

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

БІОІНЖЕНЕРІЯ

конспект лекцій для здобувачів вищої освіти СВО «Бакалавр»
спеціальності 162 – «Біотехнології та біоінженерія»

Миколаїв
2019

УДК 573.6
Г 78

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від «21» листопада 2019 р., протокол № 4.

Укладач:

І. Ю. Горбатенко - д-р біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

С. С. Крамаренко - д-р. біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Г. А. Коцюбенко - д-р с.-г. наук, доцент, доцент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції, Миколаївський національний аграрний університет;

ВСТУП

Метою даного курсу є ознайомлення студентів із принципами використання біологічних знань у виробництві практично цінних продуктів і набути розуміння про сучасні біотехнологічні процеси, які базуються на генетичній і клітинній інженерії.

Завдання курсу: формує знання про методи клонування фрагментів ДНК, особливості будови векторів на основі прокаріот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт, одержання лікарських препаратів, одержання трансгенних рослин і тварин. В результаті вивчення дисципліни бакалавр повинен вміти на основі новітніх досягнень, використовуючи методичні рекомендації, планувати та обирати оптимальні умови для отримання рекомбінантних ДНК та трансформації генетичного матеріалу.

У результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен

знати:

- основи клітинної біотехнології;
- принципи складання живильних середовищ;
- технологічні прийоми культивування рослинних клітин;
- різні культуральні системи;
- прийоми іммобілізації, фізіолого-біохімічні особливості іммобілізованих препаратів, їх промислове використання;
- класифікацію, номенклатуру, фізичні і хімічні властивості та засоби одержання органічних речовин, що є у складі сировини, проміжних продуктів та основних продуктів виробництв галузі;
- хімічні, фізичні, біохімічні та біологічні основи технологічних процесів виробництв;
- основні напрями та завдання сучасної генетичної інженерії;
- методи одержання генетично модифікованих організмів;
- методи клонування фрагментів ДНК;
- особливості будови векторів на основі прокаріот та еукаріот;
- створення бібліотек геномів, рестрикційних карт;
- одержання лікарських препаратів.

вміти:

- – культивування різних об'єктів біотехнології зі знанням механізмів основних біологічних процесів живих клітин;
- – розробка біотехнологічних процесів з участю очищених ферментів або ферментів, що знаходяться всередині клітини;

- планувати та організовувати технологічні процеси, вибирати оптимальні умови здійснення цих процесів та керувати ними згідно з власними рішеннями щодо використання засобів автоматизації, користуватися сучасними методами контролю технологічних операцій та готової продукції;
- формулювати завдання на розробку нових та удосконалення існуючих технологічних процесів, які відповідають сучасним потребам суспільства;
- на основі новітніх досягнень, використовуючи методичні рекомендації, планувати та обирати оптимальні умови для отримання рекомбінантних ДНК та трансформації генетичного матеріалу.

Лекція №1 (2 год)

План:

1. Механізм рекомбінації генів в еукаріотів. Еволюційне значення процесу.
2. Рекомбінація генетичного матеріалу у прокаріотів:
 - трансформація;
 - трансдукція;
 - кон'югація у бактерій.
3. Пізнання трансформації як пролог генної інженерії.
4. Універсальність молекулярних носіїв спадкової інформації в органічному світі.

1. Механізм рекомбінації генів в еукаріотів. Еволюційне значення процесу.

Рекомбінація генетичного матеріалу постійно відбувається в природі. Поряд з мутаціями вона створює генотипову різноманітність особин – важливу передумову для дії природного добору. Лише наприкінці ХІХ – на початку ХХ ст. селекціонери почали свідомо використовувати створений природою механізм рекомбінації для підвищення ефективності штучного добору і виведення нових високопродуктивних сортів рослин і порід тварин методом гібридизації.

Гібридизація базується на перекомбінації хромосом та генів батьківських форм під час мейозу і запліднення.

У поєднанні з індивідуальним добором вона дала чудові наслідки і залишається основним методом сучасної селекції. Наукове осмислення і практичне освоєння гібридизації було першим кроком у використанні явища рекомбінації генетичного матеріалу в інтересах людини.

Проте у бактерій природа винайшла інші способи рекомбінації генетичного матеріалу, такі, як трансформація, трансдукція та кон'югація. Можна було сподіватися, що окремі деталі цих специфічних природних процесів після їх докладного вивчення також знайдуть практичне застосування. Встановлення генетичної ролі ДНК та відкриття можливості інтеграції чужої ДНК з геномом господаря послужило однією з передумов виникнення нового напрямку молекулярної біології – генної інженерії.

2. Рекомбінація генетичного матеріалу у прокаріотів:

Трансформація

Феномен трансформації був відкритий англійським бактеріологом Ф. Грифітом у 1928 р. Він проводив досліди з пневмококом *Diplococcus*

pneumoniae, який викликає пневмонію в людей. Пневмокок патогенний також для мишей, і тому ін'єкція мокроти хворої людини призводить до загибелі мишей протягом доби.

Патогенність пневмокока зумовлена наявністю полісахаридної капсули, яка захищає його від дії захисних механізмів зараженої ним тварини.

S-Штам (від англ. smooth – гладкий), який використовувався в дослідках, мав полісахаридну капсулу, був патогенний і утворював у культурі гладенькі колонії. R-Штам, який виник внаслідок мутацій з S-штаму, не мав капсули, не викликав захворювання і утворював шорсткуваті колонії (англ. rough – шорсткуватий). Ін'єкція S-штаму супроводжувалася загибеллю мишей, а після введення R-штаму вони залишалися живими. Великим був подив дослідника, коли він виявив, що після ін'єкції непатогенного R-штаму, до якого додавалися вбиті нагріванням S-клітини, миші загинули. З крові таких мишей були виділені S-пневмококи, що свідчило про трансформацію (перетворення) $R \rightarrow S$. Властивість вбитих клітин (наявність капсули, патогенність) якимось чином передавалась живим клітинам. Через три роки виявилось, що трансформація відбувається *in vitro*, якщо в культуральне середовище R-штаму додати безклітинний екстракт S-бактерій. Такий результат завжди відтворювався в експериментах, однак пояснити природу цього явища вчені змогли тільки через 16 років.

У 1944 р. американські вчені О. Ейвері, К. Мак-Леод і М. Мак-Карті повторили досліди Ф. Грифіта на аналогічній експериментальній основі. З метою ідентифікації трансформуючого агента вони за допомогою хімічних і ферментативних методів розділили безклітинний екстракт S-штаму на складові компоненти (полісахариди, білки, РНК, ДНК та ін.): Додаючи їх по чергові в культуру безкапсульного штаму, дослідники визначили, що матеріальною причиною трансформації є ДНК. Активність трансформуючого агента (ДНК) виявилася дуже високою. Трансформація відбувалася навіть тоді, коли в 1 мл культурального середовища вносилося 0.00015γ ($\gamma = 10^{-6}$ г) високоочищеної ДНК. З'ясування природи трансформуючого агента було епохальною подією в пізнанні генетичної ролі ДНК, першим незаперечним доказом того, що ДНК є носієм інформації. На основі одержаних результатів О. Ейвері і його співробітники, незважаючи на пануючу в той час тетрануклеотидну теорію будови цієї молекули, дійшли висновку про біологічну (видову) специфічність ДНК. Про те, наскільки несподіваним було це відкриття, свідчить той факт, що у 1944 р. навіть не знали, що ДНК входить до складу пневмококів, хоча вже кілька десятиріч було відомо, що ДНК є основним компонентом хромосом еукаріотів.

Таким чином, трансформація – це спосіб передачі спадкової інформації клітині-реципієнту від клітини-донора за допомогою ДНК. Фрагменти ДНК донора за певних умов проникають в клітину реципієнта, стають одноланцюговими і рекомбінуються з його геномом. Внаслідок цього реципієнт набуває ознак донора. Наприклад, під час трансформації $R \rightarrow S$ безкапсульні клітини включали у свій геном ген S , який контролює одну із стадій синтезу капсульного полісахариду.

Здатність клітин до трансформації є різною. На певній стадії життєвого циклу в окремих бактеріальних клітинах виникає особливий фізіологічний стан – стан компетентності, який характеризується максимальною здатністю клітин до трансформації. Внаслідок зміни метаболізму і проникності мембрани компетентна клітина може активно транспортувати ДНК з навколишнього середовища і поглинати її в десятки і навіть сотні разів більше, ніж у звичайному стані.

Методом мічених атомів було встановлено, що в геном реципієнта включаються лише невеликі фрагменти ДНК донора і тому здебільшого трансформуються лише одна-дві ознаки, які контролюються розміщеними поряд генами. Пізніше трансформацію спостерігали в експериментах з іншими коками, бацилами, бульбочковими бактеріями, бактеріями кишкової групи, синьозеленими водоростями тощо. Вчені робили численні спроби трансформації нижчих еукаріотів (дріжджів, водоростей) та багатоклітинних рослин та тварин. Проте вони залишалися безуспішними до семидесятих років ХХ ст., коли виникла технологія генної інженерії і були розроблені методи так званої векторної трансформації (див. Генна інженерія).

На сьогодні проблему трансформації еукаріотів вирішено і роль ДНК як універсального носія спадкової інформації не викликає сумнівів.

Явище трансформації поширене в природі і може відбуватися між штамми одного виду, а також між різними видами, але частота міжвидової трансформації значно менша, ніж внутрішньовидової. Потрібна для спонтанної трансформації ДНК може вивільнятися з відмерлих клітин, які зазнали лізису, а також виділятися в навколишнє середовище живими клітинами.

Природна трансформація – важливий фактор еволюції прокаріотів.

Трансдукція

Відомі два типи бактеріофагів – вірулентні та помірні. Помірні фаги можуть перебувати в бактеріальній клітині в двох станах. У вегетативному (автономному) стані вони реплікуються незалежно від геному господаря, накопичуються і викликають лізис клітини, який супроводжується вивільненням фагових часток (див. рис. 69). Проте процес вірусної інфекції може здійснюватися інакше: проникнувши в

клітину, помірні фаги можуть об'єднуватися з ДНК клітини-господаря. Інтегрований з бактеріальною ДНК фаговий генوم називають профагом.

У стані профага фагова ДНК реплікується з геномом господаря як єдине ціле і передається нащадкам. Інтеграція профага не є цілком стабільною: він може відокремлюватися від бактеріальної хромосоми спонтанно з частотою близько до 10^{-3} або його дезінтеграцію можна викликати ультрафіолетовим промінням та іншими несприятливими факторами. При цьому можлива рекомбінація генетичного матеріалу, внаслідок якої частина фагової ДНК замінюється на бактеріальну, донорну ДНК, а фаг залишає частину свого геному в хромосомі бактерії. Фаг, який втратив частину свого генетичного матеріалу і «прихопив» чужий, називається дефектним.

Під час зараження дефектним фагом іншого штаму бактерій вони сприймають до свого геному фагову ДНК разом з фрагментом ДНК донора.

Явище перенесення генів від одного організму до іншого за допомогою фага називають трансдукцією. Завдяки їй реципієнт одержує незначну (близько 1 %) частку геному донора і набуває однієї-двох його ознак.

Вперше трансдукцію вивчали американські дослідники Н. Ціндер та Д. Ледерберг (1952 р.). В U-подібній трубці, розділеній бактеріальним фільтром, вони одночасно культивували два штами бактерій мишачого тифу *Salmonella typhimurium*. Один із штамів був ауксотрофом за триптофаном Tgr^- , а інший – міг синтезувати цю амінокислоту. Після сумісної інкубації виявилось, що окремі клітини ауксотрофного штаму, які виникали з частотою 1×10^{-8} , набули здатності до синтезу триптофану. Перенесення генетичної інформації від прототрофного Tgr^+ до ауксотрофного Tgr^- штаму здійснювалося завдяки помірному фагу P22. У вигляді профага він здатний включатися в різні локуси бактеріальної хромосоми і переносити різні, а можливо й всі, гени сальмонели від одного штаму до іншого. Таке явище називають неспецифічною, або загальною, трансдукцією. Інші фаги, які мають певне місце посадки у бактеріальній хромосомі, здатні переносити лише окремі гени, що знаходяться поруч. Такий тип перенесення генів називають специфічною трансдукцією.

Специфічну трансдукцію вперше виявили в кишкової палички, яка була заражена помірним фагом λ . Його інтеграція з хромосоною *E. coli* найчастіше відбувається між генами *gal* (ген, який контролює катаболізм галактози) та *bio* (ген, який контролює синтез біотину), які нанесені на генетичну карту. Під час відокремлення фаг «прихоплює» одні й ті самі гени, які знаходяться поряд, що і забезпечує специфічність цього типу трансдукції. Так, за допомогою фага можна перенести гени

галактозного оперону від бактерій, які здатні використовувати галактозу як джерело вуглецевого живлення, до бактерій, які не мають цієї властивості.

Трансформація і трансдукція зумовлюють швидке поширення мутаційних змін у популяціях прокаріотів, а також забезпечують обмін генетичною інформацією між віддаленими в генетичному відношенні видами.

Ці природні явища використовуються в експериментах з трансгенозису – перенесенню генів від одних організмів до інших.

Кон'югація у бактерій

У 1946 р. Д. Ледерберг і Е. Тейтем першими почали вивчати можливість рекомбінації генетичного матеріалу різних штамів бактерій під час сумісного їх культивування. З цією метою вони відібрали два множинних ауксотрофних штами *E. coli*. Один з них унаслідок накопичення незалежних мутацій втратив здатність до синтезу трьох життєво потрібних речовин, які ми умовно позначимо як А, Б, В, а другий – втратив здатність до синтезу трьох інших метаболітів – Г, Д, Е. Кожен з цих мутантів міг рости і утворювати колонії лише тоді, коли в поживне середовище додавали три певних речовини.

Бактерії обох штамів змішували і висівали разом на повне середовище, яке містило всі шість потрібних речовин. Через деякий час суміш клітин обох штамів для виявлення прототрофних рекомбінантів переносили на мінімальне середовище, де не було жодної з цих речовин. Однак на мінімальному середовищі утворилося кілька колоній бактерій. Припущення про те, що прототрофні бактерії ($A^+B^+V^+T^+D^+E^+$) виникли шляхом мутацій, було впевнено відкинуте тому, що одночасове виникнення трьох мутацій від ауксотрофності до прототрофності в одній клітині є малоімовірною подією (ймовірність одноразового виникнення трьох мутацій дорівнює добутковій ймовірностей кожної з них). Враховуючи це, Д. Ледерберг і Е. Тейтем дійшли висновку, що утворення прототрофних бактерій є наслідком рекомбінації генетичного матеріалу обох мутантних штамів:

1-й штам	$A^-B^-V^-T^+D^+E^+$
2-й штам	$A^+B^+V^+T^-D^-E^-$
Прототрофні	$A^+B^+V^+T^+D^+E^+$
рекомбінанти	

Перекомбінація генів, як показали додаткові дослідження, не була наслідком трансформації: під час додавання до культури одного штаму стерильного фільтрату середовища іншого штаму рекомбінанти не виникали. Не було їх і тоді, коли штами культивувалися в окремих

колінах U-подібної трубки, розділеної бактеріальним фільтром. Лише безпосередній контакт між бактеріями під час сумісного культивування їх на повному середовищі забезпечував утворення прототрофних клітин, які виявили ознаки обох вихідних штамів.

