різних речовин. Для стабілізації кормового білка застосовують пшеничні висівки, кукурудзяне борошно, що володіють додатковою поживною цінністю. Для стабілізації ферментних препаратів використовують гліцерин і вуглеводи, які перешкоджають денатурації ферментів, а також неорганічні іони кобальту, магнію, натрію, антибіотики та ін.

5.2. Субстрати для біотехнологічних виробництв

Серед безлічі компонентів живильного середовища основним вважається той, який служить мікроорганізмам джерелом вуглецю та енергії. Такі компоненти називають *субстратом*, а всі інші – допоміжними речовинами. Особливу значимість мають субстрати для біосинтезу мікробного білка.

Основною сировиною для мікробного синтезу є вуглевмісна сировина. Це може бути кристалічна глюкоза, технічна сахароза, технічна лактоза, гідрол, крохмаль, оцтова кислота, етанол, вузька фракція рідкого парафіну. Так, кам'яне вугілля, природний газ і деревина служать сировиною для хімічного синтезу технічних спиртів або оцтової кислоти, які потім дуже широко використовуються в мікробіологічній промисловості. Це так звані традиційні джерела вуглецю.

Для синтезу білка і різних метаболітів широко використовують субстрати синтетичного генезу, відходи сільського господарства та харчової промисловості, особливо оцтову кислоту, мелясу і ін..

Сировинна база біотехнології істотно зростає за рахунок побічних продуктів різних виробництв. Так, для виробництва кормових та хлібопекарських дріжджів, антибіотиків, етанолу та ін. застосовуються сульфатні луги, картопляна барда, зернова барда, гідрол, молочна сироватка, депротейнізований сік рослин, картопляний сік, гідролізат відходів деревини, згущений випаруванням гідролізат торфу. Для вирощування дріжджів, бактерій, мікроміцетів використовують солодове сусло, а для виробництва ферментів – пшеничні висівки.

Перспективним є використання сировинних ресурсів, що постійно поновлюються – первинних продуктів фотосинтезу, в першу чергу гідролізатів деревини і депротейнізованого соку рослин.

Поживні субстрати, що широко використовують в біотехнології можна класифікувати таким чином:

1. Цукри – глюкоза, сахароза, лактоза, ксилоза, крохмаль, целюлоза, ксилан. Сировиною для них служить крохмаль, цукровий буряк, молочна сироватка, картопля, кукурудза, пшениця, жито, ячмінь, рис, різноманітна рослинна сировина і т. д.
2. Спирти – етанол, метанол. Сировиною є різноманітні цукристі субстрати, продукти гідролізу деревини, компоненти нафти і газу.
3. Вуглеводні – C_1-C_9 – Алкани, $C_{10}-C_{20}$ – Алкани, алкани з числом вуглецевих атомів більше 20. В якості сировини тут застосовують природний газ, нафту і газовий конденсат.
4. Субстрати невизначеного складу – меляса, ячмінь і продукти його переробки (сусло, солод, солодовий екстракт), сульфатні луги, гідролізат деревини, смоли, рослинні масла і тваринні жири, дріжджовий екстракт, соєве борошно. Сировиною для отримання цих субстратів є побічні продукти у виробництві цукру-сирцю, ячмінь, деревина, трав'яна маса, рослинна і тваринна сировина, дріжджі, соєві боби.

Сировину можна розділити на:

- Дорогу, харчову: борошно кукурудзяне, соєве, пшеничне, крохмаль, харчовий цукор, глюкоза, лактоза, рослинні олії;
- Відходи харчової промисловості, вони дешевші. Це гідрол, меляса, зелена патока, молочна сироватка, кукурудзяний екстракт, рибно-кісткове борошно, гідролізати кукурудзяних качанів, соломи, соняшникового лушпиння;
- Спеціально одержувана сировина: гідролізати деревини та торфу, парафіни нафти, метан, етанол та ін.

5.3. Біотехнологічна інтенсифікація процесів рубцевого травлення жуйних

Загальновідомо яку величезну роль у процесах засвоєння тваринами поживних речовин раціону грають мікроорганізми шлунково-кишкового тракту. Досить, наприклад, нагадати, що тварини позбавлені ферментів, що впливають на клітковину (целюлозу рослин) і не можуть самотійно

засвоювати цей найважливіший компонент корму, який за поживністю займає 25-30% від усього спожитого корму. Засвоєння клітковини відбувається лише за допомогою мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Мікрофлора синтезує також ряд важливих вітамінів та інших необхідних компонентів годівлі тварин. Цей сформований у процесі еволюції симбіоз тварин з мікроорганізмами повинен розглядатися як єдина система. Потрібна селекція цих мікроорганізмів, що йде паралельно селекції самих тварин. Зрозуміло, в процесі селекції тварин змінювалася і мікрофлора, але ці процеси не завжди відбувалися синхронно.

Для вирішення цих питань найважливішими завданнями є:

- створення штамів мікроорганізмів, здатних функціонувати в шлунково-кишковому тракті тварин і більш ефективно утилізувати клітковину. Це різко підвищить ефективність всієї галузі тваринництва;
- створення штамів мікроорганізмів, які сприяють засвоєнню силосу з сільськогосподарських культур, що містять багато крохмалю;
- створення штамів продуцентів незамінних амінокислот, особливо лізину, які могли б нормально функціонувати в шлунково-кишковому тракті тварин. Це дозволить більш ефективно трансформувати поживні речовини раціону в продукти тваринництва;
- створення штамів симбіонтів-продуцентів ряду вітамінів, які знаходяться в дефіциті в традиційних раціонах.

Симбіоз сільськогосподарських тварин і мікроорганізмів відіграє важливу роль у нормальному функціонуванні тварин та реалізації їх генетичного потенціалу продуктивності.

В наш час, у результаті спільних досліджень фахівців-зоотехніків, фізіологів, генетиків і мікробіологів накопичено досить значний і цікавий матеріал з проблеми інтродукції мікроорганізмів у травний тракт сільськогосподарських тварин і птахів, вивчено процеси адаптації цієї мікрофлори, вплив її на біологічні та господарсько-цінні ознаки макроорганізмів.

Роль мікрофлори особливо помітна у жуйних тварин – саме мікроорганізми передшлунків забезпечують засвоєння целюлози і синтез білка з небілкових азотистих сполук.

Однак, і в інших видів сільськогосподарських тварин симбіотичні відносини, що виникли в ході еволюції, відіграють значну роль.

Мікрофлора шлунково-кишкового тракту сільськогосподарських тварин (особливо рубця жуйних) являє собою унікально відшліфовану екосистему, чисельні компоненти якої можуть бути високоперспективні й щодо використання їх для моногастричних тварин.

Дослідження останніх років свідчать про зростаючий інтерес вчених і практиків до використання живих мікроорганізмів як біологічних регуляторів метаболічних процесів в організмі тварин і птиці. Насамперед, це пробіотики, пребіотики, синбіотики.

Одним з найбільш результативних шляхів використання корисних форм мікроорганізмів у тваринництві є препарати-пробіотики, що отримані на основі мікроорганізмів-симбіонтів шлунково-кишкового тракту. Застосування

таких препаратів дозволяє прискорити ріст молодняку і зменшити його відхід. За ефективністю застосування пробіотики не поступаються антибіотикам (кормового та ветеринарного призначення), але не мають побічної дії на організм тварини і мікрофлору кишечника, тобто є екологічно чистими. Їх використання дозволяє отримувати продукцію тваринництва, що не містить залишків хіміотерапевтичних і антибіотичних препаратів.

До пробіотиків відносять живі мікробні культури, які мають корисну дію на тварину-господаря шляхом поліпшення її кишкового балансу.

Поняття «пребіотик» використовується для позначення речовин, які не абсорбуються в кишечнику, але сприятливо впливають на організм господаря шляхом селективної стимуляції росту або активації метаболізму корисних представників його кишкової мікрофлори. Іншими словами пребіотики можна назвати стимуляторами, або промоторами, пробіотиків.

Синбіотики – це комплекси пробіотиків з різними пребіотичними речовинами, а їх дія заснована на синергізмі пробіотиків і пребіотиків, за рахунок якого мікроорганізми-пробіотики, що вводяться, не тільки більш ефективно імплантуються в шлунково-кишковому тракті господаря, але і стимулюють його власну мікрофлору.

Багато мікроорганізмів, що використовуються для розробки і створення пробіотиків – це чисті культури бактерій, виділених з мікрофлори рубця тварин. Відома технологія отримання та застосування в тваринництві пробіотиків на основі молочнокислих біфідогенних заквасок з використанням вторинних молочних ресурсів.

Перспективні дослідження з розробки рекомбінантних пробіотиків з використанням методів біотехнології. Біотехнологічні прийоми синтезу ДНК і клонування генів дозволяють змінювати екосистему рубця і процеси ферментації в потрібному напрямку за рахунок генетичних модифікацій.

З рубця великої рогатої худоби була виділена асоціація целлюлозолітичних бактерій. На основі цієї асоціації був створений препарат-пробіотик целлобактерін для підвищення перетравності клітковини і підвищення збереженості молодняку.

Розроблено новий підхід, за допомогою якого можна буде забезпечити велику рогату худобу білком, збагаченим незамінними амінокислотами. Звичайне додавання білків в корми – коштовний і не досить ефективний спосіб, оскільки білки і амінокислоти руйнуються бактеріями рубця ще до того, як тварина встигає їх використати. Крім того, основну кількість білка вони отримують не з кормами; його забезпечують мікроорганізми рубця. Раціон тварин можна збагатити, якщо спрямовано модифікувати ці бактерії. Для цього спочатку був синтезований білок з високим вмістом залишків метіоніну, лізину і лейцину. Він складався з 100 амінокислот, 57 з яких були незамінними, і мав стабільну α -спіральною конфігурацією. Потім, за допомогою 14 нуклеотидів, що частково перекриваються, синтезували його ген і зшили його з геном білка, який зв'язує мальтозу. Отриманий гібридний ген експресували у *E.coli* під контролем промотора транскрипції. На частку гібридного білка приходилося приблизно 12% сумарного внутрішньоклітинного білка. В наш час

досліджується наскільки бактерії, що існують у рубці, здатні синтезувати цей білок.

Забезпечити жуйних достатньою кількістю білка і амінокислот можна двома способами. По-перше, запобігти розпаду білків і амінокислот у рубці шляхом модифікації властивостей мікроорганізмів, які відповідають за розпад. По-друге, захистити кормові білки і амінокислоти від атак мікроорганізмів. У першому випадку необхідно блокувати або інгібувати системи мікробних ферментів, що руйнують амінокислоти. Труднощі цього підходу полягають у тому, що в рубці існують сотні різних мікроорганізмів і найпростіших, кожен з яких має значну кількість ферментів.

Що стосується захисту білків і амінокислот від руйнування у рубці, то це можливо зробити механічним і хімічним шляхами. Механічний спосіб захисту амінокислот полягає в тому, що часточки амінокислот певного розміру можуть бути вкриті конкретними матеріалами, або залиті в них. Такі часточки здатні проходити через рубець у незмінному вигляді. В сичузі або в тонкому кишечнику, навпаки, амінокислота повинна звільнитися. Це перша вимога до матеріалу покриття. Часто використовується залежність розчинності або набрякання матеріалів від рН середовища. Другою вимогою до матеріалів покриття є їх нетоксичність і здатність забезпечувати тонкий покривний шар. До таких матеріалів в основному належать жирні кислоти з довгим ланцюгом, такі як стеаринова і пальмітинова, а також гідратовані жири.