У 50-х роках Б. Хейс встановив, що в бактерій, здатних до кон'югації (взаємного зближення і утворення цитоплазматичного місточка), спостерігається полярність, тобто диференціація на статеві типи: один із партнерів кон'югуючої пари є донором («самцем»), а другий – реципієнтом («самкою»). Б. Хейсом були виділені два статевих типи: F^+ – донорні, «чоловічі» штами і F^- – реципієнтні, «жіночі» штами.

У 1956 р. Д. Ледерберг одержав прямі електронно-мікроскопічні докази утворення кон'югаційних пар у змішаних культурах рекомбінуючих штамів (рис. 77). По тонкому цитоплазматичному містку, який з'єднує дві кон'югуючі бактерії, відбувається перенесення генів в одному напрямі – від донора до реципієнта. Детермінант, який визначає статевий тип і кон'югацію у *E. coli*, був названий фактором фертильності–F. Штами, які його мають, можуть бути донорами генетичного матеріалу для тих штамів, у яких він відсутній (перші позначають як F^+ , а другі як F^- -штами)

Дослідження, проведені на молекулярному рівні, показали, що фактор F є автономною дволанцюговою, замкненою в кільце молекулою ДНК, здатною до реплікації. Такі самостійні, невеликі кільцеві молекули ДНК, які існують незалежно від основної хромосоми бактерій і становлять собою окремий реплікон, були названі плазмідами. Плазміди – це не обов'язкові компоненти клітин прокаріотів, які можуть передаватися іншим клітинам під час кон'югації. Схема передачі бактеріальної плазміди показана на рис. 78. Перед кон'югацією кожна з бактеріальних клітин (рис. 78, а) містить кільцеву хромосому (зображена лініями середньої товщини), а одна з клітин – донор – має ще й плазмиду – невелику кільцеву молекулу ДНК, зображену товстою і тонкою лініями.

Під час кон'югації один з ланцюгів плазміди зображений у вигляді стрілки розривається в певній точці і через цитоплазматичний місток входить у клітину-реципієнт. Після цього на кожному з ланцюгів синтезується комплементарний ланцюг ДНК, завдяки чому утворюються дві інтактних молекули і обидві клітини внаслідок цього будуть містити по плазміді і стануть потенціальними донорами F^+ .

На одну бактеріальну хромосому донора припадає 1–2 кон'югаційних плазміди, які переносяться від клітини до клітини за описаною схемою. Проте в деяких випадках F-плазміда включається в бактеріальну хромосому. Під час цього хромосомна і плазмідна кільцеві молекули ДНК розриваються у певному місці, і ДНК плазміди шляхом

кросинговеру петлеподібно вмонтовується в хромосому бактерії, наприклад між генами *x*, *y*, *z* і *a*, *b*, *c*. Завдяки такій інтеграції виникають клітини і штами Hfr (high frequency of recombination) з високою частотою рекомбінацій. Коли клітина Hfr (4) кон'югує F⁻-клітиною, один ланцюг кільцевої хромосоми розривається в сайті інтеграції і фактор F, як локомотив, тягне за собою один з ланцюгів бактеріальної хромосоми.

Таке перенесення генів відбувається часто, і штами такого типу цілком виправдовують свою назву Hfr. Цитоплазматичний місток між кон'югуючими бактеріями є не міцним і може зруйнуватися спонтанно. Тому здебільшого реципієнт одержує не всю хромосому донора, а лише її частину, яка примикає до місця інтеграції.

Ф. Жакоб і Е. Вольман (1957), вивчаючи кон'югацію і її генетичні наслідки, істотно вдосконалили методику досліджень і зробили значний внесок у розуміння цього процесу. Із змішаної культури двох кон'югуючих штамів вони через певні проміжки часу після початку кон'югації брали проби і струшували їх у змішувачі Уорінга. Цитоплазматичний місточок між клітинами руйнувався, і кон'югація припинялась.

Після струшування, часом проведення якого регулювали тривалість кон'югації, проби висівали на селективне середовище і аналізували реципієнтні клітини на наявність генів та ознак донора. Виявилось, що кількість генетичного матеріалу, переданого реципієнту, пропорційна часові кон'югації.

Е. Вольман і Ф. Жакоб показали, що перенесення генів починається з початкової точки 0 і відбувається в певній послідовності (на рисунку: O, A, B, C, D, ..., K).

Рекомбінанти за геном B, наприклад, були виявлені після 15, а за геном C – після 20 хв кон'югації. Якщо перенесення ДНК відбувається з постійною швидкістю на одиницю її довжини, то час, потрібний для переміщення певного гена в клітину-реципієнт, може бути мірою відносної відстані між генами. Використовуючи часовий параметр як міру відстані між генними локусами, дослідники склали генетичну картину штаму HfrH.

Спрощену карту *E. coli*, на якій зображено відносне розміщення одинадцяти генних локусів, показано, де цифрами позначені відстані між генами в хвиликах.

Гени *arg*, *thr*, *his*, *pur*, *ser*, *gly* та *ile* визначають певну потребу в аргініні, треоніні, триптофані, гістидині, пурині, серині, гліцині і ізолейцині; *lac*, *gal* – гени, які контролюють здатність зброджування лактози і галактози; *str* – ген стійкості до стрептоміцину.

У 1967 році було опубліковано складну і відносно повну генетичну карту *E. Coli*. Вона відбиває розміщення майже 250 генних локусів і є результатом численних дослідів, які були проведені багатьма вченими.

На сьогодні в кишкової палички нанесено на карту більше трьохсот генів. А в її геномі їх близько двох тисяч. За існуючою між дослідниками домовленістю геном *E. Coli* ділять на 90 «хвилин». Так, на другій хвилині міститься ген *azi*, який визначає стійкість або чутливість до азиду натрію; на 18-ий – ген *bio A*, який визначає потребу в біотині; 64-ий – містить ген *str A* який зумовлює стійкість або чутливість до стрептоміцину.

3. Пізнання трансформації як пролог генної інженерії

Ранні генетичні дослідження проводилися переважно на вищих організмах, але перший випадок перенесення генетичної інформації (ділянок ДНК, генів) був зафіксований у бактерій (див. Трансформація).

Пізніше цей самий підхід (перенесення генів, трансгенозис) використали для вищих організмів.

Виявилося, що в двох основних групах організмів – прокариотів і еукаріотів – генетичний матеріал знаходиться в однаковій формі (ДНК). Тому способи обміну генетичною інформацією, виявлені в одних об'єктів, властиві й іншим, навіть віддаленим у таксономічному відношенні організмам.

Вивчення трансформації на молекулярному рівні засвідчило принципову можливість перенесення генів від одних організмів до інших, тобто стимулювало розвиток того напрямку молекулярної біології, який ми називаємо генетичною інженерією. Пізнання трансформації стало прологом генної інженерії.

4. Універсальність молекулярних носіїв спадкової інформації.

а) визначення «життя» за Енгельсом;

б) сучасне визначення живого: «Живі організми як системи, що містять в своєму складі ДНК і білки і самостійно можуть синтезувати їх у відповідних умовах;

в) загальнобіологічні (універсальні) властивості вірусів; чому їх не можна вважати живими?

г) ДНК – універсальний носій спадкової інформації.

д) ДНК і обмін речовин.

Лекція №2 (2 год)

План:

1. Поняття генної інженерії та її виникнення. Завдання генної інженерії.
2. Біоінженерія. Генетична та клітинна інженерія.
3. Хімічний синтез генів (метод Корана) та його недоліки.

1. Поняття генної інженерії та її виникнення. Завдання генної інженерії.

Суть генної інженерії полягає у виділенні й штучному створенні функціонально активних генетичних структур (генів, їх блоків та рекомбінантних молекул ДНК) з наступним введенням їх в організм з метою цілеспрямованої перебудови його генотипу. При цьому введений генетичний матеріал повинен стати складовою частиною генетичної системи господаря, а саме: реплікуватися разом з його ДНК, виконувати регуляторні команди клітини, включатися в процеси транскрипції і трансляції та забезпечувати синтез відповідних продуктів (білків, гормонів) і прояв нових, не властивих для даного організму ознак і властивостей. Генна інженерія вирішує фундаментальні наукові завдання, які зв'язані з вивченням структурної організації геномів та особливостями їх функціонування в різних організмах.

Разом з цим вона розв'язує завдання прикладного характеру, які зв'язані з розробкою нових методів створення високопродуктивних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин, а в перспективі – і генотерапії спадкових хвороб людини. Як самостійний напрям генна інженерія виникла наприкінці 1972 р., коли П. Берг, Д. Джексон і Р. Симонс (США) опублікували роботу про створення штучним шляхом першої рекомбінантної («гібридної») молекули ДНК. До її складу входили фрагменти ДНК мавпячого вірусу, бактеріофага λ , і *E. coli*. Отже, рекомбінантні ДНК створюють шляхом з'єднання послідовностей різного походження.

Експеримент П. Берга став прологом бурхливого розвитку досліджень генної інженерії в інших країнах. Проте для їх успішного проведення потрібно було вирішити ряд важливих завдань:

1. Розробити методи одержання генів та фрагментів ДНК.
2. Навчитися свідомо перекомбінувати генетичний матеріал *in vitro*.
3. Підібрати відповідні вектори, тобто здатні до реплікації структури, які можуть приєднувати до себе різноманітні гени та фрагменти молекул ДНК і переносити їх у клітину.
4. Розробити ефективні методи виявлення генетичних

трансформантів – організмів, які містять функціонально активні рекомбінантні молекули ДНК.

2. Біоінженерія. Генна, генетична та клітинна інженерія

Сучасний рівень знань зробив можливим перехід до спрямованого конструювання молекул спадковості, окремих клітин і цілих організмів. Вчені біологи не лише вивчають будову і функціонування організмів, а й створюють нові варіанти живих систем, які не могли появитися в ході еволюції. Так з'явилися нові напрямки біології – генна, генетична та клітинна інженерія, які об'єднують під загальним терміном біоінженерія.

Генна інженерія вужче поняття, ніж генетична інженерія. Вона має відношення до окремого гена чи окремих генів. Її завдання – виділення і синтез генів, конструювання і клонування нових рекомбінантних молекул ДНК, створення банку генів.

Генетична інженерія – це ширше поняття; вона (ГІ) займається проблемами спрямованого конструювання (за допомогою методів генної інженерії) нових живих організмів з бажаними для людини ознаками і властивостями. Тобто, генетична інженерія – це генна інженерія + трансгенозис. За визначенням академіка Баєва генетичну інженерію можна розглядати як науку про зміну генетичної програми клітин та організмів в інтересах людини.

Техніка вирощування *in vitro* клітин вищих організмів збільшує можливості генетичної інженерії рослин і тварин, оскільки клітини і, особливо, «голі» протопласти є зручними реципієнтами для введення чужого генетичного матеріалу. Під час культивування клітин *in vitro* з ними можна здійснювати різні маніпуляції і одержувати трансгенні (трансформовані) клітини, а з них – цілі організми з новими спадковими властивостями. Генетична і клітинна інженерія спрямовані на вирішення спільного завдання – здійснення контрольованих біологічних маніпуляцій, пов'язаних з генами, хромосомами, ядрами та іншими органелами клітин з метою створення нових бажаних для людини генотипів. Тому ці напрямки часто об'єднують під загальною назвою «біоінженерія».

3. Хімічний синтез генів (метод Корана) та його недоліки.

Гени, які потрібні для експериментів, синтезують штучно або виділяють з бактеріальних клітин за допомогою *трансдукуючих фагів*.

У 1968 р. Х. Корана вперше синтезував ген аланінової тРНК. На той час структурні формули багатьох тРНК були вже відомі завдяки роботам американського біохіміка Р. Холлі (Нобелівська премія, 1968 р.) та інших дослідників. Виходячи з нуклеотидної послідовності

аланінової тРНК, Х. Корана спроектував на папері структуру гена, з якого вона транскрибується, а потім синтезував його.

Обидва комплементарні ланцюги гена, кожен довжиною 77 нуклеотидів, були розбиті на блоки від 8 до 12 нуклеотидів завдовжки. Блоки синтезувалися методами класичного органічного синтезу. Для з'єднання їх використовувався фермент ДНК-лігаза. Він здійснює репарацію розривів ланцюгів молекули ДНК, каталізуючи з'єднання фосфату одного нуклеотиду з цукром іншого (рис. 97). Успішне з'єднання блоків забезпечувалося також і тим, що вони мали «липкі кінці» – одноланцюгові комплементарні виступи, які, спарюючись між собою, утримували фрагменти разом для того, щоб лігаза проявила свою дію. Синтез гена був справжнім тріумфом біоорганічної хімії та молекулярної біології. Однак синтезований ген не проявив активності у живій системі.

Повна і функціонально активна генна структура (ген + регуляторна ділянка, всього 199 нуклеотидів) була синтезована Х. Кораною в 1976 р. Штучно створений ним ген тирозинової тРНК *E. coli* працював під час введення в геном фага Т4 в клітинах кишкової палички. Проте середній розмір гена становить 1000-1500 нуклеотидів, що значно ускладнює його синтез. Тому хімічний синтез застосовують тоді, коли продукт гена і сам ген має невеликі розміри. Так, методика, розроблена Х. Кораною, застосовувалася для синтезу гена, який контролює синтез інсуліну в людини.

В Інституті біоорганічної хімії та Інституті загальної генетики (Москва) таким чином синтезували безліч генів, зокрема гени брадикініну і енкефаліну. Новосибірські вчені синтезували ген ангіотензину – невеликого білка, який складається з 10 амінокислот. Спочатку амінокислоти написали у тій послідовності, в якій вони розміщені в білку, і під кожною з них позначили відповідний кодон. Тобто одержали «проект» гена, а потім синтезували ген разом з регуляторними ділянками. Ген вмонтували в спеціально створену плазмиду і ввели її в клітини *E. coli*. Штучний ген почав там працювати і забезпечив синтез нетипового для кишкової палички продукту – ангіотензину.

Лекція №3 (2 год)

План:

1. Зворотна транскриптаза (історія її вивчення і використання). Ферментативний синтез генів.
2. Ферменти рестрикції – рестриктази та особливості їх дії на ДНК. Одержання блоків генів.
3. Лігази та дезоксинуклеотидилтрансфераза.
4. Інші ферменти, що мають безпосереднє відношення до генної інженерії.

1. Зворотна транскриптаза. Ферментативний синтез генів

Великі за розмірами гени одержують методом ферментативного синтезу. Суть його полягає в тому, що з клітин виділяють певний тип іРНК, яка є комплементарною копією гена. На цих копіях за допомогою фермента – зворотної транскриптази синтезують відповідний ген. Цей фермент здійснює синтез ДНК у напрямі 5' → 3', який приєднує по одному нуклеотиду шляхом комплементарного спарювання основ з іРНК-матрицею. Продукт реакції становить собою гібридну молекулу, яка складається з РНК-матриці, що з'єднана з комплементарним ланцюгом ДНК. Одержаний комплекс (РНК-ДНК) руйнують обробленням лугом (на ДНК луг не впливає). Внаслідок цього утворюється одноланцюгова ДНК, комплементарна іРНК (її позначають кДНК). За допомогою ДНК-полімерази перетворюють одноланцюгову кДНК у дволанцюгову шляхом добудови комплементарного ланцюга. Завдяки зворотній транскриптазі був знайдений шлях для синтезу будь-якого з існуючих генів, незалежно від їх складності. За відкриття цього фермента Д. Балтімор і Х. Тьомін були удостоєні в 1975 р. Нобелівської премії.

Шляхом ферментативного синтезу були створені гени глобіну кролика, миші, голуба, качки та людини. Приклади штучно синтезованих генів ссавців, які проявили свою біологічну активність у клітинах кишкової палички, наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Приклади генів ссавців, виражених в *E. coli*

Ген	Метод створення
1. Редуктази дигідрофолату миші	Зворотна транскрипція
2. Інсуліну щура	Зворотна транскрипція
3. Яєчного альбуміну	Зворотна транскрипція
4. Соматостатину людини	Хімічний синтез
5. Інсуліну людини	Зворотна транскрипція
6. Гормону росту людини	Хімічний синтез і зворотна

	транскрипція
7. Інтерферону людини	Зворотна транскрипція
8. Урокінази людини	Зворотна транскрипція
9. α -1 тимозину людини	Зворотна транскрипція

2. Ферменти рестрикції – рестриктази та особливості їх дії на ДНК. Одержання блоків генів.

Методи генної інженерії дають змогу здійснювати рекомбінацію *in vitro*, поєднуючи при цьому генетичну інформацію найрізноманітніших організмів.

Важливою передумовою освоєння технології одержання рекомбінантних молекул ДНК було відкриття ферментів *рестрикції* (*рестриктаз*), які розривають зв'язки всередині двоспиральної молекули і «ріжуть» її на частини. Найбільше цікавлять генетиків рестриктази класу II, які здатні розпізнавати специфічні послідовності основ у дволанцюговій молекулі ДНК, а потім розщеплювати такі молекули на фрагменти. Рестриктази класу II відрізняються між собою за тим, як вони фрагментують молекулу ДНК. Одні з них розрізають обидва ланцюги ДНК простим рівним розривом, а інші ріжуть молекулу виступом, асиметрично. Подвійна спіраль розривається при цьому таким чином, що в кожному з утворених фрагментів залишаються одноланцюгові комплементарні виступи, так звані липкі кінці.

На сьогодні відомо понад 400 рестриктаз. Назву рестриктази утворюють з першої родової літери і двох перших літер видової назви організму, який її продукує. Додають скорочену назву системи рестрикції чи назву нехромосомного елемента, який кодує рестриктазу. Наприклад, *Eco R* — I — рестриктаза, виділена з *E. coli*, синтез її програмується фактором *R* I; *Hind* — III — виділена з *Haemophilus influenzae*, штаму *d*, рестриктаза III.

На рис. 99 умовно зображена ділянка ДНК. Окремі нуклеотиди її позначені літерами. Рестриктаза Хінд II розпізнає послідовність з шести нуклеотидів ГТЦГАЦ і розрізає її і комплементарну їхню ділянку точно посередині. Інша рестриктаза *PI* розпізнає шість інших нуклеотидів ГААТТЦ і ріже двоспиральну молекулу в цьому місці сходинкою, асиметрично, утворюючи фрагменти з липкими кінцями. Слід пам'ятати, що кожна рестриктаза (а їх відомо кілька сотень) розпізнає свою специфічну послідовність. Кількість ділянок розпізнавання для певної рестриктази залежить від розміру ДНК. Так, невелика ДНК вірусу SV 40 для рестриктаз *Bam* H I, *Eco* R I і *Hpa* II має лише по одній ділянці розпізнавання, тоді як більша за розмірами ДНК аденовірусу для тих же рестриктаз має відповідно 3, 5 і понад 50 ділянок. Тобто рестриктаза *Hpa* II розріже ДНК вірусу SV 40 в одному

місці, а ДНК аденовірусу – більш як у 50 місцях, внаслідок чого утвориться безліч фрагментів.

Одержані за допомогою рестриктаз фрагменти використовують для створення рекомбінантних молекул.

Рестриктази – це створений природою інструмент для ГІ. Оскільки різні бактерії по різному мітять (метилують) свої молекули ДНК, були виділені рестриктази, що розпізнають найрізноманітніші послідовності нуклеотидів. Завдяки цьому стало можливим розрізати ДНК на які завгодно шматки (фрагменти), а потім їх зшивати так, як того хоче експериментатор (одержувати свідомо рекомбінантні молекули ДНК).

Молекулярна біологія подолала природну заборону на міжвидові схрещування. ГІ дозволяє перекомбінувати (перетасовувати) гени організмів, які знаходяться на різних щаблях еволюційного розвитку, тобто віддалених в еволюційному відношенні, таких, наприклад, як людина і бактерія. У пробірці, *in vitro*, можна створити будь-які комбінації генів (наприклад, мухи і слона).

Але одна справа – створити рекомбінантні ДНК в пробірці, а зовсім інша – домогтися, щоб вона була біологічно активна, щоб вона змінювала генетичні властивості клітини, виконувала її «команди» і могла реплікуватися в складі живої клітини.

Ця мета досягається завдяки регуляторним структурам (промоторам) та векторам.

3. Лігази та дезоксинуклеотидилтрансфераза

Одержані за допомогою рестриктаз фрагменти використовують для створення рекомбінантних молекул.

Існують різноманітні методи з'єднання нарізаних рестриктазами фрагментів у цілісну структуру. Фрагменти з липкими кінцями, які одержані за допомогою однієї рестриктази, можуть гібридизуватися один з одним або їх зшивають кінцевою дезоксинуклеотидилтрансферазою. Фрагменти з рівними краями з'єднують Т—4-лігазою. Вдається також зшивати фрагменти з рівними і липкими кінцями. Спочатку за допомогою ДНК-полімерази липкий кінець добудовується і стає рівним, а потім з'єднується з іншим Т—4-лігазою.

Отже, проблема нарізування генетичного матеріалу та його зшивання успішно розв'язана.

4. Інші ферменти, що мають безпосереднє відношення до генної інженерії

Давно було помічено, що бактерії здатні руйнувати (гідролізувати) чужу ДНК, що потрапляє в клітини. Гідроліз здійснюють ендонуклеази. Вони зв'язуються з чужою ДНК в специфічних ділянках – сайтах

розпізнавання і розщеплюють (ріжуть) її на фрагменти (рестрикти). Ці фрагменти були названі рестриктазами. Постає питання: чому вони не ріжуть власну ДНК. Власну ДНК вони не руйнують тому, що їхня ДНК захищена певним чином від дії рестриктаз. Для того, щоб рестриктаза не різала власну ДНК природа придумала одну хитрість: сайти розпізнавання модифікуються за допомогою метилаз. Цей процес називають метилюванням. Він полягає в тому, що до одного з нуклеотидів А або Ц приєднується метильна ($-\text{CH}_3$) група і модифікована таким чином ДНК клітини не «боїться» своїх власних рестриктаз. Цікаво, що кількість метильованих основ ДНК дуже мала – 1 на тисячі.

Виявилося, що за допомогою метилази бактерія мітить (метилює) також ДНК фага, який дозріває в ній. Бактерія робить це немовби собі на шкоду. Якщо метилазу вивести з ладу (шляхом мутації відповідного гена), то фаги, що дозрівають усередині клітини, виявляються неінфекційними.

ДНК-полімераза складається з 1 поліпептидного ланцюга. Він здатен синтезувати ланцюг ДНК на односторонній матриці в напрямку від 5 до 3 кінця в присутності відповідних нуклеотидів в реакційному середовищі. Вперше виділений з *E. coli*. Використаний у 1957 р. для синтезу ДНК *in vitro* (Корнберг, Нобел. премія).

ДНК-лігази складаються з 1 поліпептидного ланцюга і «зшивають» розриви ДНК, використовуючи енергію АТФ. Використовують для з'єднання рестриктів з тупими кінцями.

Дезоксинуклеотидилтрансфераза використовується в генній інженерії для «зшивання» фрагментів з «липкими кінцями».

Лекція №4 (4 год)

План:

1. Поняття вектора і його роль в генетичній інженерії (трансгенозисі)
2. Плазмідні як основні вектори, що використовуються в генній інженерії
3. Ті-плазміда *Agrobacterium tumefaciens* та її Т-ДНК
4. Інші вектори (помірні фаги та косміди)?

1. Поняття вектора і його роль в генетичній інженерії (трансгенозисі)

Штучно створені гени та фрагменти ДНК при введенні їх в клітину не мажуть самостійно відтворюватись і передаватися потомству. Для подолання цієї перешкоди їх включають до складу генетичної структури, яка здатна до реплікації. Така структура, яка становить собою окремий реплікон і використовується для перенесення генетичного матеріалу, носить назву вектора, або переносника. *Вектор* – це молекула ДНК, яка здатна переносити в клітину чужий ген і забезпечувати там його розмноження (реплікацію). Вектор може реплікуватися або автономно, або після його інтеграції з геномом.

2. Плазмідні як основні вектори, що використовуються в генній інженерії

На початку 1950 років плазмідні відкрив Ледерберг (пригадаймо кон'югацію у бактерій і його дослід з множинними ауксотрофами). Він виявив, що крім основної ДНК (яку зрозуміло чому називають хромосоною), бактерії містять ще й маленькі молекули ДНК, які він назвав плазмідними (П), якими бактеріальні клітини охоче обмінюються під час кон'югації.

Спочатку відкриття плазмід не викликало особливого інтересу. Про плазмідні заговорили медики в 1959 р., коли японські дослідники виявили, що неефективність найкращих на той час антибіотиків при лікуванні дизентерії у багатьох хворих, зумовлена тим, що бактерії, якими заражені ці пацієнти, мають у своїх клітинах плазмідні, що містять кілька генів стійкості до різних антибіотиків. Пізніше з'ясували що майже завжди гени стійкості до антибіотиків містяться у плазмідних. Здатність переходити з однієї бактерії до іншої (під час кон'югації) призводить до того, що П., що містять такі гени, швидко поширюються серед бактерій як тільки починаються застосування того чи іншого антибіотика. За кілька годин сумісноо культивування нестійкий штам бактерій «запозичує» від свого стійкого співмешканця виняткову стійкість і стає зовсім нечутливим .

Стафілококкова інфекція, що є проблемою хірургічних клінік, зобов'язана своєю диявольською стійкістю до антибіотиків, також плазмідам.

R- плазміди, на відміну від F- фактора, ніколи не вбудовуються у хромосому.

П. поза клітиною – це просто молекула ДНК, а в клітині вони розмножуються разом з клітиною-господарем. Мати плазміди для клітини «накладно», бо їх треба «годувати», як собаку (витрачати матеріал і Е для їх реплікації). Але в екстримальних умовах, у ворожому оточенні, вони, як пес, захищають клітину від сильнодіючих агентів (антибіотиків, солей важких металів, нафтового забруднення тощо). П. керують синтезом ісектициду (білка) в клітинах *Bacillus thuringiensis*.

Співіснування плазмід і бактеріальних клітин є взаємовигідним союзом, немовби симбіозом.

Трансмисивність П., що завдала клопоту лікарям, виявилася доречною для ГІ, бо завдяки простоті своєї будови П. виявилися зручними структурами, в які «вбудовуються» чужі гени і клонують (розмножують) їх у бактеріальних клітинах.

Розроблено методи завдяки яким можна примусити клітину мати не 1-2, а тисячі копій плазміди (рек ДНК). Завдяки використанню цих методів можна домогтися фантастичної продуктивності по синтезу білка, закодованого вмонтованим геном.

Векторами в генній інженерії служать плазміди, фаги та косміди. *Плазміди бактерій* – це позахромосомні молекули ДНК кільцевої форми розміром від 2 до 400 тис. пар нуклеотидів. Характерною їх особливістю є трансмісивність, тобто здатність передаватися від одних бактеріальних клітин до інших. Перенесення плазмід відбувається в природі і в експерименті. Існує два типи плазмід – однокопійні (на клітину припадає 1 молекула плазмідної ДНК) і мультикопійні (на одну клітину припадає 10-20 плазмідних генів). Окремі плазміди, які знаходяться під послабленим контролем реплікації, можуть накопичуватися (за умов припинення росту бактерій) у величезних кількостях – до 1 тис. плазмід на одну клітину. Такі плазміди використовуються для клонування векторів, оскільки вони забезпечують високий вихід матеріалу.

Останні двадцять років інтенсивно вивчаються і використовуються плазміди, які зумовлюють стійкість бактерій до антибіотиків (R-плазміди; *resistance* – стійкість). Вони містять генетичну інформацію, що забезпечує синтез продуктів, які подавляють дію антибіотиків.

На рис. 101 зображено плазмиду з генами стійкості до ампіциліну і тетрацикліну (*Amp^r*; *Tef^r*). В середині цих генів є ділянки дії рестриктаз. Плазміда, точніше ген стійкості до антибіотика, розрізується рестриктазою, і в місці розрізу за допомогою ферментів вмонтовується

чужа ДНК, нарізана на фрагменти цією самою рестриктазою. Розрізаний ген при цьому пошкоджується, і бактерія з рекомбінантною плазмідною втрачає стійкість до антибіотика. Зверніть увагу на те, що рестриктази розщеплюють ДНК у тих ділянках, де комплементарні нуклеотиди розміщуються відповідно до осової симетрії. Місця розщеплення молекули даною рестриктазою вказані пунктирними стрілками. Внаслідок розщеплення утворюються фрагменти з липкими кінцями (ТТАА; ААТТ). Фрагменти різного походження, одержані під впливом однієї рестриктази, мають комплементарні липкі кінці і легко зшиваються між собою в кільцеву структуру. Поряд з плазмідною ДНК вона містить ДНК донора. Найчастіше для створення рекомбінантних гібридних молекул використовують плазмиди, які мають лише одну ділянку дії для певної рестриктази, тобто ДНК розрізується нею в одному місці. У плазміді можна вставити фрагмент чужої ДНК розміром не більше 15 тис. пар нуклеотидів. З цією метою розрізані певною рестриктазою плазмиди і фрагменти ДНК донора змішуються і під дією лігази зшиваються у кільцеву структуру – гібридну плазмиду (рекомбінантну ДНК).

Рекомбінантні молекули так само, як і вихідні плазмиди, під час введення їх у клітину реплікуються і передаються дочірнім клітинам. Внаслідок трансформації реципієнтні клітини набувають певних ознак донора.

3. Ті-плазміда *Agrobacterium tumefaciens* та її Т-ДНК

Одним із векторів є крупна кон'югативна плазміда патогенної бактерії *Agrobacterium tumefaciens*. Плазміда відповідальна за індукцію пухлин у дводольних. У тканинах рослин, в яких проживає ця плазміда синтезується значна кількість ауксинів і цитокинінів і в культурі *in vitro* вони зовсім не потребують додавання цих гормонів.

Молекулярно-генетичні дослідження цієї бактерії і її плазмиди розпочалося в 1976 р. в інституті ім. Макса Планка в Кельні (ФРН). Ці плазмиди були названі Ті-плазмідами. Особливий фрагмент (ділянка) Ті-плазмиди, названий Т-ДНК може інтегруватися в геном рослини (спочатку це виявили на пухлинах тютюну). Протопласти тютюну були трансформовані Ті-плазмідною *A. tumefaciens*.

Отже, утворення пухлин в тканинах рослин, що викликані Ті-плазмідною *A. tumefaciens* індукується перенесенням ділянки бактерії т-ДНК (з прокаріот. клітини) і її інтеграцією в геном еукаріотичної клітини.

Т-ДНК містить 7 генів.

В 1981 р. Кемпу і Холлу (США) вдалося за допомогою Ті-плазмід перенести ген, що кодує у бобових білок фазеолін (розповісти) в рослини соняшника.

4. Інші вектори (помірні фаги та косміди)

Другий метод, яким користуються дослідники для введення гена в бактеріальні клітини базується на використанні бактеріофага як вектора. Ген вбудовують в геном помірною фага, який містить 10-50 генів, і він реплікується разом з генами фага в бактеріальній клітині.