Хімічний захист амінокислот, на відміну від фізичних методів, полягає в модифікації молекул. Вимоги залишаються аналогічними: речовина, що захищає, повинна бути стійкою у рубці, але потім звільнювати амінокислоту в сичузі або тонкому кишечнику. Захисна група забезпечує достатню стабільність по відношенню до дії мікроорганізмів рубця, але миттєво відщеплюється з утворенням вільної амінокислоти у кислому середовищі сичуга. При використанні вказаного препарату покращується молочна продуктивність корів в основному за рахунок збільшення величини надою в середньому на 7,5% за добу.

5.4. Імобілізовані ферменти

Використання біологічних процесів і агентів для отримання харчових продуктів і поліпшення їх якості – найдавніша галузь біотехнології. Як відомо, всі живі організми містять значну кількість (сотні і тисячі) ферментів, основна функція яких полягає у проведенні, прискоренні і регуляції практично всіх хімічних реакцій, необхідних для життєдіяльності організму.

Більш широке використання ферментів до останнього часу стримувалося рядом причин, з яких найважливішими є:

- трудомісткість відділення ферментів від початкових компонентів і продуктів реакції після завершення процесу, внаслідок чого ферменти використовуються, як правило, одноразово;
- нестійкість ферментів при зберіганні, а також при різних впливах (головним чином теплових);

- трудомісткість очищення ферментів і отримання їх в достатньо активному вигляді.

Шляхом подолання цих труднощів є отримання так званих іммобілізованих ферментів.

Іммобілізація – обмеження рухливості молекул ферментів, основана на фізико-хімічних принципах, що дозволяють зміцнити структуру ферменту таким чином, щоб активний центр його молекули зберігав власну працездатність (каталітичну активність) тривалий час, не підлягаючи структурним змінам, що викликають порушення його конфігурації.

При іммобілізації ферменти з розряду гомогенних каталізаторів (тобто каталізаторів, що знаходяться в тій самій фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (тобто тих, що утворюють особливу фазу, яка відокремлена від реагентів). Ферменти і реагенти можуть бути розподілені, що дозволяє: а) в певний час зупинити реакцію; б) регенерувати (поновити) фермент після закінчення реакції і використовувати його для нового циклу біотехнологічного процесу; в) отримати продукт реакції без домішок ферменту, що має особливе значення для харчової і фармацевтичної промисловості.

Ферменти при іммобілізації набувають властивостей, які не характерні для них у вільному стані.

Стабілізація ферменту при іммобілізації. Включення ферменту у середину полімерної структури, внутрі- і міжмолекулярні зшивання його, закріплення його на носії – все це зміцнює фермент у робочій конформації і запобігає руйнуванню і денатураційним перебудовам. Це пояснює збільшення стабільності іммобілізованого ферменту при тривалому зберіганні і функціонуванні, а також його більшу стійкість до впливу підвищеної температури, екстремальних значень рН, органічних розчинників. Якщо ферменти включені у мікропористий носій, полімерні структури або мікрокапсули, то вони також захищені від впливу мікроорганізмів.

Зміна функціональних властивостей ферментів при іммобілізації. На характеристики ферменту при іммобілізації суттєво впливає мікрооточення, що визначається природою носія. Так іммобілізація ферменту на аніонному або катіонному поліелектроліті зрушує його оптимум рН, відповідно, в лужний або кислий бік.

Іммобілізація викликає зниження ефективності інгібіторів ферментів. Однією з причин цього може бути ускладнення доступу інгібіторів до іммобілізованого ферменту.

Важливе практичне значення іммобілізації полягає в тому, що ферментам можна надати властивість функціонувати у неводному середовищі, зокрема в органічних розчинниках. Складається якби двофазна система, оскільки носій ферменту утримує в собі воду, і завдяки цьому водного мікрооточення зберігається каталітична активність.

Існує декілька способів іммобілізації ферментів.

Адсорбція – прикріплення ферментів до поверхні природних або синтетичних носіїв. Фермент фіксують на поверхні неорганічних (силікагель; пористе скло; пісок; глина, яку випалювали; кераміка; бентоніт; гідроксид

титану, цирконію, заліза та ін.) і органічних (целюлоза, хітин та їх похідні; іонообмінні смоли; нейлон; поліетилен; полістирол) носіїв.

Існує тенденція використання синтетичних великопористих матеріалів, своєрідних «губок», які поглинають клітинну масу. Поліуретан є дуже поширений губчатий матеріал, що створює тверду «піну» з відкритими чашечками. Цей матеріал у вигляді дрібно нарізаних часточок вносять у біореактор з клітинами. Клітини, що проникають у чашечки носія, швидко ростуть. Така система використовується при очищенні стічних вод.

Імобілізація шляхом включення в полімерну структуру. Цим методом біокатализатор вносять в полімерну структуру: отримують гранули, плівки, волокна, що містять фермент. Спосіб включення біокатализатора в полімерну структуру визначається специфікою полімеру. В тому випадку, коли полімеризація мономерів залежить від катіонів, фермент вносять у розчин мономерів і суміш, що отримали, по краплинам додають до водного розчину, що містить певний катіон. Створюються сферичні полімерні часточки, в яких знаходиться іммобілізований фермент.

При використанні в якості носія колагену іммобілізація здійснюється при інтенсивному перемішуванні клітин ферменту в водному середовищі, що містить часточки цього нерозчинного у воді білка (колагену). Коли використовують желатин або агар-агар, то біокатализатор вносять у нагрітий розчин цих полімерів з наступним охолодженням, яке викликає утворення гелю.

Імобілізація шляхом інкапсулювання. При цьому методі біокатализатори покривають спеціальними напівпроникними оболонками, що виготовлені з різних матеріалів – целюлози, поліакрилату, полістиролу, поліуретану, поліефірів, полікарбонатів, ліпідів. Переваги методу, в першу чергу, полягають у тому, що через пори полімерної оболонки здатні проникати низькомолекулярні речовини, а цільовий продукт реакції – затримується. Після закінчення процесу і ретельного відмивання від низькомолекулярних домішок, капсули руйнують в гомогенізаторі і відділяють при центрифугуванні від розчину, що містить концентрований, майже чистий цільовий продукт.

Для іммобілізації також використовують порожні волокна. Їх виготовляють із целюлози та її похідних, а також інших природних і синтетичних матеріалів. Розчин, в якому міститься біокатализатор, вводять усередину порожнього волокна, і потім волокно «запечатують» з обох кінців. В порожнині волокна біокатализатор не підлягає хімічній модифікації і зберігає властивості.

Імобілізація шляхом поперечних зшивок. Метод полягає у хімічному зв'язуванні ферментних молекул між собою з формуванням конгломератів. Використовують бі- або поліфункціональні агенти, що мають дві або більше здатних до реакції груп і створюють зшивки між молекулами білків та інших біополімерів. Цей метод стабілізує конформацію внутріклітинних ферментів, запобігає впливу на них протеаз (речовин, що розщеплюють білки), попереджає автоліз (саморуїнування) клітин.

Це основні методи іммобілізації. Для кожного типу біокатализаторів існують власні найкращі методи. Ізольовані ферменти, в основному, іммобілізують на поверхні носіїв або методом поперечної зшивки.

В наш час за допомогою іммобілізованих ферментів у промисловому об'ємі отримують безлактозне молоко і цукор з молочної сироватки.

Контрольні запитання

1. На які групи можна поділити процеси промислової біотехнології за характеристикою цільового продукту?
2. Які стадії включає біотехнологічний процес?
3. Які процеси відбуваються на предферментаційній стадії?
4. Які процеси відбуваються на ферментаційній стадії?
5. Які процеси відбуваються на постферментаційній стадії?
6. Які компоненти поживного середовища називають субстратом?
7. Як можна класифікувати поживні субстрати, що використовують у біотехнології?
8. На які групи можна розділити сировину?
9. Що таке «іммобілізовані» ферменти?
10. Якими перевагами володіють іммобілізовані ферменти?
11. Які існують способи іммобілізації ферментів?
12. Які великомасштабні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів і клітин розроблені?

6. БІОТЕХНОЛОГІЯ І ЕНЕРГЕТИКА

Традиційні джерела енергії сьогодні не задовольняють зростаючі потреби сучасного суспільства. Необхідно знайти нові масштабні, легко відновлювальні екологічні і дешеві джерела енергії. Їх трансформація в технічно зручні види палива має декілька шляхів. Одним з них є біологічна конверсія органічних відходів і біомаси в цілому, як продукту фотосинтезу, в тверді, рідкі, газоподібні види палив та електроенергію.

Біогаз як екологічне паливо. Одним з пріоритетних механізмів у світі стали сучасні біотехнологічні підходи утилізації відходів у біогаз та добрива.

Біогаз складається з метану і водню до 40-90% і на 60-10% з вуглекислого газу. Визначено, що в якості сировини для виробництва біогазу може використовуватись будь-який біологічний продукт: органічні добрива (гній, пташиний послід, змивка від тварин), відходи землеробства (солома, кукурудзяний силос, бурякове і картопляне бадилля, листя), агропромислові відходи (яблучна та кукурудзяна барда, відходи від виробництва спирту, очистки овочів, фруктів тощо), відходи від забою свійських тварин, а також комунальні біовідходи.

В основі роботи біогазових установок (БГУ) закладені біологічні процеси бродіння та розкладання органічних речовин під впливом метанутворюючих бактерій в анаеробних умовах, які характеризуються відсутністю вільного кисню, високою вологістю і температурним середовищем 15-20°C для психрофільних, 30-40°C для мезофільних і 50-70°C для термофільних бактерій.

Продуцентами метанового бродіння є складні мікробні асоціації, що включають такі групи: *аеробні бактерії*, які перетворюють продукти деструкції целюлози; анаеробні ацетогенні бактерії *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, які ферментують утворені первинні метаболіти бродіння; метанутворюючі бактерії *Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungati*, для яких вищеназвані сполуки є подальшими поживними субстратами.

Усі метанові бактерії належать до анаеробів. Отже, природний процес розкладання органічних речовин субстрату за їх участю можливий лише без доступу кисню.

Субстратами для життєдіяльності кожної групи бактерій слугують певні органічні речовини, а саме: для бактерій-аеробів – полісахариди (целюлоза, геміцелюлоза); для ацетогенів – продукти деструкції целюлози (янтарна, пропіонова, масляна, молочна, оцтова кислоти, спирти, CO₂ і H₂); для метаногенів – ацетат (оцтова), форміат (мурашина) кислоти, CO₂ та H₂.

На останньому етапі продукти життєдіяльності метанових бактерій – ацетат, діоксид вуглецю та водень, перетворюються переважно на метан (90% цього газу утворюється саме в цей момент).

Слід зазначити, що попередній третій етап біосинтезу оцтової кислоти найбільш важливий, бо зумовлює швидкість процесу метанутворення. Оптимальний рівень рН при цьому підтримується на рівні 7 (коливання можуть відбуватися в діапазоні 6,6-8,0).

Анаеробне бродіння здійснюється в герметичній ємності – реакторі звичайної циліндричної форми горизонтального або вертикального розташування. Для ефективного бродіння в порожнині реактора необхідно підтримувати постійну температуру відповідно до прийнятого режиму бродіння: мезофільного або термофільного і здійснювати регулярне перемішування зброджуваної сировини.

Найбільш ефективними вважаються біореактори, що працюють у термофільному режимі. На таких установках з триденною ферментацією гною вихід біогазу становить 4,5 л на кожен літр корисного об'єму реактора. Об'ємна теплота згоряння біогазу складає 22 МДж/м³.

Перероблені анаеробними методами органічні відходи є цінним біодобрином, здатним підвищувати родючість ґрунтів – одного з найбільш цінних ресурсів держави, а також підвищувати конкурентоспроможність сільськогосподарської продукції.

Одна свиноматка із 20-24 поросятами дає у рік приблизно 25 м³ гною. У газовому еквіваленті це становить у середньому 1000 м³ біогазу. Економічно вигідно встановлювати біогазову установку на свинокомплексах з поголів'ям не менше 10-12 тис. свиней (650 свиноматок). Одна дійна корова щодня дає від 30 до 70 кг гною, що у середньому на рік дорівнює 20 м³, а це 800 м³ біогазу. БГУ буде економічно ефективною для ферм із поголів'ям від 800 дійних корів.

Біогазова установка приносить «доходи з відходів» або «гроші з гною». БГУ – це найактивніша система очищення, яка дуже швидко самоокуповується і дає прибуток. Сировиною може бути гній великої рогатої худоби, свиней, пташиний послід, відходи боєнь (кров, жир, кишки), рештки рослин, силос, прогниле зерно, каналізаційні стоки, жири, біосміття, відходи харчової промисловості, садові відходи, солодовий осад, вичавки, буряковий жом, технічний гліцерин (від виробництва біодизелю). Більшість видів сировини можна змішувати з іншими видами. Отже, БГУ одночасно та у великих кількостях може: утилізувати біовідходи, виробити біогаз, електроенергію, тепло, добрива, заощадити капітальні витрати (при будівництві нових комплексів).

Усе наведене вище виробляється за мінімальної собівартості, адже за біосміття не потрібно платити, а сама установка для власних потреб використовує лише 10-15% виробленої енергії.

Якщо на підприємстві утворюється 1 т гною щодня, то за рік на ньому можна отримати як мінімум 60-70 тис. грн, тобто окупність установки переробки гною вражає: 2-3 роки, а для деяких інших видів сировини – 1 рік. Біогаз може використовуватись як газ для опалення та вироблення електроенергії, і, порівняно з використанням звичайного природного газу, він низьковартісний.

З 1 м³ біогазу в генераторі можна виробити 2 кВт електроенергії, яка постачатиметься без перепадів. Тепло від охолодження генератора або від згоряння біогазу можна використовувати для опалення, сушіння насіння, дров, кип'ятіння води для утримання худоби. Тепло отримують під час спалювання газу спеціально, а також відбирають його при охолодженні

електрогенератора. Поряд з БГУ можна встановлювати теплиці. Тепло також може використовуватись для приведення в дію випарників рефрижераторів (при охолодженні свіжого молока на молочних фермах або для зберігання м'яса, яєць тощо).

Під час конверсії відходів у біогаз відбувається знешкодження відходів, розклад складних полімерів до простих сполук, більш відновлених і доступних для рослин. Таким чином, заброджена біомаса після метантенка за багатьма показниками в кілька разів краще за інші добрива (нативні гній, послід, торф та хімічні). Ось деякі з цих показників:

- відсутність насіння бур'янів;
- відсутність патогенної мікрофлори;
- наявність активної мікрофлори, яка сприяє інтенсивному росту рослин.

В забродженій масі після метантенку міститься біля 10^{14} колоній мікрофлори на грам, при цьому повністю відсутня патогенна мікрофлора;

- відсутність адаптаційного періоду. Заброджені добрива завдяки своїй формі починають ефективно працювати відразу після внесення у ґрунт;

- добриво у вигляді забродженої маси, в порівнянні з нативним гноєм, вимивається з ґрунту не більше 15%. Таким чином, внесені на поля у невеликій кількості заброджені добрива не втрачають свою ефективність на 3-5 років довше, ніж звичайні добрива;

- максимальне збереження і накопичення азоту. Завдяки анаеробному зброджуванню органічних відходів у біогазовій установці кількість загального азоту зберігається повністю, крім того, вміст розчинного азоту NH_4 збільшується на 10-15%;

- заброджені органічні добрива є екологічно-чистими добривами.

Україна має значний потенціал біологічних ресурсів для виробництва біогазу, використання якого надасть змогу забезпечити 4-7% річних енергетичних потреб країни. За даними Агентства з відновлюваної енергетики, у 2000 р. обсяг використання біогазу в Україні склав 0,02 ТВт·год, причому в перспективі прогнозується суттєве зростання даного показника: в 2030 р. – до 10,2 ТВт·год/рік, у 2050 р. – до 17,4 ТВт·год/рік.

Контрольні запитання

1. Які біологічні продукти можна використовувати в якості сировини для виробництва біогазу?
2. Які групи бактерій є продуцентами метанового бродіння?
3. Які проблеми вирішуються при використанні біогазових установок?
4. Які кінцеві продукти можна отримати при використанні біогазових установок?
5. Які переваги має добриво, отримане після біометаногенезу, у порівнянні зі звичайними добривами?

7. ГЕННО-МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ (ГМО) І БІОБЕЗПЕКА

Основним із постулатів необхідності широкого розповсюдження ГМО є потреба інтенсифікації розвитку сільського господарства. Згідно прогнозів населення Землі до 2050 року може сягнути 8-10 млрд. Тому вкрай потрібні абсолютно нові технології, що дозволять більш повно використовувати біологічний потенціал рослин. Саме ГМ-рослини, що мають змінені певні агрономічні та фізіологічні характеристики (стійкі до певних гербіцидів, шкідників і хвороб, до засолення, дії високих і низьких температур; склад, тривалість збереження, термін визрівання) і вирішать цю гостру проблему.

Нині ГМО поступово завойовують світ. На даний час трансформовано близько 140 видів різних рослин. Комерціалізовано (отримано дозвіл на вирощування у відкритих системах з промисловою метою, на використання як харчових продуктів чи як корму для тварин) відносно невелику їх кількість.

На світовому ринку трансгенних культур широко представлені: картопля, ріпак, бавовна, соя, цукровий буряк, кукурудза, папайя, люцерна та деякі інші рослини. Причому трансгенна соя поширена вже більше, ніж звичайна: її частка у світових посівах становить майже 80%, а в США – майже 90%.

7.1. ГМО, агрономічно важливі характеристики рослин; змінені поживні властивості та склад ГМ-продуктів

Останнім часом у галузі генної інженерії перелік завдань, які вирішують дослідники, значно розширився. Якщо перші роботи були зосереджені насамперед на трансформації рослин за ознаками, що можуть мати певне значення для сільського господарства (стійкість до вірусів, певних гербіцидів і шкідників), то зараз спектр питань у цьому напрямку значно більший. На сьогодні існують три покоління ГМ-культур:

Перше покоління – рослини, модифіковані з метою надання їм стійкості до біотичних і абіотичних факторів:

- стійкість до комах-шкідників (СК – стійкий до комах; англ. *IR – insect resistance* або *Bt – Bacillus thuringiensis* – бактерії, гени якої використовуються) – модифікації кукурудзи, бавовнику;

- стійкість до використання гербіцидів (ГС – гербіцидо-стійкий; англ. – *herbicide-tolerance crops*), тобто продовження життєдіяльності після загибелі оточуючих бур'янів – модифікації сої, кукурудзи, бавовнику, ріпаку.

- модифікації, стійкі до вірусних (наприклад, папайя), грибкових і бактеріальних інфекцій.

- культури, стійкі до абіотичних факторів (морозу, посухи тощо). У 2013 р. в США вперше почали вирощувати посухостійку кукурудзу.

Виведено модифікації культур, одночасно стійких до двох і більше факторів, тобто *стекерні* генні модифікації (кукурудза, стійка до гербіцидів і комах-шкідників).

Друге покоління – рослини, модифіковані з метою поліпшення їхніх властивостей. Наприклад, насіння олійних культур зі зміненим профілем жирних кислот, високо-амілазна кукурудза, лінії рослин із підвищеним вмістом

незамінних амінокислот, мінералів і вітамінів. Також відомий «золотий» рис, який містить значну кількість провітаміну А. Подібні процеси, спрямовані на збільшення кількості поживних речовин, називаються *біофортифікацією*.

Третє покоління – організми, які модифіковано з метою використання при виробництві ферментів, хімічних сполук для фармакологічних препаратів, пластмас, здатних розкладатися тощо. Дослідження знаходяться на початковому етапі.

У 2013 р. майже 18 млн фермерів у 28-ми країнах світу засіяли біотехнологічними культурами 175,2 млн га. Це понад чотири ріллі України. Ще в 31-й країні надано дозвіл на імпорт і використання ГМ-рослин як продуктів харчування та кормів. Посівні площі під культурами з привнесеними ознаками збільшилися у період з 1996 р. по 2013 р. (з початку комерційного впровадження трансгенних культур) у 100 разів, що є безпрецедентним у новітній історії сільського господарства. У 2013 р. на ринок трансгенних культур допущено та культивуються понад 30 ліній ГМ-культур, переважна кількість яких належить до першого покоління, зареєстровано ГМ-культур: 27 ліній сої, 130 – кукурудзи, 3 – ріпаку, 7 – рису, 1 – пшениці, 31 – картоплі, 11 – томатів, хоча комерційно вирощується значно менша кількість ліній кожної культури. З 2015 р. вирощується вже 124 лінії ГМ-культур. Зараз акцент уваги перенесено на зміни біохімічних властивостей культур, які стосуються поліпшення смакових властивостей і збагачення їх корисними для людини речовинами. Зокрема, існують культури зі зміненим складом: вуглеводним – лінія картоплі, жирнокислотним – 7 ліній сої, амінокислотним – 2 лінії кукурудзи, а також 41 лінія кукурудзи зі зміненим метаболізмом вуглеводів та 8 ліній цієї рослини зі зміненою альфа-амілазною активністю.

До переваг вирощування культур стійких до гербіцидів відносять:

- зменшення витрат на обробку ґрунту, машинне обладнання та паливе;
- впровадження технологій захисту ґрунту або вирощування без його обробки, що додатково економить кошти (людські та паливні ресурси, зайняті на обробці ґрунту), а також зменшення ерозії ґрунту, додаткове утримання вологи;

- підвищення ефективності боротьби з бур'янами зменшує час збору культури, зростає рівень якості врожаю;

- зниження потенційного ризику через надлишок гербіцидів у ґрунті, які можуть зашкодити культурі в наступному сезоні, та зменшення витрат на гербіциди в подальших сезонах у результаті підвищення ефективності боротьби з ними.