Для одержання рекомбінантних молекул з великими розмірами вставок (до 23 тис. п.н.) (в плазміді можна вбудувати лише вставку до 15 тис. п.н.) як вектор використовують ДНК λ -фага.

Вона має два сайти для дії рестриктази P1. Кінцеві ділянки, які відрізаються нею, містять інформацію для розмноження фага. Середню частину ДНК λ -фага вирізають і на її місце вставляють фрагмент чужої ДНК, об'єднують її з кінцевими ділянками фагової ДНК. Зшивання фрагментів здійснює лігаза. Рекомбінантна молекула упаковується в білкову оболонку і утворюється зріла фагова частка здатна до розмноження.

1. Статева гібридизація та бар'єри на шляху віддаленої гібридизації.
2. Культура ізольованих клітин і тканин. Голі протопласти як об'єкти для перенесення генів.
3. Тотіпотентність рослинних клітин. Тотіпотентність тваринних клітин раннього зародку.
4. Соматична гібридизація. Її значення для науки і практики. Поліетиленгліколь як універсальний індуктор злиття клітин.
5. Гібридоми.
6. Клонування: а) рослини;
б) тварини;
в) проблеми і морально-етичні аспекти можливого клонування людини.
7. Стовбурові клітини та їх значення для медицини.

Схрещування організмів, які належать до різних видів і родів, називають *віддаленою гібридизацією*. Цей метод застосовують тоді, коли шляхом міжсорткової гібридизації не вдається вирішити певних завдань, які стоять перед селекціонером. Так, під час селекційної роботи з картоплі значна увага надається стійкості. Однак усі сорти картоплі, які належать до культурного виду *Solanum tuberosum*, пошкоджуються фітофторою, раком та вірусними хворобами. Серед них немає стійких форм, які можна було б використати як компоненти для схрещувань. Важливо, що деякі дикі і примітивні види виявляються стійкими до цих захворювань, мають дуже високий (до 6%) вміст білка, можуть витримувати заморозки до 5-6°C, не пошкоджуються колорадським жуком та нематодою.

Розщеплення в потомстві віддалених гібридів характеризується різноманітністю і бурхливим формотворчим процесом. Однак характер і амплітуда спадкової мінливості залежать від спорідненості форм,

кількості хромосом та їхньої структури. Генетичної збалансованості і стабільності гібридних організмів вдається досягти лише в пізніших поколіннях.

Всю різноманітність віддалених схрещувань можна поділити на три групи.

1. Схрещування генетично близьких видів однаковим числом хромосом. Такі схрещування вдаються, мейоз протікає нормально, і гібриди виявляються фертильними, якщо хромосоми частково або цілком гомологічні.

2. Схрещування видів одного роду, які відрізняються за геномним складом. При цьому можуть виникати різні проблеми, на яких ми зупинимося далі.

3. Міжродова гібридизація характеризується тим, що генетичні, біохімічні, фізіологічні, цитологічні і морфологічні відмінності між компонентами схрещувань дуже великі. Внаслідок цього виникають значні ускладнення, для подолання яких застосовують спеціальні прийоми.

Використовуючи метод віддаленої гібридизації, селекціонер стикається з такими ускладненнями: 1) несхрещуваність видів; 2) нежиттєздатність гібридного насіння; 3) стерильність гібридів.

Подолання несхрещуваності видів

Несхрещуваність викликається трьома причинами: 1) пилок рослин одного виду не проростає на приймочках квіток іншого виду; 2) пилкові трубки ростуть так повільно, що запліднення не відбувається; 3) запліднення відбувається, але зародок гине на тій чи іншій стадії ембріонального розвитку.

Для подолання несхрещуваності видів застосовують такі методи: проведення реципрокних схрещувань; зміну плоїдності у однієї з батьківських форм; метод посередника; запилення сумішшю пилку; вегетативне зближення схрещуваних форм.

Схрещуваність, тобто процент зав'язування насіння, залежить від того, який компонент використовується як материнська форма. Так, схрещування ♀ пшениця х ♂ пирій буде успішнішим, ніж схрещування ♀ пирій х ♂ пшениця. У схрещуванні жита з пшеницею кращий результат одержують тоді, коли функцію материнської форми виконує пшениця, а не жито. Отже *реципрокні схрещування* (А х В, В х А) дають неоднаковий результат.

Зміну плоїдності у однієї з батьківських форм для подолання несхрещуваності проводять тоді, коли один із видів має вдвічі більше хромосом (табл. 14). Так, якщо дикий вид картоплі ($2n = 24$) використовується як материнська форма, то його спочатку переводять

шляхом колхіцинування на тетраплоїдний рівень, а потім цей експериментально одержаний тетраплоїд ($2n = 48$) схрещують з *Solanum tuberosum* ($2n = 48$). Якщо ж дикий вид використовують як батьківську форму, то попередньо одержують дигаплоїди культурного виду ($2n = 24$), а потім їх схрещують з диплоїдним диким видом. Зміна плоїдності призводить до покращення схрещуваності віддалених видів.

Величезний вплив на розвиток теорії і практики віддаленої гібридизації мали праці І. В. Мічуріна, який вважав її могутнім методом створення нових форм і сортів рослин. Використовуючи віддалену гібридизацію, І. В. Мічурін створив багато нових сортів і форм плодових рослин. Ним розроблено оригінальні прийоми подолання несхрещуваності різних видів і родів рослин.

Для виведення зимостійких сортів персика І. В. Мічурін вирішив схрестити культурний персик із зимостійкою формою дикого мигдалю. Однак дістати насіння від такого схрещування йому не вдалося. Тоді він схрестив дикий мигдаль з диким персиком Давида. Внаслідок цього вийшов гібрид, названий ним *посередником*. Він мав достатню зимостійкість і легко схрещувався з культурними сортами персика. Цей метод східчастого схрещування при гібридизації різних видів називається *методом посередника*. Метод посередника застосовують також під час віддаленої гібридизації однорічних культур.

Гібриди між яблуною і грушею, вишнею і черемхою, абрикосом і сливою були одержані І. В. Мічурініми при запиленні сумішшю пилку. Очевидно, що пилок різних видів, нанесений на приймочку квітки материнської рослини, може стимулювати проростання пилку виду-запилювача.

Для подолання несхрещуваності віддалених форм І. В. Мічурін розробив метод попереднього вегетативного зближення схрещуваних форм. При цьому один із видів він щеплював з іншим, а через деякий час схрещував щеплені компоненти. Завдяки фізіологічному взаємовпливу прищепи і підщепи схрещуваність значно покращувалася.

Якщо внаслідок віддалених схрещувань зав'язалося гібридне насіння, це ще не гарантує одержання гібридних рослин, бо недорозвинуте насіння може не проростати. Життєздатність насіння можна інколи покращити шляхом зміни напрямку схрещувань. Так, у комбінації ♀ *Triticum timopheevi* x ♂ *T. aestivum* зав'язується дрібне насіння, яке має погану схожість. Під час реципрокного схрещування цих видів пшениць (♀ *T. aestivum* x *T. timopheevi*) зав'язування насіння і його схожість виявляються значно кращими.

В окремих схрещуваннях гібридний зародок гине на ранній стадії через дегенерацію ендосперму. У такому разі його відокремлюють і вирощують на штучному поживному середовищі. Рецепти поживних

сумішей для культивування ізолюваних зародків розроблені для багатьох культур. Гібридний зародок недорозвинутого насіння може переноситись, на повноцінний ендосперм одного із видів.

Методи подолання безплідності гібридів

Однією з проблем віддаленої гібридизації є знижена її плодючість або повна стерильність гібридів F_1 . Чим далі в філогенетичному відношенні знаходяться схрещувані форми, тим сильніше виявляється стерильність їхніх гібридів. Вона здебільшого пов'язана з відмінностями хромосомних комплексів схрещуваних видів, а також несумісністю ядра і цитоплазми. Невідповідність в числі і структурі хромосом викликає різноманітні аномалії мейозу — відсутність кон'югації, наявність унівалентних хромосом, погану кон'югацію хромосом різних видів.

Розподіл хромосом порушується і утворюються нежиттєздатні гамети з незбалансованим хромосомним комплексом.

Для подолання стерильності F_1 застосовують два основних методи: зворотні схрещування і подвоєння числа хромосом у гібрида F_1 .

Зворотні схрещування базуються на тому, що жіночі гамети гібрида життєздатніші, ніж чоловічі. Запилення гібридів F_1 пилом одного з батьків дає змогу одержати на рослинах насіння для подальшої селекційної роботи. Зворотні схрещування застосовують і з іншою метою. Річ в тому, що під час схрещування культурних сортів з дикими видами в F_1 і наступних поколіннях переважають ознаки останніх. Так, гібриди картоплі мають дрібні бульби, низьку врожайність, довжелезні столони, поганий смак тощо. Відібрати щось цінне з такого матеріалу неможливо. Для усунення цих недоліків проводять багаторазові схрещування гібридів з сортами. Завдяки повторним зворотнім схрещуванням (беккросам) в гібридному матеріалі поступово посилюються ознаки культурності (рис. 181). Однак беккрос повинен бути помірним, щоб не втратити тих цінних ознак дикого виду, через які здійснювалися схрещування.

Надійним методом подолання стерильності міжвидових і міжродових гібридів є *подвоєння у них числа хромосом*. Оскільки у одержаних таким чином амфідиплоїдів кожна хромосома матиме гомолога, мейоз проходить нормально, з утворенням життєздатних гамет, які містять по одному геному схрещуваних видів (див. Поліплоїдія і селекція).

2. Культура ізолюваних клітин і тканин. Голі протопласти як об'єкти для перенесення генів

Культура ізолюваних тканин і клітин — це метод вирощування відокремлених від організму тканин і клітин на відповідних поживних середовищах за умов стерильності. Засновниками цього методу є американські вчені Р. Гаррісон (1907) і А. Каррель (1912). Методи вирощування рослинних тканин були розроблені значно пізніше Ф. Уайтом і Р. Готре.

У культурі ізолювані клітини і тканини зберігають характерні властивості того виду, з якого вони були взяті. Це зумовлюється стабільністю їх основних генетичних характеристик, адже соматичні клітини мають такий самий генотип, як і зигота, з якої вони виникли. Здебільшого клітини зберігають здатність до специфічних для певного виду синтезів. Наприклад, клітини нирок людини *in vitro* можуть синтезувати урокіназу, клітини ссавців — противірусний білок інтерферон, а клітини женьшеню — фармакологічно активні сполуки, які мають значний стимулюючий ефект. Крім того, в культурі тканин адекватно відбиваються навіть комплексні фізіологічні властивості виду, такі як стійкість до низьких температур. Так, калусні клітини лимону виявляються нестійкими до низьких температур, а клітини яблуні сибірської та ялини витримують проморожування до -50°C .

Методи культивування клітин аналогічні методам культивування мікроорганізмів. Культура ізолюваних тканин, набирає дедалі ширшого застосування і дає цінні для людини продукти. Так, в Україні працюють біотехнологічні виробництва з одержання женьшеню на основі культури тканин.

Культура клітин і тканин використовується також в наукових дослідженнях. Вона є зручною моделлю для вивчення процесів диференціації клітин як основи індивідуального розвитку та морфогенезу.

У культурі соматичних клітин було виявлено можливість їхнього злиття. Злиття диплоїдних соматичних клітин і їхніх ядер одержало назву соматичної гібридизації. Цікаво, що зливатися можуть клітини різних видів. Внаслідок цього утворюється гетерокаріон, тобто клітина, яка містить ядра двох видів, наприклад людина/комар; людина/миша. Після злиття ядер утворюється гібридна клітина.

Для одержання соматичних гібридів дві культури клітин після їх спеціальної обробки змішують у посудині з поживним середовищем і залишають на кілька годин (рис. 106). Спонтанне злиття клітин різного генотипу відбувається рідко, і для його стимуляції використовують інактивованій вірус Сендая, нешкідливий для людини і тварин. Потім суспензію вихідних і гібридних клітин висівають на селективне

середовище, на якому гібридні клітини розмножуються і дають початок клонам.

Незважаючи на зусилля, домогтися злиття рослинних клітин довго не вдавалося. Клітинна оболонка в них товста і міцна, і вірус Сендая не сприяє їхньому злиттю.

В останні десятиріччя було розроблено метод одержання ізольованих протопластів із клітин різних тканин рослин. Під впливом целюлолітичних і пектолітичних ферментів розчиняється клітинна оболонка. Живий вміст клітин не пошкоджується і одержують так звані ізольовані (голі) протопласти. Вихід їх дуже високий, можна одержати суспензію, в 1 мл якої міститься до 1 млн протопластів. При перенесенні на поживне середовище голі протопласти за дві доби регенерують нову клітинну оболонку. Вони можуть ділитися, дедиференціюватись і перетворюватися в калусну 47тканину, яка за своїми біохімічними ознаками схожа з меристематичною. Якщо для певного виду рослин умови індукції морфогенезу вже відомі, з калусної тканини можна одержати ембріоїди (зачатки), які після їх відокремлення перетворюються в цілі рослини.

Ізольовані протопласти використовують для введення ДНК, яка викликає генетичну трансформацію клітин. Так, за допомогою λ -фага був перенесений *lac*-оперон Е. соді в клітини помідорів. Внаслідок цього вони почали використовувати лактозу як джерело вуглецевого живлення.

Під час змішування суспензійних культур голих протопластів двох видів утворюються гібридні клітини. Універсальним індуктором злиття соматичних клітин та ізольованих протопластів є поліетиленгліколь. Бар'єру несумісності при цьому не існує. Під час застосування поліетилен-гліколю зливаються клітини людини і миші, 'людини і хом'яка, людини і комара, пшениці і ячменю, помідорів і картоплі і навіть людини і тютюну.

Завдяки соматичній гібридизації можна здійснити рекомбінацію генетичного матеріалу віддалених в еволюційному відношенні організмів. Злиття відбувається з великою частотою і одна клітина з п'яти може виявитися рекомбінантною. Цей метод застосовують також для актиноміцетів, бацил, корінебактерій, нитчастих грибів, дріжджів та інших організмів.

Яке наукове і практичне значення методу соматичної гібридизації?

Метод соматичної гібридизації використовується в генетиці для картування генів, зокрема в такого складного генетичного об'єкту, як людина. З цією метою одержують, наприклад, соматичні гібридні клітини людини і миші. Вони характеризуються двома важливими особливостями:

1. Випадковою елімінацією (втратою) хромосом одного з видів.
2. Одночасним проявом генів обох компонентів.

У процесі розмноження гібридних клітин втрачаються, звичайно, хромосоми людини, а хромосоми миші залишаються ($2n$ миші = 40; $2n$ людини = 46). Переважна більшість клітин містить від 41 до 55 хромосом (40 мишачих + кілька людських).

Для картування генів спочатку з'ясовують, чи розміщені два або більше генів в одній хромосомі, а потім з'ясовують, в якій хромосомі та в якій її ділянці локалізуються окремі гени. Випробовуючи ряд клонів на наявність різних ферментів людини, порівнюють характер вираженості генів (тобто наявність ферментів) з присутністю або відсутністю певних хромосом. Два гени, які присутні або відсутні завжди разом, вважаються синтенними, тобто розміщеними в одній хромосомі. Одержання однохромосомних ліній (40 мишачих хромосом + 1 певна хромосома людини) значно полегшує роботу.