Основні переваги вирощування стійких до комах культур:

- скорочення витрат палива (обробка інсектицидами відбувається з повітря);

- скорочення витрат на механізацію, збільшення вільного часу фермерів у результаті скасування процедури обприскування інсектицидами;

- поліпшення якості зерна за рахунок зменшення рівня мікотоксинів (у деяких країнах, наприклад, Іспанії та Філіппінах фермери отримують премію за продаж якісного зерна кукурудзи);

– зменшення шкоди здоров'ю фермерів через використання інсектицидів, що особливо актуально серед бідних фермерів у країнах, що розвиваються, через слабкі засоби індивідуального захисту.

В Україні ГМО у промислових масштабах з'явилися у 1997 р., коли «Монсанта» розпочала висаджувати ГМ-картоплю сорту «Новий лист» на експериментальних полях у Волинській, Ровенській, Черкаській та Київській областях. У 1999 р. біоТНК отримала висновок МОЗ на «Новий лист», як на безпечний продукт. «Монсанта» навіть хотіла зробити Україну своїм плацдармом у Європі і глобальним експортером насіння картоплі. Але у червні 1999 р. Мінагропром виніс негативний висновок, і 1300 т ГМ-картоплі було поховано на землях колгоспу ім. Шевченка Черкаської обл.

Британська *PG Economics* спільно з українським Інститутом харчової біотехнології та геноміки оцінила можливий економічний ефект від упровадження ГМ-технологій в українському аграрному секторі. Зокрема, впровадження ГМ-насіння на розсаду може збільшити щорічні прибутки країни на 525 млн дол. США. Сільськогосподарські біотехнології, якщо їх авторизують для використання в українських господарствах, забезпечать помітний економічний і продовольчий вигравш, піднімуть прибутковість господарств і зменшать ризики. Покращуватиметься й стан навколишнього середовища, оскільки фермери почнуть використовувати більш м'які гербіциди, а інсектициди замінять на стійкі до комах лінії культур.

Вчені пропонують застосувати ГМ-технології для вирощування чотирьох традиційних сільськогосподарських культур – сої, кукурудзи, ріпаку та цукрового буряка. Причому, пропонується брати такі ГМ-сорти рослин, які стійкі до гербіцидів, а кукурудзи – ще й до певних видів комах-шкідників. Незважаючи на повну заборону використання в Україні генно-модифікованих сортів рослин, більша частина сої в Україні вирощена із застосуванням гербіцидо-толерантної технології. Крім того, в Україні застосовують сорти кукурудзи, які стійкі до різних шкідників. Існує ще кілька економічно обґрунтованих аргументів щодо легалізації ГМ-технологій в Україні. За оцінками фахівців, їх використання має підвищити врожайність і, відповідно, збільшити валовий збір. У результаті використання толерантних до гербіцидів ГМ-культур вплив гербіцидів на довкілля скоротиться на 15-24%. Скорочення кількості обробок пестицидами дасть змогу заощадити від 0,78 до 1,56 млн л пального; в атмосферу буде викинуто менше вуглекислого газу – від 2,73 до 5,35 млн кг.

В Україні щорічний прибуток на рівні фермерських господарств за визначеними перевагами застосування ГМ-культур може становити для ГМ-сої від 28 до 66 млн дол. США при 50%-ному рівні запровадження і від 50 до 119 млн дол. США при 90%-ному рівні, який є типовим для більшості країн. Залежно від рівня запровадження ГМ-кукурудзи (50 або 70%) щорічний додатковий прибуток фермерських господарств становитиме від 46 до 111 млн дол. США.

7.2. Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО

Питання заборони чи, як мінімум, обмеження використання ГМО зумовлено, насамперед, тим, що проблема можливого впливу ГМО на людину та і біосферу є недостатньо вивченою. Навіть захисники ГМО не дають твердої гарантії їх безпеки. Однак, з їх точки зору, ризик є виправданим.

Можна виділити декілька основних аспектів потенційної небезпеки ГМО.

З огляду впливу на агроecosистеми та природні біоценози:

1. Можливість переносу генів ГМ-культур на диких родичів модифікованих культур. Один із наслідків – зниження біологічного різноманіття.

2. Горизонтальний перенос генів на немодифіковані сорти рослин тих самих, що і модифіковані, видів.

3. Формування нових рас комах, стійких до Bt-токсинів, котрі утримуються у відповідним чином модифікованих культурах.

4. Стійкі до шкідників культури можуть виявитися небезпечними як для шкідників, так і для інших безхребетних (як не пов'язаних, так і пов'язаних між собою трофічними ланцюгами).

5. Провокування підвищеного використання хімічних засобів захисту при культивування гербіцидостійких ГМ-рослин.

6. Можливість появи «супербур'янів» (ген стійкості до гербіцидів може передаватись на споріднені рослини різними шляхами: анемохорія (*пасивне поширення плодів, насіння, спор та ін. повітряними течіями, іноді на досить великі відстані*), анемофілія (*вітрозапилення*), через пилок).

Біолого-соціально-економічні наслідки використання ГМО:

1. ГМ-культури, що використовуються у харчових продуктах, можуть привносити в них нові алергени, внаслідок чого постраждають люди з підвищеною чутливістю до алергенів.

2. Привнесення до рослин генів резистентності до антибіотиків, що використовуються біотехнологічними компаніями як маркери, може зумовити підвищену стійкість патогенної мікрофлори людини до відповідних бактерій.

3. Підвищення рівня токсичних речовин у рослинах.

4. Монополізація сільськогосподарських ринків корпораціями, що випускають ГМ-рослини за рахунок закупівлі насінневих компаній.

Генетичний ризик та біобезпека у біоінженерії. Вбудова в ДНК реципієнтної клітини чужорідного донорського гена співпорядковано з певними труднощами, головними з яких є:

- забезпечення точної адресної вставки гена чи групи генів, а також їх нормального функціонування – експресії. Ця проблема існує постійно і її вирішення у багатьох випадках поки що носить у значній мірі випадковий характер;

- можливого отримання мутантів, що створюють токсичні чи алергенні для людини білки або інші небезпечні сполуки. Реальний ризик, пов'язаний з появою чужорідного гена у реципієнтній клітині, гіпотетично завжди

присутній. Це, перш за все, може бути зумовлено *плейотропним ефектом (плейотропія - явище множинної дії гена. Виражається в здатності одного гена впливати на кілька фенотипічних ознак. Таким чином, нова мутація в гені може вплинути на деякі або всі пов'язані з цим геном ознаки)*;

- можливого індукування ендогенних систем рекомбінації і активації генів, що «мовчать»;

- спонтанний перенос із пилком в інші рослини генів-модифікаторів, при взаємодії яких можлива поява нових генотипів з небезпечними для людини і довкілля властивостями.

Все це дає підстави вважати, теоретично можливим виникнення при трансгенозі генотипів, небезпечних для здоров'я і життя людини. Ризик отримання таких мутантів значно збільшується при використанні штучних, синтетичних генів для отримання трансгенних рослин, тварин і мікроорганізмів з поліпшеними і принципово новими властивостями.

Явища і закономірності, що зумовлюють багаторічну стабільність біобезпеки у біоінженерії. Багаторічна стабільна біобезпека у біоінженерії зумовлена наступними основними явищами і закономірностями:

1. Використання природних генів, котрі протягом усієї еволюції приймали і приймають участь у рекомбіногенезі, у процесі якого напрацьовано механізми на усіх рівнях організації біологічних об'єктів, що забезпечують стійкий характер репарації порушених процесів біосинтезу білків;

2. Розробкою і постійним застосуванням ефективних методів моніторингу за якістю отримуваних трансгенних організмів і перш за все – за складом і властивостями білкових компонентів новостворених генотипів, що дозволяє заздалегідь, ще на етапі створення ГМО, виявляти небезпечні для людини і довкілля генотипи і не допускати їх випуску із лабораторії для використання у виробництві та продовольчому оберті;

3. Відбором відомих, перевірених природних генів та їх регуляторних генетичних структур і створенням на їх основі векторів, що забезпечують отримання трансгенів із заданими властивостями.

Показники і методи оцінки біобезпеки ГМО та отримуваних із них продуктів.

Важливим етапом оцінки біобезпеки ГМО і отриманих з них харчових та інших продуктів є санітарно-гігієнічна експертиза, яку проводять за рядом показників: хімічний склад вихідних і трансгенних рослин, біологічній цінності і рівню засвоєння продуктів, приготуваних із ГМО, виявлення токсичних, канцерогенних, мутагенних і алергенних речовин у продуктах, отриманих на основі використання ГМО, оцінці впливу ГМО на репродуктивні функції тварин і людини.

Випробування генетично змінених рослин на біобезпеку здійснюють за наступними напрямками:

- перевірка генів, інтегрованих до геному рослин, на здатність до успадкування та переносу до інших рослин;

- оцінка впливу нових генів на стійкість рослин до хвороб і шкідників;

- виявлення і аналіз характеру мінливості ґрунтової мікрофлори та інших складових біоценозу під впливом трансгенних рослин.

Обов'язковою і вкрай важливою є медико-біологічна оцінка харчової продукції, отриманої із ГМО.

Питання для самоперевірки

1. В чому полягає різниця між ГМ-рослинами трьох поколінь?
2. В чому полягають переваги вирощування культур стійких до гербіцидів?
3. В чому полягають переваги вирощування стійких до комах культур?
4. Які існують аспекти потенційної небезпеки ГМО?
5. Які труднощі існують при введенні в ДНК реципієнтної клітини чужорідного донорського гена?
6. Чим обумовлена біобезпека у біоінженерії?
7. За якими напрямками здійснюють випробування генетично змінених рослин на біобезпеку?

ПРИКЛАДИ РІШЕННЯ ЗАДАЧ З КУРСУ „БІОТЕХНОЛОГІЯ”

1. Розшифрування генетичної інформації

Більшість генів містять в закодованому вигляді інформацію про синтез білків. Основною структурною одиницею білків є амінокислоти. Усі амінокислоти мають подібну хімічну будову і розрізняються лише боковим ланцюгом (R-групою). Існує 20 різних бокових груп і, відповідно, 20 амінокислот. В таблиці 2 наведені одно- і трибуквені позначення амінокислот.

Таблиця 2

Амінокислоти та їх позначення

Амінокислота	Трибуквені позначення	Однобуквені позначення
Аланін	Ala	A
Аргінін	Arg	R
Аспарагін	Asn	N
Аспарагінова кислота	Asp	D
Валін	Val	V
Гістидин	His	H
Гліцин	Gly	G
Глютамін	Gln	Q
Глютамінова кислота	Glu	E
Ізолейцин	Iso	I
Лейцин	Leu	L
Лізін	Lys	K
Метіонін	Met	M
Пролін	Pro	P
Серін	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонін	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенілаланін	Phe	F
Цистеїн	Cys	C

Кожна амінокислота кодується в ДНК групою нуклеотидів, яка має назву кодон. Вважаючи, що у білку 20 амінокислот, а у молекулі ДНК всього чотири типи нуклеотидів, кодон повинен складатися як найменш з трьох нуклеотидів. В цьому випадку можливо 64 (4^3) тринуклеотидних комбінації, а цього достатньо для кодування усіх амінокислот білку. Три кодони – UGA, UAG, UAA – це стоп-кодони, а один – AUG – старт-кодон, який кодує ще і амінокислоту метіонін (табл.3). Якщо кодон AUG знаходиться не на початку молекули мРНК (матричної, або інформаційної РНК), а всередині неї, то він розпізнається іншою тРНК (транспортною РНК) і розшифровується, як метіонін.

Таблиця 3

**Генетичний код і частота використання різних кодонів у геномі
E.coli і людини**

Кодон	Амінокислота	Частота використання		Кодон	Амінокислота	Частота використання	
		E. coli	людина			E. coli	людина
GGG	Гліцин	0,13	0,23	UAG	Стоп	0,09	0,17
GGA	Гліцин	0,09	0,26	UAA	Стоп	0,62	0,22
GGU	Гліцин	0,38	0,18	UAU	Тирозин	0,53	0,42
GGC	Гліцин	0,40	0,33	UAC	Тирозин	0,47	0,58
GAG	Глутамінова кислота	0,30	0,59	UUU	Фенілаланін	0,51	0,43
GAA	Глутамінова кислота	0,70	0,41	UUC	Фенілаланін	0,49	0,57
GAU	Аспарагінова кислота	0,59	0,44	UCG	Серін	0,13	0,06
GAC	Аспарагінова кислота	0,41	0,56	UCA	Серін	0,12	0,15
GUG	Валін	0,34	0,48	UCU	Серін	0,19	0,17
GUA	Валін	0,17	0,10	UCC	Серін	0,17	0,23
GUU	Валін	0,29	0,17	AGU	Серін	0,13	0,14
GUC	Валін	0,20	0,25	AGC	Серін	0,27	0,25
GCG	Аланін	0,34	0,10	CGG	Аргінін	0,08	0,19
GCA	Аланін	0,22	0,22	CGA	Аргінін	0,05	0,10
GCU	Аланін	0,19	0,28	CGU	Аргінін	0,42	0,09
GCC	Аланін	0,25	0,40	CGC	Аргінін	0,37	0,19
AAG	Лізін	0,24	0,60	AGG	Аргінін	0,03	0,22
AAA	Лізін	0,76	0,40	AGA	Аргінін	0,04	0,21
AAU	Аспарагін	0,39	0,44	CAG	Глютамін	0,69	0,73
AAC	Аспарагін	0,61	0,56	CAA	Глютамін	0,31	0,27
AUG	Метіонін, старт	1,00	1,00	CAU	Гістидин	0,52	0,41
AUA	Ізолейцин	0,07	0,14	CAC	Гістидин	0,48	0,59
AUU	Ізолейцин	0,47	0,35	CUG	Лейцин	0,55	0,43
AUC	Ізолейцин	0,46	0,51	CUA	Лейцин	0,03	0,07
ACG	Треонін	0,23	0,12	CUU	Лейцин	0,10	0,12
ACA	Треонін	0,12	0,27	CUC	Лейцин	0,10	0,20
ACU	Треонін	0,21	0,23	UUG	Лейцин	0,11	0,12
ACC	Треонін	0,43	0,38	UUA	Лейцин	0,11	0,06
UGG	Триптофан	1,00	1,00	CCG	Пролін	0,55	0,11
UGU	Цистеїн	0,43	0,42	CCA	Пролін	0,20	0,27
UGC	Цистеїн	0,57	0,58	CCU	Пролін	0,16	0,29
UGA	Стоп	0,30	0,61	CCC	Пролін	0,10	0,33

Для розшифрування нуклеотидної послідовності необхідно пам'ятати, що, наступні кодони обов'язково присутні в якості регуляторних елементів:

- UGA, UAG, UAA – стоп (термінус)
- AUG – старт (сайт ініціації)
- AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів (наприклад STAGU). В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд зі старт-кодоном, синтезується набір окремих білків. Якщо старт-кодону нема, спостерігається нонсенс-мутація і наступний білок не синтезується.

Приклад 1. Враховуючі дані, що наведені у таблицях 2 і 3 складіть

1. Найбільш вірогідну нуклеотидну послідовність, яка кодує наступну амінокислотну послідовність

Для людини: DTCFYLNYE

Відповідь:

D – аспарагінова кислота	GAC
T – треонін	ACC
C – цистеїн	UGC
F - фенілаланін	UUC
Y - тирозин	UAC
L – лейцин	CUC
N - аспарагін	AAC
Y-тирозин	UAC
E – глютамінова кислота	GAG

Таким чином, нуклеотидна послідовність, що кодує амінокислотну послідовність, з урахуванням регуляторних елементів, має наступний вигляд:

AACUG-UGCUG-AUG-GAC-ACC-UGC-UUC-UAC-CUC-AAC-UAC-GAG-UAA

Приклад 2. Якої амінокислотної послідовності відповідає наступна нуклеотидна послідовність

1	2	3.	4
AACUG-AAUUG-AUG-GGC-GAG-GAC-GUG-GCG-GCU-AAG-AAC-UAA			

Відповідь: 1,2,3,4 – регуляторні послідовності

GGC - гліцин

GAG – глютамінова кислота

GAC – аспарагінова кислота

GUG - валін

GCG - аланін

GCU - аланін

AAG - лізин

AAC – аспарагін

GEDVAAKN

2. Будова рестрикційних карт ДНК

Обробка зразку ДНК певною рестриказою завжди дає один той самий набір фрагментів – за умовою розщеплення по всіх сайтах рестрикції. Якщо використовувати однакові (клоновані) фрагменти ДНК і спочатку обробити ДНК кожної з рестриказ окремо, а потім їх комбінацією, можливо побудувати

фізичну карту даного фрагменту ДНК, тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції уздовж молекули.

Для будови рестрикційної карти, необхідно порівняти розміри фрагментів, отриманих при роздільній рестрикції і при рестрикції сумішню ферментів.

Приклад 3

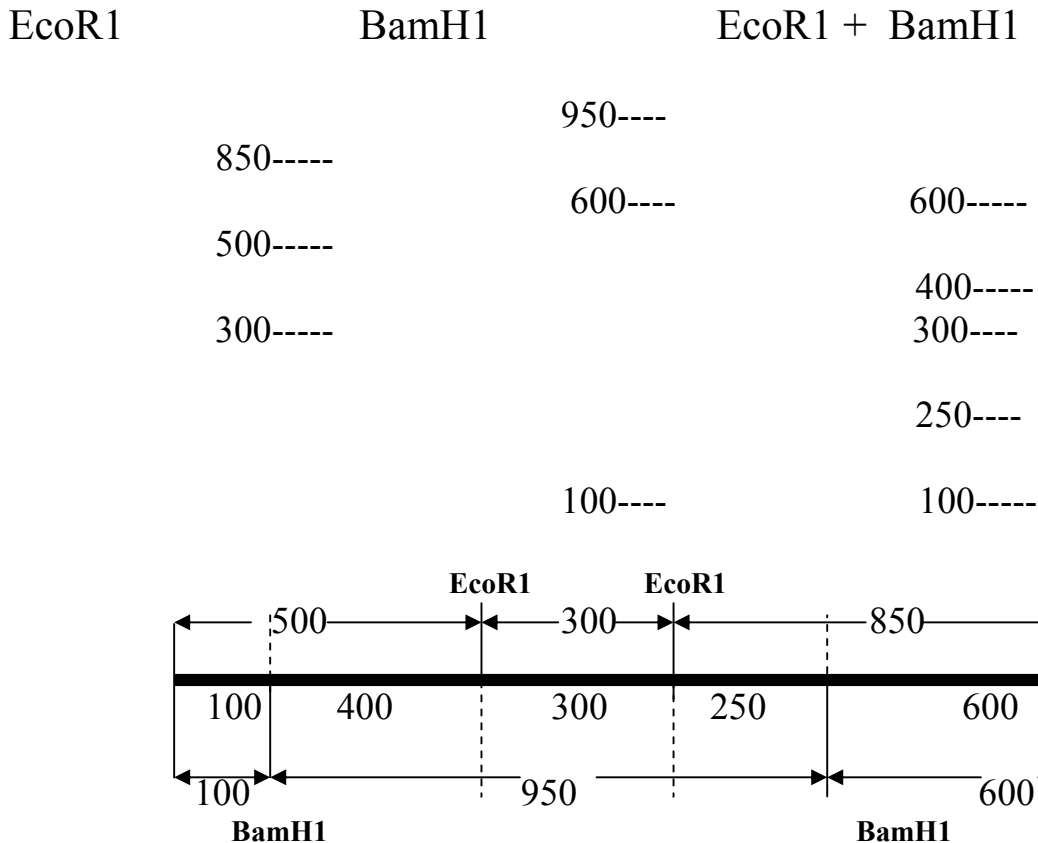


Рис.1. Картування сайтів рестрикції

Якщо при гідролізі ДНК кожної з двох рестриказ (EcoR1 і BamH1) утворюються три фрагменти, то у початковому фрагменті ДНК було два сайти узнавання для кожної з використаної рестриказ. Фрагмент розміром 300 п.н., який утворюється в результаті гідролізу EcoR1, не розщеплюється при гідролізі сумішню EcoR1 і BamH1 на відміну від EcoR1-фрагментів 850 і 500 п.н. Тобто, два EcoR1-сайти знаходяться на відстані 300 п.н. один від одного і між ними нема BamH1-сайту, а у EcoR1-фрагментах довжиною 850 і 500 п.н. є по одному BamH1-сайту. Фрагмент BamH1-сайту довжиною 950 п.н. розщеплюється EcoR1 на три фрагменти (250+300+400=950 п.н.). Таким чином, два BamH1-сайти знаходяться на відстані 250 і 400 п.н. по різні боки від сайтів для EcoR1. BamH1 розщеплює EcoR1-фрагмент довжиною 850 п.н. на фрагменти довжиною 250 і 600 п.н., а один з сайтів для EcoR1 знаходиться на відстані 250 п.н. від сайту для BamH1, тобто, фрагмент 600 п.н. повинен містити один з кінців початкової молекули ДНК. Оскільки BamH1 розщеплює EcoR1-фрагмент довжиною 500 п.н. на дві частини розміром 100 і 400 п.н., а

один з EcoR1-сайтів відділений від BamH1-сайту 400 п.н., то фрагмент довжиною 100 п.н. повинен міститися в іншому кінці початкової молекули ДНК.

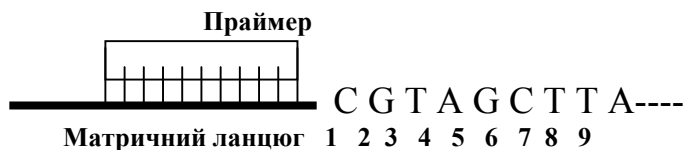
3. Методи секвенування ДНК

Одним із способів *секвенування* (встановлення нуклеотидної послідовності ділянки гену) є так званий дидезоксинуклеотидний метод.