Для того щоб визначити, в якому місці хромосоми знаходиться ген, використовують хромосомні перебудови – транслокації (міжхромосомні обміни фрагментами) та делеції (втрати окремих ділянок хромосом, у даному разі кінцевих).

Розглянемо конкретний приклад визначення локалізації гена тимідинкінази (ТК), який знаходиться в 17-й хромосомі.

Клітини миші, які не мають ТК (позначені TK^-), гібридизували з клітинами людини (TK^+). Клітини гібридної лінії, які містили транслокацію довгого плеча 17-ї хромосоми на хромосому миші, виживали в середовищі ГАТ (середовище, яке містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин), що свідчило про те, що ген ТК міститься в довгому плечі хромосоми б. Для індукції делецій додавали аденовірус 12, і клітини з різними розмірами транслокацій вирощували на неселективних середовищах в. Під час їх випробування на середовищі ГАТ з'ясувалось, що клітини, які втратили більшу частину плеча 17-ї хромосоми, гена ТК не мали (не утворювали фермента), а ті клітини, які мали більшу частину або все плече, мали цей ген. Порівняння трьох точок розривів дозволило локалізувати ген тимідинкінази.

Завдяки використанню методу соматичної гібридизації вдалося визначити локалізацію багатьох генів людини. Таким самим способом можна картувати гени в сільськогосподарських тварин і це, безперечно, сприятиме прогресу їх селекції.

Практичне значення методу соматичної гібридизації для генетики в тому, що з його використанням можна створювати нові гібриди рослин, які не вдається одержати статеву гібридизацією. Завдяки цьому методу вдається долати міжвидові й навіть міжродові бар'єри.

У 1972 р. американські дослідники вперше одержали рослину, яка утворилася з гібридного протопласту двох видів тютюну.

У 1978 р. Г. Мельхерс одержав рослину з продукту злиття протопластів помідорів і картоплі (помітопля). Р. Г. Бутенко (Інститут фізіології рослин, Москва) створила соматичний гібрид двох віддалених видів картоплі. Японські дослідники шляхом злиття протопластів рису і проса вперше в світі одержали соматичні гібриди однодольних.

У 1978 р. Ю. Ю. Глеба (Київ) розробив метод культивування окремих протопластів у мікрокраплях. Певна кількість протопластів розвивалися в цілі рослини. Він одержав соматичний гібрид арабідопсису і рапсу – *Arabidobrassica* (*Arabidopsis thaliana* + *Brassica rapa*).

Внаслідок злиття протопластів мікроризного гриба з роду *Rhizogon* і клітин азотобактера був одержаний гібридний організм, який став фіксувати азот. Ця здатність нового організму збереглася в природних умовах на коренях сосни.

Дж. Пауер одержав соматичні гібриди двох видів петунії, які не схрещувалися звичайним статевим шляхом. Завдяки цьому від виду *Petunia parviflora* в селекцію цієї декоративної рослини ввели нову ознаку – розгалужене сланке стебло.

Цікаво, що шляхом соматичної гібридизації утворюються гібриди між раковими і нормальними клітинами. Це застосовують для одержання гібридом – продуктів злиття лімфоцитів і пухлинних клітин кісткового мозку. Гібридами продукують моноклональні антитіла. Цю особливість вони успадковують від певного клону лімфоцитів. Разом з цим гібридами здатні до необмеженого поділу на поживному середовищі. Ця властивість потенційного безсмертя одержана ними від пухлинних клітин.

Моноклональні антитіла здатні розпізнавати різні типи макромолекул та їхні індивідуальні особливості. Вони мають значні переваги над звичайними сиворотками, оскільки ідеально реагують з певною органічною субстанцією і використовуються для діагностики і лікування захворювань.

3. Тотіпотентність рослинних клітин. Тотіпотентність тваринних клітин раннього зародку

Клітина, яка здатна реалізувати генетичну інформацію дати початок усім типам тканин і цілому організму, називається *тотіпотентною*. Прикладом такої клітини може бути зигота.

Біологів здавна цікавило питання про те, до якого часу в ході диференціації клітин зберігається ця властивість. Розділяючи ранні зародки амфібій на окремі клітини, дослідники переконалися в тому, що клітини

певний час залишаються тотипотентними. Природним доказом тотипотентності клітин раннього зародка є народження ідентичних близнюків у людини (кожна з 2-4 клітин у разі їх спонтанного роз'єднання може дати початок нормальному ембріону). У 8-клітинному зародку кролика можна вбити голкою 7 клітин і лише з однієї одержати нормальну тварину.

Ще в 1902 р. німецький ботанік Г. Габерланд вперше вловив думку про те, що всі живі рослинні клітини тотипотентні. Він вважав, що шматочок рослинної тканини і навіть окрема клітина здатні утворити цілу рослину, але він не зміг цього здійснити, оскільки на той час вчені не знали як культивувати рослинні клітини *in vitro* і які речовини слід додати до культурального середовища, щоб примусити калусну тканину диференціюватися.

Для вивчення питання тотипотентності клітинних ядер у ході диференціації американські вчені Р. Бріггс і Т. Кінг у 1952 р. розробили метод трансплантації ядер у без'ядерні (енуклейовані) яйцеклітини жаби. При цьому ядро яйцеклітини вилучають тонкою голкою, а скляною мікропіпеткою вносять ядро однієї з клітин раннього зародка. Ядра клітин, взяті із зародка на стадії бластули, у 80% випадків забезпечували нормальний розвиток. Під час трансплантації ядер з клітин зародка, який перебував на стадії гастрული, нормальний розвиток спостерігався лише в 20 % випадків. Якщо ж використовувались ядра клітин зародка, в якому почав формуватись зачаток центральної нервової системи, то в жодному з випадків не спостерігалось утворення нормальних зародків. Ці факти свідчили про стабільну інактивацію багатьох генів у ході диференціації клітин, адже цитоплазма яйця не змогла активувати ті гени, які забезпечують нормальний розвиток.

Цікаві дослід з трансплантації ядер у південно-африканської жаби (*Xenopus laevis*) провів англійський дослідник Д. Гордон. В енуклейовані (шляхом опромінення ультрафіолетом) яйцеклітини він переніс ядра, які були взяті з епітелію кишок пуголовка. З'ясувалося, що 1% яйцеклітин з пересадженими ядрами розвивалися нормально і дали початок статевозрілим особинам.

Цей дослід засвідчив, що високоспеціалізована клітина *Xenopus* містить усі гени, потрібні для проходження онтогенезу. Прояв генів пересадженого ядра змінюється; цитоплазма яйця репрограмує діяльність ядра, переводить з диференційованого в початковий стан.

Можливість репрограмування ядра цитоплазмою була ще раз експериментально доведена Е. Робертисом та Д. Гордоном. Вони вводили в овоцити тритона безліч ядер клітин нирок південноафриканської жаби. Застосовуючи двомірну хроматографію в гелі та мічені амінокислоти, дослідники показали, що в овоцитах тритона синтезуються білки,

характерні для овоциту жаби. Ці білки не синтезувалися в клітинах нирок. Разом з цим специфічні для нирок гени не проявляли своєї активності.

Рослинні клітини здатні до повторної диференціації. Будь-яка жива рослинна клітина може реалізувати генетичну інформацію і дати початок усім типам тканин і цілому рослинному організму.

Цю думку, висловлену вперше Г. Габерландтом, було підтверджено Ф. Стюардом в 1950р. Він ізолював маленький шматок флоеми кореня моркви і вмістив його в рідке культуральне середовище у колбу, яка оберталася. В середовищі була сахароза, фізіологічно необхідні елементи і окремі вітаміни. Однак для росту і диференціації потрібні були ще якісь речовини. Ф. Стюард виявив їх у кокосовому молоці. Під час його додавання клітини, які відокремлювалися від ростучої клітинної маси, після перенесення їх на агаризоване середовище ділилися і в окремих випадках утворювали пагони. Цей експеримент засвідчив, що флємні клітини містять всю генетичну інформацію, потрібну для розвитку типової рослини цього виду. За наявності відповідних сигналів, які надходять з навколишнього середовища, у ізолюваних клітинах «включаються» гени, які не експресувалися в клітинах флоеми.

У культурі ізолюваних клітин і тканин можна одержати цілу рослину з клітин пелюстки квітки, пиляка, мікроспори, в'язальця пиляка, флоеми, паренхімних клітин бульби картоплі, серцевини стебла тощо. Тотипотентність є цікавою властивістю рослинних клітин.

Високоспеціалізовані тканини і клітини різних органів рослини під час вміщення їх на штучне поживне середовище, яке містить мінеральні солі, цукри, а також речовини регуляторної природи, зазнають дедиференціації (втрачають свою спеціалізацію) і починають анархічно і неорганізовано розмножуватися. Внаслідок цього виникає так звана калусна тканина. Калус становить собою масу недиференційованих клітин, які утворюються під час поранення і культивування *in vitro*. Обов'язковою умовою дедиференціації клітин і перетворення їх у калусну тканину є наявність у поживному середовищі фітогормонів (кінетину і ауксину), які відіграють важливу роль у процесі онтогенезу. У культурі калусних тканин при відповідному співвідношенні регуляторних речовин може бути експериментально реалізована потенція всіх типів морфогенезу. При цьому можуть виникати сформовані заново корені, пагони, листки і квітки. Калусна клітина може дати початок соматичному зародку (ембріюїду), який перетворюється потім у цілу рослину, яка здатна цвісти і давати потомство. Цей процес називають *соматичним ембріогенезом*.

Отже, калусні клітини за своїми потенціями проходження нормального онтогенезу еквівалентні зиготі. Калусна тканина може виникати з будь-якої клітини, яка не втратила ядро і цитоплазму. Звідси

ми робимо висновок про те, що всі рослинні клітини тотипотентні і кожна з них може ти будь-якою іншою рослинною клітиною під час наступної диференціації.

Однак умови, які викликають диференціацію калусних тканин і призводять до утворення ембріодів, відомі ще не для всіх видів рослин. Проте ці невдачі не є спростуванням тотипотентності рослинних клітин. Вони свідчать лише про те, що ми ще не знаємо умов, потрібних для індукції соматичного ембріогенезу даного виду.

Здатність до соматичного ембріогенезу властива також губкам, кишковопорожнинним і червам.

Клітини ссавців культивуються важко, а примусити їх диференціюватися ще важче, оскільки вони високоспеціалізовані. Рівень складності, який був досягнутий внаслідок диференціації, буває таким високим, наприклад у нейронів, що перешкоджає навіть росту і поділу клітин. Хоча в ядрах диференційованих клітин зберігається генетичний матеріал, більша його частина залишається репресованою і активувати його, здебільшого, не вдається.

5. Гібридоми

Цікаво, що шляхом соматичної гібридизації утворюються гібриди між раковими і нормальними клітинами. Це застосовується для одержання гібридом – продуктів злиття лімфоцитів і пухлинних клітин кісткового мозку. Гібридоми продукують моноклональні антитіла. Цю особливість вони успадковують від певного клону лімфоцитів. Разом з цим гібридоми здатні до необмеженого поділу на поживному середовищі. Ця властивість потенційного безсмертя одержана ними від пухлинних клітин. Моноклональні антитіла здатні розпізнавати різні типи макромолекул та їхні індивідуальні особливості. Вони мають значні переваги над звичайними сиворотками, оскільки реагують з певною органічною субстанцією і використовують для діагностики і лікування захворювань.

В.А. Енгельгардт вважає, що є всі можливості виробляти антитіла, спрямовані проти одного конкретного індивідуального білка. Ці клітини (гібридоми) успішно розвиваються поза організмом, в культурі *in vitro*, і завдяки цьому можна одержувати значну кількість ідеальних чистих антитіл. Гібридоми – ідеальні інструменти діагностики багатьох хвороб, особливо раку.

6. Роль ядра в спадковості. Трансплантація ядер. Клонування.

Ядра мають усі еукаріотичні клітини, за винятком зрілих члеників ситовидних трубок флоєми і зрілих еритроцитів ссавців. З усіх органоїдів

ядра найпомітніші, і тому вони були описані першими серед клітинних структур у 1825—1839 рр.

Ядро – інформаційний центр клітини, у якому зосереджена основна частина генетичної інформації у формі ДНК. Воно виконує три основні функції. 1. Зберігає інформацію; 2. Передає її у цитоплазму; 3. Відтворює генетичну інформацію і рівномірно розподіляє її між дочірніми клітинами в процесі їх авторепродукції.

Матеріальний зв'язок між поколіннями у разі статевого розмноження здійснюється гаметами. Зливаючись, вони дають початок зиготі, з якої шляхом мітотичних поділів і диференціації клітин виникає цілісний організм з характерними для нього ознаками. Чоловічі та жіночі гамети істотно відрізняються за формою, розмірами та вмістом цитоплазми, але вони рівнозначні за ядрами. У зрілому сперматозооні ядро, яке розміщене в головці, ущільнене. Коли сперматозоон проникає в яйцеклітину, його ядро розрихлюється і стає подібним до ядра жіночої гамети. Інформаційний (ядерний) внесок у зиготу сперматозоона і яйцеклітини є однаковим ($n + n$ хромосом).

Ядру в явищах спадковості належить вирішальна роль, але абсолютизувати її все ж не слід. Спадковість є властивістю живої системи (клітини, організму), а не її окремого компонента. Морфофункціональна єдність клітини забезпечується взаємодією ядра і цитоплазми. В ядро з цитоплазми надходять речовини регуляторної природи, які впливають на активність генів, а також попередники і ферменти, необхідні для реплікації ДНК, синтезу РНК, побудови хромосом та інших структур. З ядра у цитоплазму надходять продукти генної активності (іРНК), які забезпечують синтез специфічних білків.

Отже, ядро керує всіма білковими синтезами і через них біохімічними, фізіологічними і морфологічними процесами в клітині, а цитоплазма за принципом зворотного зв'язку регулює активність генетичного апарату ядра і забезпечує його матеріалами і енергією. Ядерно-цитоплазматична взаємодія ускладнюється тим, що в ній, крім ядра, беруть участь інші ДНК-вмісні структури – мітохондрії і пластиди.

Докази ядерної детермінації ознак отримані під час дослідів по трансплантації ядер (лат. *transplantatio* – пересаджування), одержанню андрогенних особин та клонуванню генотипів.

Зручним об'єктом для трансплантації окремих частин і ядер виявилася одноклітинна водорість теплих морів ацетабулярія. Її клітина і ядро мають великі розміри (5 см і 0,1 мм). Молода водорість, яка утворюється з зиготи, спочатку має лише ризоїд і ніжку, на якій пізніше утворюється шляпка. Вона складається з численних мішкоподібних вмістилищ – цист, які існують для розмноження. До утворення цист в ацетабулярії є лише одне ядро, яке розміщене в ризоїді. Два види

ацетабулярії — *Acetabularia mediterranea* і *A. wettsteinii* — відрізняються за формою шляпки (перший вид має велику парасолькоподібну шляпку). Якщо без'ядерний відрізок ніжки *A. mediterranea* щепити з ризоїдом *A. wettsteinii*, компоненти зростуться і відрізок ніжки одного виду (*A. mediterranea*) регенерує шляпку іншого виду (*A. wettsteinii*). Це свідчить проте, що контроль за формою шляпки здійснюється ядром.

Якщо з молодой водорості одного виду, яка ще не утворила шляпку, вилучити її власне ядро і перенести в ризоїд ядра іншого виду, то такий ядерно-плазматичний гібрид утворить типову для донора ядра шляпку. Перенесення в одну клітину ацетабулярії ядер різних видів призводить до утворення шляпки з проміжною формою.