Дидезоксинуклеотид – це отриманий штучним шляхом нуклеотид, позбавлений 2'- і 3'- гідроксильних груп при вуглеводних атомах цукрового кільця. Приєднання цього нуклеотиду до ланцюгу ДНК що росте, зупиняє синтез ДНК. Зупинка синтезу ДНК – це ключової етап дидезоксиметоду, але для того, щоб секвенування здійснилося в повному обсязі, необхідно виповняти ще декілька умов.

Перший крок стандартної процедури – це створення штучного олігонуклеотиду довжиною 17-20 ланок і гібридизація його із специфічною ділянкою одного з ланцюгів ДНК, яка знаходиться поряд з ділянкою, що визначається.

Приклад 4



Реакційна суміш	Праймер і довжина добудованої послідовності	Праймер і добудована послідовність
ddATP+ чотири dNTP	Праймер + 3 Праймер + 7 Праймер + 8	Праймер-dGdCddA Праймер-GdCdAdTdCdGddA Праймер-dGdCdAdTdCdGdAddA
ddCTP+ чотири dNTP	Праймер + 2 Праймер + 5	Праймер-dGddC Праймер-dGdCdAdTddC
ddGTP+ чотири dNTP	Праймер + 1 Праймер + 6	Праймер-ddG Праймер-dGdCdAdTdCddG
ddTTP+ чотири dNTP	Праймер + 4 Праймер + 9	Праймер-dGdCdAddT Праймер-GdCdAdTdCdGdAdAddT

Рис.3 Ріст праймеру при синтезі ланцюгу в присутності дидезоксинуклеотидів

Нуклеотид є праймером здійснює ініціацію синтезу нуклеотидних послідовностей комплементарних ділянці, що визначається, за рахунок постачання 3'-гідроксильної групи. При встановленні нуклеотидної послідовності необхідно пам'ятати про правило компліментарності, відповідно якого створюється новий ланцюг: $A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$. Розчин з праймером

розподіляють по чотирьох пробірках, в кожній з них містяться по чотири дезоксинуклеотиди (dNTP), на підставі яких синтезується ланцюг ДНК, - dATP, dCTP, dTTP, dGTP, (один з них мічений ізотопом), і один з чотирьох дидезоксинуклеотидів (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP). Концентрація кожного з dd-нуклеотидів підбирають таким чином, щоб він був включений по всіх позиціях в суміші ланцюгів що ростуть. По закінченню синтезу за участю ДНК-полімерази в кожній пробірці виявляється унікальний набір олігонуклеотидів, кожен з яких містить праймерну послідовність.

Приклад 5

Для розходження ланцюгів в пробірки додають формамид і проводять електрофорез у поліакриламідному гелі на чотирьох доріжках (по числу пробірок).

ddATP	ddCTP	ddTTP	ddGTP	3'
—				T
	—			G
	—			G
		—		A
—				T
			—	C
			—	C
		—		A
—				T
	—			G
			—	C
		—		A
	—			G
			—	C
—				T
		—		A
			—	C
	—			G
		—		A
				5'

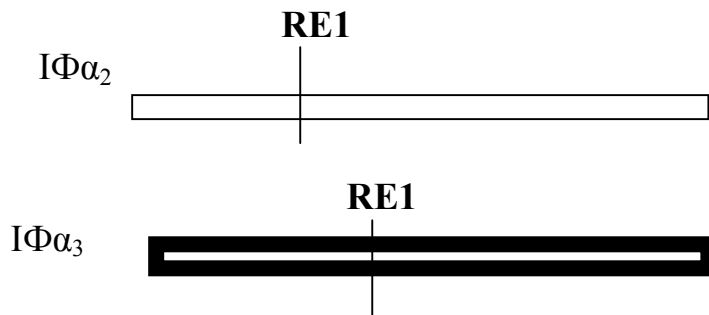
На радіоавтографі виявляється набір смуг, що відповідає міченим фрагментам ДНК, зіставлення яких надає можливість безпосередньо «прочитати» нуклеотидну послідовність сегменту ДНК, який досліджувався. Найбільш «швидка» смуга (радіоактивно мічений фрагмент у самому низу гелю) відповідає найкоротшому фрагменту. В нашому прикладі це олігонуклеотид, що знаходиться на доріжці ddGTP, оскільки для розв'язування завдання необхідно пам'ятати про правило компліментарності: $A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$.

4. Створення гібридних інтерферонів

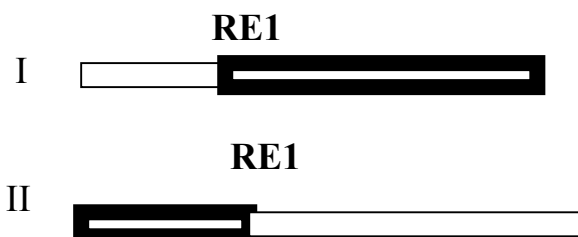
Приклад 6

Виявилось, що існує три групи інтерферонів: α -інтерферони (ІФ α), що створюються при дії вірусів на лейкоцити, β -інтерферони (ІФ β), що створюються при дії вірусів на фібробласти, γ -інтерферони (ІФ γ), які також мають назву імунні, і створюються Т-лімфоцитами у відповідь на дію антигенів, або антигенних детермінант.

ІФ α кодуються сімейством генів, що складається приблизно з 20 ні алельних генів. Підтипи ІФ α виявляють різну специфічність і мають власні особливості. Поєднати ці особливості в одній молекулі ІФ α можливо за рахунок створення комбінованого гібридного гену. Порівняння послідовностей кДНК (клонувана ДНК, яку отримують на підставі зрілої мРНК за допомогою ревертази) ІФ α_2 і ІФ α_3 показало, що вони містять однакові сайти рестрикції RE1, RE2, RE3 в позиціях 60, 92 і 150. Після розщеплення і наступного лігування фрагментів було отримано декілька гібридних генів.



Варіанти створених інтерферонів:



5. Генетична рекомбінація

Приклад 7

Надано ділянку мРНК і білок, який вона кодує:

AGU ACG GCU
Ser Thr Ala

Дві точкові мутації у ланцюгу ДНК, що виконує кодування, викликали

такі зміни, що при трансляції цієї мРНК синтез білку зупиняється після першого кодону, а перша амінокислота залишилась *Ser*.

Визначити характер цих мутацій.

Синтез зупиняється, якщо замість наступного кодона створюється стоп-кодон: $ACG \rightarrow UAG$, відбулися мутації – $A \rightarrow U$; $C \rightarrow G$

Приклад 8

Ділянка гена, що кодує поліпептид, транскрибується у мРНК наступного виду:

лізін валін лізін лейцин лізін гліцин
5' – AAA GUU AAA CUG AAA GGC - 3'

Які зміни будуть спостерігатися в поліпептиді, якщо відбулось випадання 5 і 9-го нуклеотидів у смислового ланцюгу ДНК?

Визначить смисловий ланцюг ДНК:

5' – AAA GUU AAA CUG AAA GGC - 3'
3' – TTT CAA TTT GAC TTT CCG - 5'
16 7 18 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Після випадання створився наступний ланцюг ДНК:

3' – TTT CAA TTT AC TT CCG - 5'; на його підставі буде синтезуватися нова мРНК:

5' – AAA GUU AAA UGA AGG C - 3'
лізін валін лізін стоп

Питання до контрольної роботи з дисципліни „Біотехнологія”

1. Задачі сучасної біотехнології, основні етапи біотехнологічного процесу.
2. Розділи біотехнології та їх призначення
3. Використання досягнень біотехнології у різних галузях народного господарства
4. Генетична інженерія – галузь молекулярної біотехнології
5. Будова ДНК, генетичний код, його розшифровка
6. Реалізація генетичної інформації у бактеріях, модель оперона, регулони
7. Структура гена еукаріот, особливості транскрипції, ділянки, що забезпечують регулювання роботи генів (атенуатори, енхансери, ТАТА-бокс, ГЦ-бокс).
8. Види точкових мутацій, мутації типу зсуву рамки зчитування, генетичні наслідки точкових мутацій
9. Ферменти генетичної інженерії
10. ПЛР-ампліфікація, реакції з яких складається процес, ферменти, що використовуються для здійснення ПЛР
11. Розподіл фрагментів ДНК і будова рестрикційних карт
12. Методи визначення клонів, що містять необхідну послідовність ДНК: скринінг за допомогою ДНК-зонду, за активністю білку, імунологічний скринінг.
13. Методи секвенування – визначення нуклеотидної послідовності
14. Методи конструювання рекомбінантних ДНК
15. Створення і скринінг бібліотек генів
16. Векторні молекули, типи векторів, вимоги до векторів
17. Шляхи введення ДНК у клітини. Трансформація.
18. Плазмідні і кон'югація, процес мобілізації плазмід
19. Фаги і трансдукція, метод упакування ДНК фага в зрілий капсид *in vitro*
20. Транспозони, види транспозицій
21. Інтерферони, способи їх синтезу, гібридні інтерферони
22. Способи синтезу інсуліну, генно-інженерний інсулін
23. Гормон росту соматотропін
24. Лікарські засоби проти ВІЛ
25. Вакцини нового покоління, методи генної інженерії для їх створення
26. Напрями створення трансгенних тварин
27. Введення чужорідного гена в геном тварини за допомогою ретровірусних векторів, методом мікроін'єкцій.
28. Введення чужорідного гена в геном тварини при використанні модифікованих ембріональних стовбурових клітин. Використання сперматозоїдів у якості векторів трансгена.

29. Етапи створення трансгенних корів. Проблеми, які можуть виникнути при інтеграції трансгена.
30. Трансгенні риби
31. ГМО, агрономічно важливі характеристики рослин; змінені поживні властивості та склад ГМ-продуктів
32. Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО.
33. Історія розвитку клітинної інженерії.
34. Властивості клітинних культур, ліміт Хейфліка, гіпотези, що пояснюють їх старіння і загибель.
35. Поведінка клітин у культурі. Причини зміни функцій клітин у культурі. Умови культивування клітин.
36. Отримання гібридних клітин, можливості методу злиття клітин.
37. Гібридомна технологія. Схема отримання гібридом.
38. Моноати, їх переваги та недоліки. Шляхи використання моноатів.
39. Можливості методу трансплантації ембріонів.
40. Етапи трансплантації ембріонів. Вимоги до корів донорів та реципієнтів ембріонів.
41. Способи синхронізації статевої охоти, стимуляція суперовуляції у тварин, особливості штучного осіменіння.
42. Способи вилучення і пересадки ембріонів та оцінка їх життєздатності.
43. Способи кріоконсервації ембріонів тварин.
44. Проблеми, що виникають при кріоконсервації ембріонів, та шляхи їх подолання. Кріопротектори зовнішні і внутрішні.
45. Способи розділення ембріонів. Перспективи використання генетично подібних тварин.
46. Якісні характеристики генетичного матеріалу для отримання монозиготних близнюків.
47. Значення прозорої оболонки для процесів трансплантації і зберігання ембріонів.
48. Перспективи методу отримання ембріонів поза організмом.
49. Дозрівання ооцитів *in vitro*.
50. Капацитація сперматозоїдів, методи капацитації.
51. Методи запліднення яйцеклітин *in vitro*. Причини виникнення поліспермії
52. Можливі методи культивування ембріонів.
53. Напрями застосування процесів клонування тварин.
54. Типи ембріонального клонування тварин. Основні етапи клонування. Отримання клітин-реципієнтів ядер.
55. Способи пересадки ядра ембріональних клітин в енуклеювані яйцеклітини.
56. Ембріональне клонування при використанні ядер ембріональних стовбурових клітин (ЕСК).
57. Пересадка ядер соматичних клітин дорослого організму в енуклеювану клітину, „соматичне клонування”.

58. Ознаки диференціації статі у ссавців: тільце Барра, Н-Ү-антиген
59. Методи попереднього відбору гамет за статтю.
60. Імунологічні методи визначення статі ембріонів, використання ДНК-зонду, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)
61. Партеногенез, його види.
62. Способи активації партеногенезу.
63. Химери, методи одержання химерних зародків.
64. Можливості використання химерних ембріонів.
65. Стадії біотехнологічного виробництва. Вимоги до мікроорганізмів-продуцентів. Типи ферментації.
66. Сировина для біотехнологічних виробництв. Субстрати, види субстратів.
67. Виробництво білка і незамінних амінокислот.
68. Використання нетрадиційних продуктів для покращення кормової бази.
69. Біотехнологічна консервація кормів.
70. Біотехнологічна інтенсифікація процесів травлення в рубці жуйних.
71. Методи переробки і консервування харчових продуктів.
72. Бродіння, як спосіб зберігання харчових продуктів.
73. Використання ферментів для виробництва харчових продуктів. Проблеми, що виникають при використанні ферментів.
74. Іммобілізовані ферменти, нові властивості, що набувають ферменти завдяки іммобілізації.
75. Способи іммобілізації ферментів.
76. Напрями використання іммобілізованих ферментів у промисловості.
77. Мікроорганізми в якості контролю забруднення навколишнього середовища нафтою і нафтопродуктами.
78. Біомаса і енергія. Виробництво етанолу.
79. Біомаса і енергія. Виробництво біогазу.
80. Способи отримання генів.

ЗАДАЧІ

1. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoRI* і *BamHI* утворюються три фрагменти, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
300	550	100
450	600	200
1100	700	450
		500
		600

2. Визначити амінокислотну послідовність

UGA, UAG, UAA - стоп (термінус)

AUG - старт (сайт ініціації)

AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів.

В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд з старт-кодоном, синтезується набір окремих білків.

AACUGAAUUGAUGGGCGAGGACGUGGCGGCUAAGUAG

3. Визначити нуклеотидну послідовність

WCFLAVQTTSK

4. Визначити довжину і порядок добуваної за допомогою праймера послідовності

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

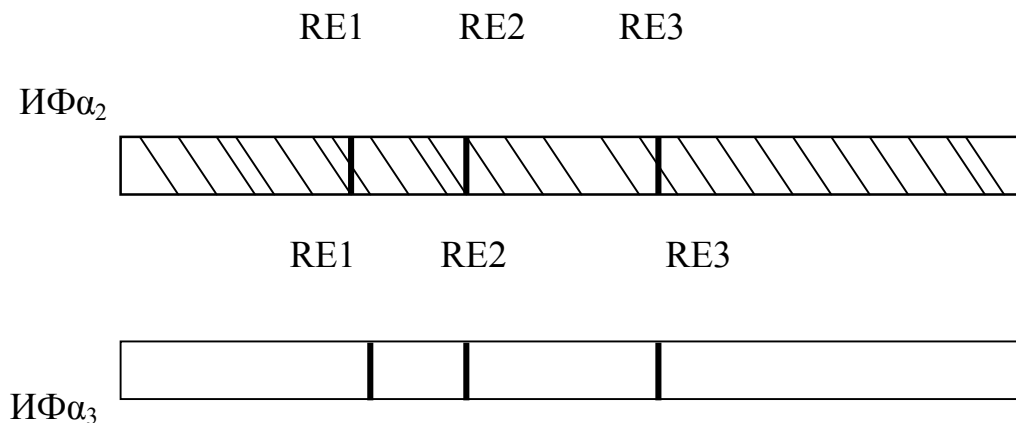
ddA Праймер + 3 Праймер + 6 Праймер + 11	ddG Праймер + 2 Праймер + 8 Праймер + 10
ddT Праймер + 1 Праймер + 5 Праймер + 7	ddC Праймер + 4 Праймер + 9

5. За допомогою зображення радіоавтографа визначити нуклеотидну послідовність

ddA	ddT	ddG	ddC	3'

5'

6. Вкажіть можливі варіанти гібридних генів, якщо початкові структурні гени інтерферонів $\text{IF}\alpha_2$ і $\text{IF}\alpha_3$ мають однакові сайти рестрикції.



7. За допомогою таблиці генетичного коду визначити, які зміни відбудуться в послідовності амінокислот у білку, якщо до 3'-кінця мРНК додати урацил? (Вважається, що для початку трансляції не потрібний кодон AUG).

5' – CAG UCG GAA CCA CGA GAU AAG CAU - 3'

Як зміниться послідовність амінокислот у білку, якщо до 5'-кінця мРНК додати аденін?

8. За допомогою генетичного коду надайте відповіді на наступні питання:

А. Визначити амінокислотну послідовність поліпептиду на підставі мРНК, враховуючи, що лише кодон AUG є ініціюючим:

5'- AUG UUC AAG AUG GUG ACU UGG UAA - 3'

Б. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо перший нуклеотид G замінити на C?

В. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо перший нуклеотид C замінити на U?

Г. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо перший нуклеотид C замінити на G?

Д. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо останній нуклеотид G замінити на A?

9. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoRI* і *BamHI* утворюються три фрагменти, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
150	250	100
500	450	150
750	700	300
		400
		450

10. Визначити амінокислотну послідовність

UGA, UAG, UAA - стоп (термінус)

AUG - старт (сайт ініціації)

AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів.

В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд з старт-кодоном, синтезується набір окремих білків.

AACUGAAGUGAUGAUUACAUGCUGAUCCACGACUAAGUAG

11. Визначити нуклеотидну послідовність

NCYNRAVQTDTA

12. Ділянка гена транскрибується в мРНК наступного виду:

5' – UAA CAA AGA ACA AAA – 3'

Які відбудуться зміни у поліпептиді, що транслюються з цієї мРНК, якщо перед транскрипцією у кодуєчому ланцюзі ДНК між 10 і 11 нуклеотидами включився цитозин, між 13 і 14 нуклеотидами гуанін, а в кінці додався тимін?

13. Визначити довжину і порядок добудованої за допомогою праймера послідовності :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

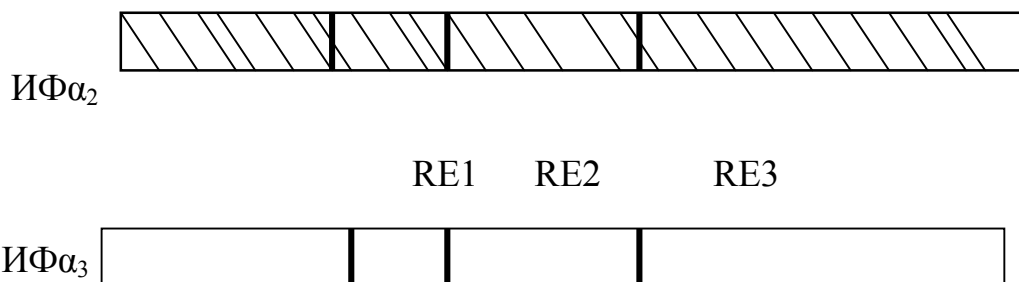
ddA Праймер + 1 Праймер + 3 Праймер + 9	ddT Праймер + 4 Праймер + 7
ddG Праймер + 2 Праймер + 5 Праймер + 8	ddC Праймер + 6 Праймер + 10

14. За допомогою зображення радіоавтографа визначити нуклеотидну послідовність

ddA	ddT	ddG	ddC	3'

5'

15. Вкажіть можливі варіанти гібридних генів, якщо початкові структурні гени інтерферонів ИФ α_2 і ИФ α_3 мають однакові сайти рестрикції.



16. Ділянка гена, що кодує поліпептид, транскрибується в мРНК наступного виду:

5' -AAG CAA CCA UUA GUA AUG AAG CAA CCC - 3'

Які відбудуться зміни у поліпептиді, що транслюються з цієї мРНК, якщо перед транскрипцією у кодуєчому ланцюзі ДНК між шостим і сьомим кодоном з'явилася вставка (Т)?

17. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoRI* і *BamHI* утворюються три фрагменти, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
300	200	150
400	450	200
750	800	250
		300
		550

18. Визначити амінокислотну послідовність

UGA, UAG, UAA - стоп (термінус)

AUG - старт (сайт ініціації)

AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів. В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд з старт-кодоном, синтезується набір окремих білків.

AACUGACUUGAUGUGUUUCACCAUAGAAGUUUCUAA

19. Визначити нуклеотидну послідовність

FNAVQTCTSL

20. Визначити довжину і порядок добудованої за допомогою праймера послідовності :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

ddA Праймер + 5 Праймер + 8 Праймер + 9	ddG Праймер + 6 Праймер + 4 Праймер + 10 Праймер + 12
ddT Праймер + 3 Праймер + 7	ddC Праймер + 1 Праймер + 2 Праймер + 11

21. За допомогою зображення радіоавтографа визначити нуклеотидну послідовність

ddA	ddT	ddG	ddC	3'

5'

22. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoRI* і *BamHI* утворюються три фрагменти, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
450	200	200
500	600	250
650	800	300
		350
		500

23. Визначити амінокислотну послідовність

UGA, UAG, UAA - стоп (термінус)

AUG - старт (сайт ініціації)

AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів. В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд з старт-кодоном, синтезується набір окремих білків.

AACUGAUUUGAUGGGGUUAUAAGGAUACACAAUUA

24. Надана електрофореграма, що отримана при забарвленні сріблом 4%-го денатуруючого поліакриламідного гелю, на який нанесено проби з продуктами ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (CSF1PO, TPOX і THO1), які використовують для ідентифікації особистості у зразках ДНК матері (М), дитини (Д) і трьох передбачуваних батьків (Б1, Б2, Б3). L – маркер, який складається з ампліфікованих фрагментів локусу, що вивчається, з різною кількістю повторів. Визначити генотипи і

встановити, який з передбачуваних батьків може бути виключений на підставі цього аналізу.