Переконливим доказом ядерної детермінації окремих ознак є досліди Б. Л. Астаурова з шовкопрядами. Для шовкопряда властиве явище *фізіологічної поліспермії* — проникнення в яйце під час запліднення багатьох сперматозоонів. У цитоплазмі яйцеклітини головки всіх сперматозоонів перетворюються у чоловічі пронуклеуси. Один з них з'єднується з жіночим ядром, утворюючи ядро зиготи, а інші дегенерують.

Ядро яйця, на відміну від цитоплазми, дуже чутливе до температурних впливів і радіації. Тому температурним шоком і опроміненням можна зруйнувати ядро яйцеклітини, не викликавши необоротних змін у цитоплазмі. Якщо яйцеклітини із зруйнованим ядром запліднити, два чоловічі пронуклеуси зливаються і виникає зигота, яка має цитоплазму материнської форми (*BB*), а ядро ($2n$) — батьківської (*bb*). Особини, які розвиваються на основі ядра батьківської форми і цитоплазми яйцеклітини, називають *андрогенними* (рис. 9). Вони копіюють батьківську форму (донора ядра) за багатьма ознаками, зокрема за статтю і забарвленням гусені. У андрогенних особин виявилася рецесивна ознака білого забарвлення. Це свідчить, що її детермінат знаходиться в ядрі, одержаному від батька.

Руйнуючи таким чином ядра яйцеклітин мандаринового шовкопряда і запліднюючи їх сперматозоонами шовковичного шовкопряда, Б. Л. Астауров одержав потомство, яке копіювало батьківську форму за багатьма ознаками.

Значний інтерес викликає проблема копіювання генотипів у вищих форм. Ідея копіювання полягає в тому, щоб виключити з яйцеклітин їх власні ядра і ввести замість них диплоїдні ядра з бажаним для експериментатора генотипом. Якщо такі гібридні яйцеклітини розвиватимуться, можна буде одержати *клон* — сукупність організмів, які виникають від одного предка шляхом безстатевого розмноження. Особини певного клону мають однаковий генотип. Користуючись відповідними методами, можна добути з матки ссавців (і навіть людини) незапліднені яйцеклітини і запліднити їх *in vitro*. Запліднені таким чином яйця

імплантуються в матку матері або «нерідної матері» і дають початок ембріону. Цей підхід був використаний у 1981 р. К. Ілменсі і П. Хоппе для одержання клонів мишей.

Природним доказом генетичної рівноцінності клітин, що виникають шляхом мітозу, є однайцеві близнюки. Вони утворюються з однієї зиготи, яка зазнає мітотичного поділу. Утворені клітини відокремлюються і дають початок двом або кільком ембріонам. Отже, тут маємо безстатеве розмноження. Такі близнюки внаслідок ідентичності генетичної програми (ДНК) мають однакові білки, і імунологічної несумісності під час трансплантації тканин і органів у них не спостерігається. Обмін речовин відбувається однотипне, що й забезпечує високу морфологічну подібність.

Чимало видів рослин, тварин і мікроорганізмів розмножуються безстатевим шляхом за допомогою мітотичного поділу клітин. Сукупність клітин або особин, які виникли від спільного предка шляхом безстатевого розмноження, називають *клоном*. Прикладами клонів можуть бути: однайцеві близнюки, окремі колонії мікроорганізмів, сорти рослин, які розмножуються вегетативно. Клони характеризуються високою генетичною стабільністю потомства навіть у разі гетерозиготності вихідного предка.

Більшість сортів плодових і всі сорти картоплі є клонами, тобто вегетативним потомством однієї рослини, відібраної селекціонером. І тому, коли ми щеплюємо Кальвіль сніговий з будь-якою підщепою, дичкою або культурним сортом, то завжди впевнені в тому, що в майбутньому матимемо типові для цього сорту яблука, незважаючи на фізіологічний взаємовплив компонентів.

Слід зауважити, що ріст рослин і тварин зумовлюється мітотичним поділом клітин і їх ростом. Усі клітини певного організму, наприклад людини, належать до одного клону.

Клітина, яка здатна реалізувати генетичну інформацію дати початок усім типам тканин і цілому організму, називається *тотіпотентною*. Прикладом такої клітини може бути зигота.

Біологів здавна цікавило питання про те, до якого часу в ході диференціації клітин зберігається ця властивість. Розділяючи ранні зародки амфібій на окремі клітини, дослідники переконалися в тому, що клітини певний час залишаються тотіпотентними. Природним доказом тотіпотентності клітин раннього зародка є народження ідентичних близнюків у людини (кожна з 2-4 клітин у разі їх спонтанного роз'єднання може дати початок нормальному ембріону). У 8-клітинному зародку кролика можна вбити голкою 7 клітин і лише з однієї одержати нормальну тварину.

Ще в 1902 р. німецький ботанік Г. Габерланд вперше вловив думку про те, що всі живі рослинні клітини тотірантні. Він вважав, що

шматочок рослинної тканини і навіть окрема клітина здатні утворити цілу рослину, але він не зміг цього здійснити, оскільки на той час вчені не знали як культивувати рослинні клітини *in vitro* і які речовини слід додати до культурального середовища, щоб примусити калусну тканину диференціюватися.

Для вивчення питання тотипотентності клітинних ядер у ході диференціації американські вчені Р. Бріггс і Т. Кінг у 1952 р. розробили метод трансплантації ядер у без'ядерні (енуклейовані) яйцеклітини жаби. При цьому ядро яйцеклітини вилучають тонкою голкою, а скляною мікропіпеткою вносять ядро однієї з клітин раннього зародка. Ядра клітин, взяті із зародка на стадії бластули, у 80 % випадків забезпечували нормальний розвиток. Під час трансплантації ядер з клітин зародка, який перебував на стадії гаструли, нормальний розвиток спостерігався лише в 20 % випадків. Якщо ж використовувались ядра клітин зародка, в якому почав формуватись зачаток центральної нервової системи, то в жодному з випадків не спостерігалось утворення нормальних зародків. Ці факти свідчили про стабільну інактивацію багатьох генів у ході диференціації клітин, адже цитоплазма яйця не змогла активувати ті гени, які забезпечують нормальний розвиток.

Цікаві дослід з трансплантації ядер у південно-африканської жаби (*Xenopus laevis*) провів англійський дослідник Д. Гордон. В енукейовані (шляхом опромінення ультрафіолетом) яйцеклітини він переніс ядра, які були взяті з епітелію кишок пуголовка. З'ясувалося, що 1% яйцеклітин з пересадженими ядрами розвивалися нормально і дали початок статевозрілим особинам.

Цей дослід засвідчив, що високоспеціалізована клітина *Xenopus* містить усі гени, потрібні для проходження онтогенезу. Прояв генів пересадженого ядра змінюється; цитоплазма яйця репрограмує діяльність ядра, переводить з диференційованого в початковий стан.

Можливість репрограмування ядра цитоплазмою була ще раз експериментально доведена Е. Робертисом та Д. Гордоном. Вони вводили в овоцити тритона безліч ядер клітин нирок південноафриканської жаби. Застосовуючи двомірну хроматографію в гелі та мічені амінокислоти, дослідники показали, що в овоцитах тритона синтезуються білки, характерні для овоциту жаби. Ці білки не синтезувалися в клітинах нирок. Разом з цим специфічні для нирок гени не проявляли своєї активності.

Рослинні клітини здатні до повторної диференціації. Будь-яка жива рослинна клітина може реалізувати генетичну інформацію і дати початок усім типам тканин і цілому рослинному організму.

Цю думку, висловлену вперше Г. Габерландтом, було підтверджено Ф. Стюардом в 1950 р. Він ізолював маленький шматок флоєми кореня моркви і вмістив його в рідке культуральне середовище у колбу, яка

оберталася. В середовищі була сахароза, фізіологічно необхідні елементи і окремі вітаміни. Однак для росту і диференціації потрібні були ще якісь речовини. Ф. Стюард виявив їх у кокосовому молоці. Під час його додавання клітини, які відокремлювалися від ростучої клітинної маси, після перенесення їх на агаризоване середовище ділилися і в окремих випадках утворювали пагони. Цей експеримент засвідчив, що флоемні клітини містять всю генетичну інформацію, потрібну для розвитку типової рослини цього виду. За наявності відповідних сигналів, які надходять з навколишнього середовища, у ізолюваних клітинах «включаються» гени, які не експресувалися в клітинах флоєми.

У культурі ізолюваних клітин і тканин можна одержати цілу рослину з клітин пелюстки квітки, пиляка, мікроспори, в'язальця пиляка, флоєми, паренхімних клітин бульби картоплі, серцевини стебла тощо. Тотипотентність є цікавою властивістю рослинних клітин.

Високоспеціалізовані тканини і клітини різних органів рослини під час вміщення їх на штучне поживне середовище, яке містить мінеральні солі, цукри, а також речовини регуляторної природи, зазнають дедиференціації (втрачають свою спеціалізацію) і починають анархічно і неорганізовано розмножуватися. Внаслідок цього виникає так звана калусна тканина. Калус становить собою масу недиференційованих клітин, які утворюються під час поранення і культивування *in vitro*. Обов'язковою умовою дедиференціації клітин і перетворення їх у калусну тканину є наявність у поживному середовищі фітогормонів (кінетину і ауксину), які відіграють важливу роль у процесі онтогенезу. У культурі калусних тканин при відповідному співвідношенні регуляторних речовин може бути експериментально реалізована потенція всіх типів морфогенезу. При цьому можуть виникати сформовані заново корені, пагони, листки і квітки. Калусна клітина може дати початок соматичному зародку (ембріюїду), який перетворюється потім у цілу рослину, яка здатна цвісти і давати потомство. Цей процес називають *соматичним ембріогенезом*.

Отже, калусні клітини за своїми потенціями проходження нормального онтогенезу еквівалентні зиготі. Калусна тканина може виникати з будь-якої клітини, яка не втратила ядро і цитоплазму. Звідси ми робимо висновок про те, що всі рослинні клітини тотипотентні і кожна з них може ти будь-якою іншою рослинною клітиною під час наступної диференціації.

Однак умови, які викликають диференціацію калусних тканин і призводять до утворення ембріюїдів, відомі ще не для всіх видів рослин. Проте ці невдачі не є спростуванням тотипотентності рослинних клітин. Вони свідчать лише про те, що ми ще не знаємо умов, потрібних для індукції соматичного ембріогенезу даного виду.

Здатність до соматичного ембріогенезу властива також губкам, кишковопорожнинним і червам.

Клітини ссавців культивуються важко, а примусити їх диференціюватися ще важче, оскільки вони високоспеціалізовані. Рівень складності, який був досягнутий внаслідок диференціації, буває таким високим, наприклад у нейронів, що перешкоджає навіть росту і поділу клітин. Хоча в ядрах диференційованих клітин зберігається генетичний матеріал, більша його частина залишається репресованою і активувати його, здебільшого, не вдається.

Наприкінці XX ст. спеціалісти Рослінського інституту (Шотландія) повідомили про вівцю Доллі, що з'явилася на світ завдяки трансплантації ядер. Доктор Кемпбел з клітин грудної залози вагітної 6-річної вівці добували ядра і переміщували їх в еноклейовані яйцеклітини інших овець. Було проведено 400 таких маніпуляцій і лише в 1 випадку (з 400) народилася Доллі, генотип якої був ідентичний генотипу вівці-донора ядра.

Лекція №7

План:

1. Генетично модифіковані організми (ГМО) і генетично модифіковані харчові продукти. Ставлення до них в США і Європі.
2. Відсутність законів, що регулюють вирощування і використання ГМО в Україні.
3. США – лідер в галузі генної інженерії та практичного використання ГМО.
4. Проблема потенційної небезпеки ГМО для людини та екосистем.
5. Досягнення генної інженерії у мікроорганізмів, рослин і тварин. Перспективи генної інженерії та її значення у вирішенні проблеми харчових ресурсів.
6. Потенційна небезпека перенесення генів, що викликають захворювання на рак та інших генів, що зумовлюють комплексну стійкість до антибіотиків у бактерій. (Самостійно).
7. Генна інженерія і біологічна зброя. Техніка безпеки. (Самостійно).
8. Поняття стовбурових клітин та їх значення в життєдіяльності організму.
9. Стовбурові клітини та їх плюропотентність. Донор-рекордист, занесений до книги рекордів Гіннеса (480 л. крові).
10. Стовбурові клітини та їх використання в медицині.

1. Генетично модифіковані організми (ГМО) і генетично модифіковані харчові продукти. Ставлення до них в США і Європі.

Визначення ГМО. Приклади ГМО (морозостійка картопля, картопля, що не пошкоджується колорадський жуком, помідори з перенесеними до них генами американської плоскої риби (стійкі до низьких температур), *E. coli* з генами інсуліну, інтерферону та соматотропіну людини, помідорні дерева, які плодоносять цілий рік і дають кілька центнерів плодів з рослини (Японія), бактерії, що очищають середовище від нафтових забруднень (Росія) та ін.

Докладно розповісти про трансгенну картоплю (фірма Монсанта), в яку перенесено ген, що кодує білок з інсектицидними властивостями у *Bacillus thuringiensis*. ГМО одержують шляхом введення в генотип різних с-г культур генів інших рослин, тварин, бактерій і навіть людини.

Але перенесення лише 1 гена надає організмові лише одну бажану для людини властивість і не може впливати на комплекс ознак.

Сучасна наука ще не навчилася вміло маніпулювати з усім арсеналом генів. Кількісні ознаки організмів зумовлені поліченно, а що це за гени ми не знаємо. А саме ці ознаки найбільше цікавлять людину. Вважають, що ГІ тепер і в майбутньому допоможе виробляти більше

продуктів харчування для населення планети, яке збільшується щоденно на 230 тис. чоловік (Зупинитися на проблемі харчових ресурсів, її загостренні (в останні 3 роки ціни на ХП у 2 рази), та внеску генетики, селекції та ГІ у вирішення цієї проблеми).

Генетично модифіковані харчові продукти (ГМХП) завжди містять у своєму складі певну кількість ГМО (н., варена ковбаса, що містить трансгенну сою, картопляні чіпси з ген. модиф. картоплею). ГМПХ займається харчова біотехнологія.

Американці схильно ставляться до ГМХП і вони поширюються в Штатах високими темпами.

В ЄС спостерігається виважене і навіть скептичне ставлення до ГМХП. Обов'язково на етикетках продтоварів вказано наявність ГМО. Вміст ГМО в ГМХП не повинен перевищувати в ЄС 0,9% ($\approx 1\%$). В Україні обіцяли ввести маркування ГМПХ з січня 2008р. Тестують ГМО лише 3 лабораторії України.

3. США – лідер в галузі генної інженерії та практичного використання ГМО.

США є загальновизнаним лідером в галузі біотехнології, генної інженерії та практичного використання ГМО та ГМПХ. Біотехнологи проводять прямі і точно задані модифікації генетичного матеріалу, переносять гени зовсім не схожих один на одного організмів.

ГІ стала пріоритетною галуззю в світовій науці. У США у цій галузі задіяно десятки тисяч вчених. Так, у Сієтлі (3 млн. мешканців) діє 120 біотехнологічних фірм. Тому і успіхи, досягнені американськими вченими пропорційні колосальним коштам, вкладеним в біотехнологію і генну інженерію. Розробка технологій, що дозволяє примусити бактеріальну клітину виробляти у великій кількості будь-який білок, ознаменувала новий етап науково-технічної революції – ери біотехнології. З використанням цих методів (ГІ) отримано штами-суперпродуценти багатьох білків, що було колись мрією.