	L	M	Д	L	Б1	Б2	Б3	L
--	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	----------

CSF1P	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
	---	---		---	---			---
	---			---		---		---
	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
TPOX	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
	---	---		---	---			---
	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
THO1	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
	---	---		---	---			---
	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---
	---			---				---

25. За допомогою зображення радіоавтографа визначити нуклеотидну послідовність

ddA	ddT	ddG	ddC	3'

5'

26. Визначити нуклеотидну послідовність

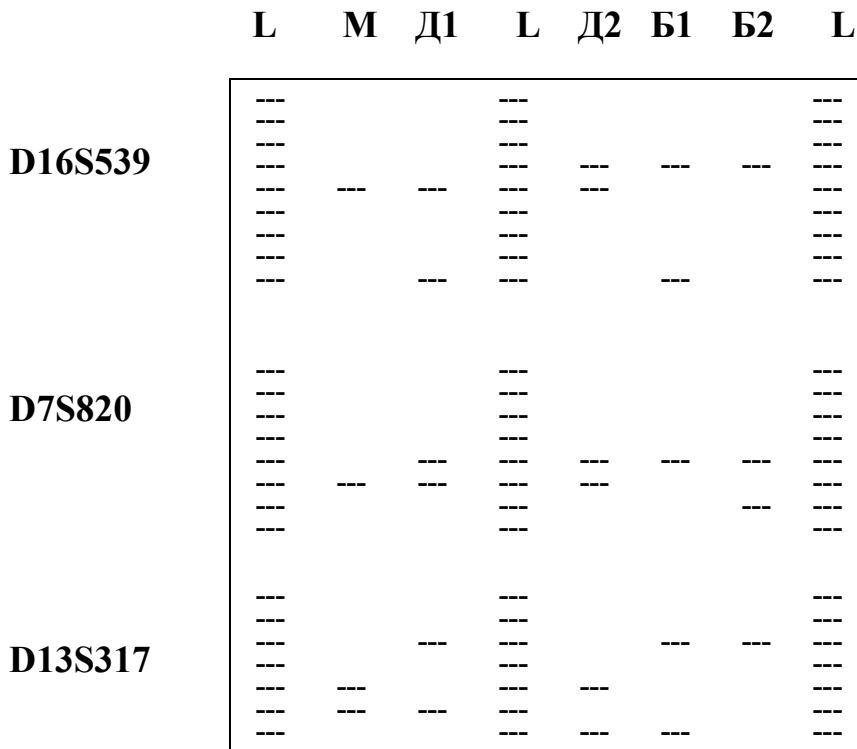
QSWVKNAGEI

27. Визначити довжину і порядок добудованої за допомогою праймера послідовності :

	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
--	-------------------------

ddA Праймер + 2 Праймер + 7 Праймер + 8	ddG Праймер + 3 Праймер + 6 Праймер + 9
ddT Праймер + 1 Праймер + 5 Праймер + 10	ddC Праймер + 4 Праймер + 11

28. Надана електрофореграма, що отримана при забарвленні сріблом 4%-го денатуруючого поліакриламідного гелю, на який нанесено проби з продуктами ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (D16S539, D7S820, D13S317), які використовують для ідентифікації особистості, у зразках ДНК матері (М), двох її дітей (Д1 Д2) і двох передбачуваних батьків (Б1, Б2).



29. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoRI* і *BamHI* утворюються три фрагменти, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
300	450	100
400	500	150
850	600	300
		400
		600

30. Визначити амінокислотну послідовність

UGA, UAG, UAA - стоп (термінус)

AUG - старт (сайт ініціації)

AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів.

В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд з старт-кодоном, синтезується набір окремих білків.

AACUGAUUUGAUGUUUAUACAAGGGUAAGGCAAUUA

31. Визначити нуклеотидну послідовність

QSNAGEIWVK

32. Визначити довжину і порядок добудованої за допомогою праймера послідовності :

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

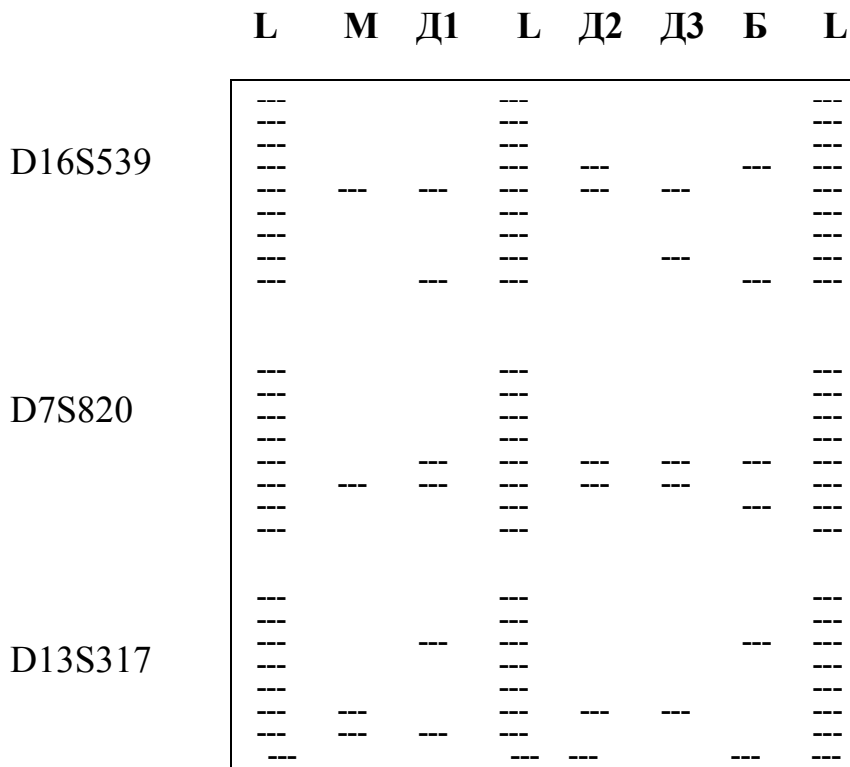
ddA Праймер + 4 Праймер + 7 Праймер + 9	ddG Праймер + 3 Праймер + 5 Праймер + 10
ddT Праймер + 1 Праймер + 8 Праймер + 12	ddC Праймер + 2 Праймер + 6 Праймер + 11

33. За допомогою зображення радіоавтографа визначити нуклеотидну послідовність

ddA	ddT	ddG	ddC	3'

5'

34. Надана електрофореграма, що отримана при забарвленні сріблом 4%-го денатуруючого поліакриламідного гелю, на який нанесено проби з продуктами ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (D16S539, D7S820, D13S317), які використовують для ідентифікації особистості, у зразках ДНК матері (М), батька (Б) і трьох їх дітей (Д1, Д2, Д3). L – маркер, який складається з ампліфікованих фрагментів локусу, що вивчається, з різною кількістю повторів. Визначити генотипи і встановити, хто з дітей не може бути дитиною цього батька.



35. Ділянка гена, що кодує поліпептид, транскрибується в мРНК наступного виду:

5' – GAA CGA UCC GGC CAG – 3'

Які зміни відбудуться у поліпептиді, що транслюється із цієї мРНК, якщо в ДНК відбулася інверсія ділянки, що відповідає 2-7 нуклеотидам?

**Номера запитань до контрольної роботи
З „Біотехнології”**

	Остання цифра номера залікової книжки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
Передостання цифра номера залікової книжки	1 Задача 1	2,37,72 Задача 2	3,38,73 Задача 3	4,39,74 Задача 4	5,40,75 Задача 5	6,41,76 Задача 6	7,42,77 Задача 7	8,43,78 Задача 8	9,44,79 Задача 9	10,45,80 Задача 10
	2 Задача 11	12,47,61 Задача 12	13,48,62 Задача 13	14,49,63 Задача 14	15,50,64 Задача 15	16,51,65 Задача 16	17,52,66 задача 17	18,53,67 Задача 18	19,54,68 Задача 19	20,55,69 Задача 20
	3 Задача 21	22,57,71 Задача 22	23,58,72 Задача 23	24,59,73 Задача 24	25,36,74 Задача 25	26,37,75 Задача 26	27,38,76 Задача 27	28,39,77 Задача 28	29,40,78 Задача 29	30,41,79, Задача 30
	4 Задача 31	32,43,60 Задача 32	33,44,61 Задача 33	34,45,62 Задача 34	35,46,63 Задача 35	1,47,64, Задача 1	2,48,65 Задача 2	3,49,66 Задача 3	4,50,67 Задача 4	5,51,68 Задача 5
	5 Задача 6	7,53,70 Задача 7	8,54,71 Задача 8	9,55,72, Задача 9	10,56,73 Задача 10	11,57,74 Задача 11	12,58,75 Задача 12	13,59,76 Задача 13	14,60,77 Задача 14	15,36,78, Задача 15
	6 Задача 16	18,38,80 Задача 17	19,39,60 Задача 18	20,40,61 Задача 19	21,41,62 Задача 20	22,42,63 Задача 21	23,43,64 Задача 22	24,44,65 Задача 23	25,45,66 Задача 24	26,46,67 Задача 25
	7 Задача 26	28,48,69 Задача 27	29,49,70 Задача 28	30,50,71 задача 29	31,51,72 Задача 30	32,52,73 Задача 31	33,53,74 Задача 32	34,54,75 Задача 33	35,55,76 Задача 34	36,56,77 Задача 35
	8 Задача 1	11,58,79 Задача 2	12,59,80 Задача 3	13,60,75 Задача 4	14,36,61 Задача 5	15,37,62 Задача 6	16,38,63 Задача 7	17,39,64 Задача 8	18,40,65 задача 9	19,41,66 Задача 10
	9 Задача 11	21,43,68 Задача 12	22,44,69 Задача 13	23,45,70 Задача 14	24,46,71 Задача 15	25,47,72 Задача 16	26,48,73 Задача 17	27,49,74 Задача 18	28,50,75 Задача 19	29,51,76 Задача 20
	0 Задача 21	31,53,78 Задача 22	32,53,79 Задача 23	33,54,80 Задача 24	34,55,65 Задача 25	35,56,66 Задача 26	36,57,67 Задача 27	1,58,68 Задача 28	2,59,69, Задача 29	3,60,70 Задача 30

Список використаної літератури

1. Андреева Л. Е. Трансгенные животные : фундаментальные и прикладные аспекты / Л. Е. Андреева, В. З. Тарантул; [в кн. Проблемы и перспективы молекулярной генетики. Том 1]; отв. ред. Е. Д. Свердлов. – М. : Наука, 2003. – 372 с.
2. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию / М. Е. Бекер ; [пер. с лат.]. – Рига : Пищевая промышленность, 1978. – 232 с.
3. Біотехнологія: підруч. / [В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.] ; за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
4. Биотехнология: учебное пособие для вузов. В 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – М. : Высш. шк., 1987
5. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : изд-во Сибир. отдел. РАН, 1999. – 252 с.
6. Глик Б. Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
7. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко и др. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.
8. Патрушев Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2000. – 830 с.
9. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник для вузов / В. Н. Рыбчин. – 2-е изд. перераб. и доп. – СПб. : изд-во СПбГТУ. 2003. – 522 с.
10. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон ; под ред. В. Г. Дебабова ; [пер. с англ.]. – М. : Мир, 1987. – 411 с.
11. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха. – М. : Высш. шк., 2003. – 470 с.
12. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособ. / С. Н. Щелкунов. – 2-е изд. испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. унив., 2004. – 496 с.
13. Эрнст Л. К. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева // Вестник РФФИ. – 2002. – № 3. – С. 12
14. Юлевич О. І. Біотехнологія : курс лекцій / О. І. Юлевич – Миколаїв : МДАУ, 2007. – 156 с.
15. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладач: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.5,63

Тираж 30 прим. Зам.№ _____

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м.Миколаїв, вул. Георгія Гангадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.