Крім структурної і ферментативної білки виконують ще й регуляторну функцію. Майже всі гормони – це невеликі білкові молекули з кількох АК залишків. Раніш виробництво гормонів було складною справою. Простіш було з інсуліном. Тому фармацевтичні фірми США та ін. країн ухопилися за нові можливості ГІ (приклади: гормон росту, інсулін, інтерферон). Інтерферон для вірусів – те ж саме, що антибіотики для бактерій. Його використовують для лікування гепатиту, грипу, енцефаломіокардиту, венеричних хвороб. Всі ці штами сконструйовані на замовлення фірм.

4. Проблема потенційної небезпеки ГМО для людини та екосистем.

В 1974 р., на початку дослідів з ГІ постало питання: «А чи не виникнуть унаслідок перекомбінації генів рекомбінантні молекули ДНК, яких немає в природі і які можуть бути надто небезпечними для людини?». А що може статися, коли такі молекули вийдуть з-під контролю, почнуть інтенсивно розмножуватися, інфікують масу людей і призведуть до загибелі?

У 1973р. у П.Берга, засновника ГІ (Стенфордський ун-т), виникла навіть ідея перенесення ракового гена СВ-40 в *E. coli*. Ця ідея схвилювала Поллака і він висловив Бергу свої сумніви щодо необхідності гуманності такого експерименту. «А чи не зложимо ми міну сповільненої дії з годинниковим механізмом під все людство?», - запитував Поллак. Де гарантія, що така трансформована бактерія не вислизне з лабораторії і не заразить все людство, породить епідемію ракових захворювань?

Занепокоєння Поллака було цілком виправданим. Перенесення онкогена в кишкову паличку, що дуже поширена, могло спровокувати непередбачувані наслідки.

У 1974 р. група Берга опублікована в американському науковому журналі «Сайенс» відкритий лист, що закликав біологів відмовитися від ризикованих експериментів з онкогенами та генами комплексної стійкості бактерій до антибіотиків.

Цей лист підписав і Уотсон. Але безліч вчених не погодилося з таким самообмеженням. З'їзд спеціалістів з ГІ, що відбувся в 1975 р. заборонив роботи з ГІ, але через рік ця заборона була знята. Однак, були розроблені чіткі рекомендації щодо проведення ГІ дослідів, які є надто ризиковими. А маніпуляції з онкогенами та генами хвороботворних мікробів було заборонено. Розроблені заходи безпеки під час дослідів з рек-ДНК і тепер роботи з ГІ проводяться в тисячах лабораторій світу.

На конференції в Ассилмарі передбачалося проводити роботи з рек-ДНК в спецлабораторіях та боксах, щоб не поширювати в середовище біологічну небезпеку.

Чи небезпечні ГМО та ГМПХ для людини і екосистем? Дати впевнену відповідь на це питання поки що не можливо. Потрібні волонтери і довготривалі експерименти тривалість в людське життя і ».

На щурах росіянка Єгорова (д-р біол. н., проф) переконливо довела шкідливість ГМО на піддослідних тварин, їх життєздатність і плодючість, а також смертність серед нащадків. На тваринах доведено шкідливість трансгенних помідор.

Європейці не впевнені в надійності і безпечності ГМПХ. Поки що наука не попередила людство і офіційно не оголосила, чи наносять такі вироби шкоду людському організму. Результати дослідів з ГМО,

проведені на тваринах, не можна екстраполювати на людину; та все ж ці результати викликають занепокоєння.

5. Досягнення генної інженерії у мікроорганізмів, рослин і тварин. Перспективи генної інженерії та її значення у вирішенні проблеми харчових ресурсів.

Генна інженерія дає змогу модифікувати генетичний матеріал. Завдяки цьому гени людини або тварин можуть «працювати» в бактеріальних чи інших клітинах. Цей факт становить значний інтерес для медицини і промисловості, адже таким способом можна буде одержувати у значних

кількостях дефіцитні активні речовини, насамперед білки, які потрібні для лікування численних захворювань. Якщо їх виділяти з тканин людини, то вони можуть бути забрудненими різними вірусами. Так, у 80-х роках в ряді препаратів факторів зсідання крові, призначених для лікування гемофілії, виявили вірус СНІД. Якщо ж ці речовини одержувати з тваринних клітин, то можливі алергічні реакції і навіть відторгнення їх імунною системою пацієнта. Отже, людині потрібні біологічно активні сполуки саме людського походження, але одержані не екстрагуванням з тканин. Генна інженерія може забезпечити одержання таких речовин.

Завдяки генній інженерії створені мікроорганізми з принципово новими для них властивостями, зокрема штамми кишкової палички, які продукують інсулін, соматотропін, інтерферон та багато інших білків.

Гормон підшлункової залози — інсулін — вкрай потрібний для лікування хворих на діабет, а їх в усьому світі понад 60 млн чоловік. Для одержання 100 г кристалічного інсуліну потрібна 1 т підшлункових залоз корів і свиней. Таку ж кількість інсуліну одержують з 500 л культурального середовища *E. coli*, в яку вмонтовано кілька рекомбінантних плазмід. Видоспецифічний гормон соматотропін, який секретується передньою долею гіпофізу, є єдиним засобом лікування дітей з гіпофізарною карликовістю. Частота їх досягає 7—10 на 1 млн чоловік. Для того щоб одержати належний ефект, введення гормону починають з 4—5-річного віку і продовжують до статевої зрілості. Це дефіцитний препарат, попит на який задовольняється менше як на 1/3, бо з одного трупа одержують лише 4—6 мг гормону.

Використовуючи генетичні трансформанти *E. coli*, шведська фірма «Кабі вітрум» з 1 л бактеріальної культури одержала кількість гормона, еквівалентну виділеній з гіпофізу 60 трупів. Гормон, синтезований бактерією, дешевий, чистий в біохімічному і вірусному відношеннях.

Вчені Інституту молекулярної біології (Москва) також створили штам кишкової палички, який продукує соматотропін. Виробництво гормону освоєне на одному з мікробіологічних підприємств. Собівартість виробництва біологічно активних речовин за новою технологією значно нижча, ніж раніш. І тому інсулін людини, інтерферон і гормон росту вже випускаються промисловістю з використанням *E. coli*. Фахівці в галузі генної інженерії стверджують, що ми живемо напередодні промислового випуску білків крові людини. Уже сьогодні створені клітини, які продукують фактори зсідання крові, необхідні для лікування гемофілії А і В.

Промислова мікробіологія використовує сотні штамів мікроорганізмів, які зазнали докорінного селекційно-генетичного поліпшення. Штам у біотехнології — важливий засіб інтенсифікації виробництва. Завдяки генній інженерії вдається одержувати штами з властивістю надсинтезу. Їх промислове використання дає змогу без додаткових затрат одержувати більше антибіотиків, вітамінів, амінокислот, кормового білка, ферментів, гормонів, розчинників тощо.

Так, у колишньому Радянському Союзі методами генної інженерії було створено новий продуцент треоніну, який виробляє цю амінокислоту в 400—700 разів ефективніше, ніж вихідний мікроорганізм. Ліцензію на спосіб виробництва треоніну було продано в Японію та інші країни.

Методами генної інженерії можна збільшити виробництво ферментів введенням в клітину кількох генів цього фермента або встановлення перед ним сильного промотора. Наприклад, продукцію β -амілази було збільшено в 200, а лігази — в 500 разів.

Для країн, які не вирощують сою у значних кількостях, особливо гострою є проблема кормового білка. Для збалансування кормів за білком щороку виробляється значна кількість білкової біомаси (кормових дріжджів). Методами генної інженерії можна поліпшити амінокислотний склад білка, зробити його повноціннішим.

Вчені з'ясовують можливості перенесення в інші бактерії *nif*-генів (генів азотфіксації). Ці гени вже перенесені від вільноживучого азотфіксатора — клебсієли — в клітини *E. coli*, яка внаслідок трансформації почала фіксувати вільний азот. Перенесення генів азотфіксації в ґрунтові мікроорганізми є реальним завданням сучасної біології.

Експерименти генної інженерії сприятимуть вирішенню важливих теоретичних і практичних проблем, але вони можуть бути використані й в антигуманних цілях. Методами генної інженерії можна створити небезпечні для людини і тварин нові типи інфекційних ДНК,

властивості яких важко передбачити. Не слід виключати можливість того, що методи генної інженерії будуть використані для створення небаченої біологічної зброї. Тому прогресивні генетики звернулися до вчених всього світу з закликом активно боротися з цією загрозою.

На XIII Міжнародному генетичному конгресі та на конференціях в Давосі (Швейцарія) та Асиломарі (США) були розроблені заходи техніки генетичної безпеки, які усувають можливість неконтрольованого поширення в природі організмів, які об'єднують у своєму складі гени різного походження.

Завдяки методам ГІ

а) Розшифровано геном людини (2003р.). в роботі брало участь 2800 вчених всього світу. Геном нараховує 30 000 генів. Робота тривала більше 10 років. Загальна схема розшифровки: виділення преп. ДНК кожної хромосоми → рестрикція ДНК на фрагменти → гель електрофорез і розподіл фрагментів за розмірами → секвенування послідовності нукл. кожного фрагмента → визначення послідовності з'єднання фрагментів у складі цілісної хромосоми → визначення повної послідовності нуклеотидів кожної хромосоми → визначення повної послідов. нуклеотидів геному (=24 томи).

В геномі людини нукл послідовності, що кодують білки (екзони) займають 1,4 % від всієї ДНК. Тому, за висловом Кисельова геном це те, чого ми не розуміємо.

б) На сьогодні досліджено 800 повних клітинних геномів, зокрема людини, дрозофіли, *E. coli*, дріжджів та ін.

в) В Х-хромосомах людини виявлено 208 генів, що можуть викликати хвороби. В Y-хромосомі мінімум – 82 гени; у І-й – 2237 а можливо і більше; 22-хромосома містить більше ДНК, ніж 21.

г) Генетично модифіковано більше 120 видів рослин, зокрема сою, кукурудзу, рис, рапс, бавовник, гарбуз, диню та ін.

д) Моноклональні антитіла – гібридами; їх значення для медицини;

е) Завдяки методам ГІ вирішена у США проблема лікування хворих на СНІД.

8. Поняття стовбурових клітин та їх значення в життєдіяльності організму.

9. Стовбурові клітини та їх плюропотентність. Донор-рекордист, занесений до книги рекордів Гіннеса (480 л. крові).

10. Стовбурові клітини та їх використання в медицині

У 1981 році американському вченому Евансу вперше вдалося виділити ембріональну стовбурову клітину (ЕСК) з зародку миші. В наступні роки зусилля вчених були спрямовані на пошук і виділення ЕСК

з людського зародку, і в 1998 році американські вчені Томпсон і Черхард досягли успіху. Кожен з них у своїй лабораторії має до 10 ліній ЕСК, які є потенційно безсмертними.

ЕСК характеризуються тим, що генетична інформація знаходиться немовби в «нульовій точці» - G_0 , її геном ще не запустив жодної програми диференціації. Отже, ЕСК недиференційовані клітини, які можуть диференціюватися за певних умов в будь-який тип клітин людського організму (а в організмі людини є 216-350 типів клітин).

ЕСК в зародку дуже мало (соті долі %), і тому дослідникам так важко було їх виділити в «чистому вигляді».

На 4-5 день із заплідненої яйцеклітини утворюються 100-клітинна бластоциста, що має внутрішній шар. Це і є стовбурові клітини, з яких потім формуються всі клітини організму. Якщо ці клітини виділити шляхом руйнування бластоцисти, СК зберігають здатність диференціюватися в найрізноманітніші клітини. Ця унікальна здатність ЕСК дає надію спеціалістам на принципово нові підходи в лікуванні Паркінсона, Альцгеймера, розсіяного склерозу, м'язової дистрофії, діабету, злоякісних лейкемій, наслідків інфарктів та інсультів. ЕСК є плюрипотентними, бо вони за певних умов можуть дати початок будь-якій тканині та органу (*in vitro*). А трансплантація СК дає змогу відновлювати кровотворення у хворих на злоякісну лейкемію (рак крові) та інші незлоякісні хвороби крові. СКК (стовбурові клітини крові) використовують для трансплантації замість трансплантації кісткового мозку у разі опромінення під час аварій та лейкемії. Відчути плюрипотентність СКК також на конкретному прикладі – один австрієць як донор, здав 480 кг крові (півтони) і занесений до книги рекордів Гіннесса. СКК відновили ці втрати, бо вони дали початок всім форменим елементам крові.

Дорослі стовбурові клітини (ДСК) розпилені в усіх тканинах організму, але їх частота є невеликою (менше за 0,1%) і тому їх дуже важко виділити та ідентифікувати.

ДСК – це одиниці регенерації; вони заміщують відмерлі або пошкоджені клітини і підтримують клітинні популяції наших органів на постійному рівні.

Лекція №8

План:

1. Поняття онтогенезу. Розвиток як поступове розгортання генетичної програми.
2. Фактори диференціальної активності генів.
3. Стовбурові клітини (СК) та їх особливості.
4. Джерела стовбурових клітин. Кров пуповини як джерело стовбурових клітин. Банки стовбурових клітин пуповини.
5. Стовбурові клітини крові (СКК). Лікування лейкемії СКК.
6. Класичне застосування СКК в гематології.
7. Клітинна терапія з використанням СК та її перспективи.

1. Поняття онтогенезу. Розвиток як поступове розгортання генетичної програми.

(Див. с. 289–294).

2. Фактори диференціальної активності генів. (Див. с. 294–299).

3. Стовбурові клітини (СК) та їх особливості.

У 1981 р. Мартін аванс (США) вперше виділив ембріональну СК (ЕСК) із зародка миші. У подальшому зусилля вчених були спрямовані на одержання ЕСК з людського зародка. Лише в 1998 р. це вдалося зробити двом американським дослідникам Дж. Томпсону і Дж. Герхардту, які мають понад 10 безсмертних здатних до само розмноження клітинних ліній людських ЕСК

СК – здатні до самопідтримання на протязі всього життя організму недиференційовані клітини, здатні до подальшого диференціювання. СК, що виникли в онтогенезі, в подальшому не зникають, самовідтворюються у разі потреби (дають початок таким же СК). Із СК виникають спочатку напівстовбурові, а потім і диференційовані клітини із специфічною функцією.

Найголовніша властивість ЕСК полягає в тому, що генетична інформація, що міститься в їх ядрах, знаходиться, так би мовити, в „нульовій точці” підрахунку. ЕСК ще не «включили» механізми, що визначають їх спеціалізацію (диференціацію). Таких «нульових» клітин у зародку соті частки %, і тому дослідникам так важко було їх виділити в «чистому» стані.

З ЕСК формуються «острівці» в різних органах і тканинах. По суті наші органи і тканини складаються з диференційованих (спеціалізованих) клітин з вкрапленнями зародкової тканини у вигляді ЕСК.

Вчені вже виділяють ЕСК навіть з головного мозку зародків, а з них природа створює всі типи диференційованих клітин, вона створює все живе. Якщо зберігати зародок в холодильнику (+4 °C), через 4-5 годин всі клітини гинуть, залишаються лише ЕСК, клітини-попередники.

Унікальні властивості СК можна краще зрозуміти, почавши із заплідненої яйцеклітини. Вона зазнає дроблення 2, 4, 8, 16 і т. д. на 4-5 день після запліднення формується 100-клітинна бластоциста, у якій чітко виявляється внутрішній шар. Це і є СК, з яких потім формуються всі тканини організму. Із зовнішнього шару бластоцисти утворюються зародкові оболонки і плацента. Всередині містяться клітини-родоначальники, ЕСК. Кожна з них окремо вже не може вирости в дорослу людину, але може стати будь-яким її органом. Такі клітини називаються плюрипотентними. За певних умов з культури СК можна виростити будь-яку тканину людського організму.

З ЕСК в ході онтогенезу виникають 216 (за деякими даними – 350) типів клітин людського організму.

Якщо ЕСК вирощувати в культурі *in vitro*, з них виникають звичайні недиференційовані, здатні до самооновлення СК, які потім можуть диференціюватися в різні типи клітин і тканин.

ЕСК можуть тривалий час зберігатися за допомогою кріоконсервації (консервації холодом).

СК у незначних кількостях є в тканинах дорослих людей. Вони заміщують клітинні втрати: тканини зношуються і для їх регенерації діють багатофункціональні СК. У дорослих людей добути СК з крові кісткової і нервової тканини. Однак дорослі СК (ДСК) менш ефективні для трансплантації.

Всього в організмі людини близько 100 трлн. Клітин. Клітини кишечника наприклад, повністю змінюються за 10-12 днів, шкіри – за 3-4 тижні, крові – за місяць, серця і печінки за кілька років. Резервні СК, що знаходяться в тканинах дорослого організму, виконують роль «недоторканого запасу» (НЗ). З них утворюються диференційовані клітини, а як тільки СК стала на шлях диференціації, вона заміщується новоутвореною СК. Завдяки цьому загальна кількість СК не змінюється.

Цей «банк СК» - найбільше відкриття в біології після відкриття подвійної спіралі і розшифрування генетичного коду. Геном законсервованих СК дорослих тканин знаходиться в інактивованому стані. Ці клітини можна порівняти зі спорами бактерій, які століттями можуть перебувати в стані анабіозу. Лише при зміні зовнішніх умов вони починають реагувати на зовнішні сигнали, розмножуються і диференціюються.

СК можуть перетворюватися в будь-які клітини організму. Вчені проводять пошук речовин, під дією яких в лабораторних умовах можна викликати ці перетворення, і вивчають молекулярні механізми, що призводять до цього.

Сукупність клітин, які послідовно розвиваються від одного типу стовбурових клітин до зрілої спеціалізованої клітини, має назву **диферону**.

Спеціалізовані клітини водночас із виконанням специфічних функцій здатні до синтезу особливих речовин – **нейлонів**, які гальмують розмноження клітин-попередників та СК. Коли з будь-яких причин кількість зрілих (диференційованих) клітин зменшується (наприклад, після травми) гальмівна дія нейлонів послаблюється, посилюється мітотична активність СК і число спеціалізованих клітин відновлюється. Отже, стовбурова клітина є одиницею регенерації.

Популяція СКК (=СК крові) має такі ознаки:

1. Поліпотентність, тобто вони здатні давати початок всім форменим елементам крові.
2. Здатність до самопідтримання впродовж життя організму; число мітозів, що здійснює 1 СК, може перевищувати 100.
3. Знаходяться в основному в стані G_0 , хоча, у разі потреби, можуть швидко перейти до стану G_1 .
4. СКК мігрують з одних кровотворних органів до інших через кров. Інші СК теж здатні до міграції.

У дорослих ссавців СКК скупчені переважно в червоному кістковому мозку.

Морфологічно СКК не ідентифіковані, що пов'язано з їх малою концентрацією (10^{-4}) у кістковому мозку.

Завдяки діяльності СКК, один літній австралієць, ім'я якого занесено до Книги рекордів Гіннесса, як донор, здав 480 л. донорської крові. Трансплантація СКК здійснюється при гострих і хронічних лейкозах, лімфогранулематозі та інших хворобах (лімфомах), раку молочної залози, незлоякісних захворюваннях.

Стовбурова клітина – одиниця регенерації: при пошкодженні органу і клітинних втратах СК «включаються в роботу». Доведено ефективність трансплантації СКК після загального опромінення.

СК стали об'єктом генетичної інженерії, об'єктом трансгенезу, об'єктом для трансплантації.

Для лікування лейкозів у 1990 р. майже в усіх випадках здійснювали трансплантацію кісткового мозку; у 200 р. частка кістково-мозкових трансплантацій склала 19 %, а у 81 % випадків були використані гемопоетичні клітини, мобілізовані із периферійної крові.

В останні роки при аутологічних трансплантаціях СКК застосовуються у 96 % хворих, а при алогенних трансплантаціях – у 53 %.

Із СК in vitro можна отримати клітини жирової, кісткової і хрящової тканини, клітини ендотелію, гепатоцити, нейрони тощо.

4. Джерела стовбурових клітин. Кров пуповини як джерело стовбурових клітин. Банки стовбурових клітин пуповини.
5. Стовбурові клітини крові (СКК). Лікування лейкемії СКК.
6. Класичне застосування СКК в гематології.

Гомопоетичні СКК можна отримати із кісткового мозку, периферійної і пуповинної (плацентарної) крові. Але останнє джерело пов'язане з нерозв'язною етичною проблемою: чи варто заради можливості врятувати хворих, які страждають на онкопатології, хворобу Альцгеймера, Паркінсона, діабет та інші невиліковні на даний момент хвороби, руйнувати чуже життя, яке вже зародилося? (мається на увазі отримання СК з абортівного матеріалу). Ще більші етичні побоювання викликали плани з клонування людських зародків з метою одержання ЕСК.

Японським вченим під керівництвом С. Яманакі (Кіотський ун-т) та американським вченим з Вінконсину вдалося репрограмувати клітини шкіри до стану так званих індукованих поліпотентних СК, тобто повернути їх на фазу розвитку, з якої вони можуть утворити будь-яку з тканин людського організму. Наприклад, зі шкіри людини, яка страждає на хворобу Альцгеймера, можна одержати *in vitro* нервову тканину, що замінить ушкоджену в процесі захворювання, і при цьому не викличе імунологічного відторгнення.

Найцінніші ЕСК з внутрішньої маси бластоцисти на 5-6 день після штучного запліднення яйцеклітини. Вони, після їх розмноження *in vitro*, здатні до будь-якої диференціації. На відміну від ЕСК, СК, що виділяють з різних джерел після народження чи з дорослого організму, мають менші можливості, бо вже вичерпали частину свого потенціалу. І все ж, ДСК, виділені з дорослого організму, використовують для клітинної терапії.

Згідно з сучасними даними, майже всі тканини містять незначну кількість СК. СК були навіть виділені з волосяних фолікул (з них німецькі вчені вирощують шкіру для аутотрансплантації її), з пульпи зубів (з них німецькі вчені вирощують мишачі зуби *in vitro*, а людські – планують виростити в 2015 р.). Є СК в шкірі, м'язовій і нервовій тканинах, стінках судин, периферійній крові, амніотичній рідині, кістковому мозку, плаценті, жировій тканині.

Найширше застосування знайшла трансплантація гемопоетичних СКК, отриманих з кісткового мозку та пуповидної крові. В світі проведено більше 100 тис. трансплантацій СК з цих джерел для лікування гострих і хронічних лейкозів у дітей та дорослих.

При застосуванні СК для трансплантацій важливою є проблема пошуку відповідного (гістосумісного) донора. Завдання це дуже складне. Так, серед 6 млн. реєстру донорів кісткового мозку, для 1/3 пацієнтів, що

потребують його трансплантації, не можуть знайти потрібний зразок, тобто КМ донора.

Після перших успішних трансплантацій СК в усьому світі стали створювати банки пуповинної крові (БПК). Перевага БПК очевидна: автоматизована система банку миттєво підшукує необхідні і опротестовані СК. Якщо трансплантуються СК родича, скажімо сестри, успіх досягається в 70% випадків, а при трансплантації її кісткового мозку – в 50%.

Перевага і в тому, що можна зберігати СК власної новонародженої дитини, тобто створювати своєрідний „банк запчастин” і для самої дитини, і для членів її сім’ї. Відразу після народження дитини і відокремлення її від пуповини в плацентарну частину пуповини вводять голку, за допомогою якої, кров, що залишилася в пуповині (її приблизно 100 мл), збирають в спеціальний контейнер з консервантом і відправляють в лабораторію БПК, де за спеціальною технологією виділяють СК, додають кріопротектор, охолоджують, і зберігають в пробірках за температури -196°C впродовж багатьох років. СК перевіряють на стерильність і відсутність вірусних інфекцій. Після розмороження за відповідною технологією СК використовують для відновлення кровотворення, особливо у пацієнтів, що зазнали опромінення (променевої терапії), а також для вирощування кардіоміоцитів або нервових клітин. При проведенні ауто трансплантацій вони не відторгуються організмом, їх можна використовувати безпечно і ефективно. Українським вченим Інституту клітинної терапії накопичені незаперечні докази ефективності лікування гемопоетичними СКК. У цьому ж інституті є банк пуповинної крові. В США БПК працюють вже десятиріччя і накопичили тисячі зразків; у цій країні на наукові роботи з тематики, пов’язаної зі СК, виділено 29 млрд. доларів.

7. Клітинна терапія з використанням СК та її перспективи.

Важко уявити повний перелік захворювань, коли СК можуть мати лікувальний вплив. Позитивний ефект спостерігається у разі захворювань крові, атеросклерозу судин серця, інсульту, сепсису та багатьох інших хвороб.

Трансплантація та імплантація СК може здійснюватися внутрішньовенно, внутрішньокостно, внутрішньом’язово та у м’язи серця тощо. Найчастіше СК вводять у вену. Використання СК у разі пошкоджень нервової системи є перспективним напрямком сучасної медицини, наприклад, при хворобі Паркінсона, ДЦП та іншій патології (бічному амніотрофічному склерозі, розсіяному склерозі, травматичних пошкодженнях спинного мозку, інсульті). Використовуються різні суспензії СК, які вводяться як методом трансплантації, так і імплантація, в

зону пошкодження. Позитивні результати застосування СК в лікуванні інфаркту міокарда.

Цукровий діабет I і II типів – найпоширеніше захворювання (в 2025 р. за підрахунками експертів буде 300 млн. діабетиків). Ця хвороба призводить до розвитку серцево-судинних ускладнень, сліпоты, гангрен нижніх кінцівок, ускладнення роботи нирок. Через 6-12 місяців після пересадки СК відбуваються позитивні зміни вуглеводного та ліпідного обміну. Побічного ефекту у 29 хворих не спостерігалось.

СК застосовуються і для лікування онкохворих, особливо після хіміо- і радіотерапії. Гепатити і цирози печінки важко виліковуються. Трансплантація печінки проблематична; більше ½ хворих вмирає не дочекавшись операції. Проведена імплантація СК професором Кучером Н.Д. хворим з цирозом печінки. Відмічено позитивні зміни функціональних показників. Покращилась якість і тривалість життя.

В більшості дослідів з введенням СК проводяться на лабораторних тваринах, пройдуть роки і десятиліття і ці методи збагатять арсенал сучасної медицини.

Аутотрансплантація (=імплантація) – пацієнту вводять його СК; син генна трансплантація – від ідентичного близнюка; аlogenна трансплантація – від родичів.

Трансплантують найчастіше ЕСК та СККМ. СК кісткового мозку легко видобуваються з КМ і є поліпотентними.

СК застосовують для „омолодження” організму. Але це проблемне питання. Проблема: можливість пухлинного росту. СК можуть перетворюватися в онкоклітини!

Трансплантація СК може виявитися поштовхом для неконтрольованого клітинного росту.

СК можуть диференціюватися в 3 основні типи клітин головного мозку – нейрони, олігодендроцити, астроцити, – а також в клітини скелетних м'язів, клітини серцевого м'язу, клітини печінки.

І тому на модельних об'єктах (мишах, собаках, пацюках) їх застосовують для лікування багатьох хвороб, схожих з людськими.

Потенційною перевагою застосування СК з дорослого організму (ДСК) є те, що його власні клітини можуть бути розмножені *in vitro*, а потім імплантовані назад пацієнту. Використання власних СК означає, що вони не будуть відторгнутими. Але відторгнення ЕСК ще не було експериментально доведено на людині.

СК – зручна модель для вивчення диференціації клітини та органогенезу. Суттєвою перевагою на цьому шляху є недостатність інформації про сигнали, які включають та виключають відповідні гени і впливають на диференціацію СК.

Зараз для заміни хворих чи знищених тканин часто застосовують донорські органи і тканини, але потреба в них значно перевищує пропозицію. СК можуть бути джерелом для отримання клітин і тканин, необхідних для лікування багатьох захворювань, включаючи хворобу Паркінсона та Альцгеймера, інсульт, опіки, хвороби серця, артрити тощо.

СККМ при пересадці їх у пошкоджене серце генерують клітини серцевого м'язу та успішно замінюють тканини серця. Великі сподівання покладають на трансплантаційне лікування діабету І.

Для реалізації можливостей клітинної терапії треба зробити ряд важливих кроків:

- домогтися, щоб СК інтенсивно розмножувалися і генерували достатню кількість тканини;
- домогтися, щоб СК диференціювалися в бажаний тип клітин;
- домогтися, щоб СК виживали та інтегрувалися в оточуючі тканини після трансплантації;
- домогтися, щоб введені СК само підтримувалися впродовж життя пацієнта;
- домогтися, щоб жодним чином не зашкодити пацієнту;
- треба вирішити проблеми імунного відторгнення.

Майбутнє застосування СК є багатообіцяючим, але потрібні роки інтенсивних досліджень, щоб вирішити зазначені вище перепони.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біотехнологія рослин : навчальний посібник / Сатарова Т.М. та ін. – Дніпропетровськ : Адверта, 2016. – 345 с.
2. Горбатенко І.Ю. Апоптоз – запрограмована смерть клітини. Curriculum vitae клітини – життєвий шлях клітини : навчальний посібник / І. Ю. Горбатенко, М. І. Гиль, Л. І. Денисюк. – Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2017. – 253 с.
3. Кляченко О. Л. Біоінженерія: підручник / О. Л. Кляченко, М. Д. Мельничук, Ю. В. Коломієць. – Вінниця : ТОВ «Нілан-ЛТД», 2015. – 300 с.
4. Молекулярна генетика та технологія дослідження генома : навчальний посібник / Гиль М.І. та ін. – Херсон : ОЛДІ-ПЛЮС, 2015. – 245 с.
5. Пастушенко В.Ф. Бионика. Биоинженерия. Биоинформатика. Основы теории возбудимых сред / В. Ф. Пастушенко, В. С. Маркин, Ю. А. Чизмаджев. – М.: ВИНТИ, 1977. – 560 с.
6. Introduction to genetic analyses. 9th edition. / Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., & Carroll, S.B. – Palgrave Macmillan, 2007. – 730 p.
7. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, Fifth Edition / Bernard R. Glick, Cheryl L. Patten. – Washington, DC : ASM Press, 2017. 600 p.

БІОІНЖЕНЕРІЯ

Конспект лекцій

Укладач: **Горбатенко** Ігор Юрійович

Підписано до друку 21.11.2019 р. Формат 60×84/16. Папір офсетн.

Гарнітура Times New Roman.

Друк офс. Умовн. друк. арк. 3,5. Облік видавн. арк. 3,5

Умов. фарбовід. 0,9. Зам. № 612, тир. 50.

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

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

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