

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

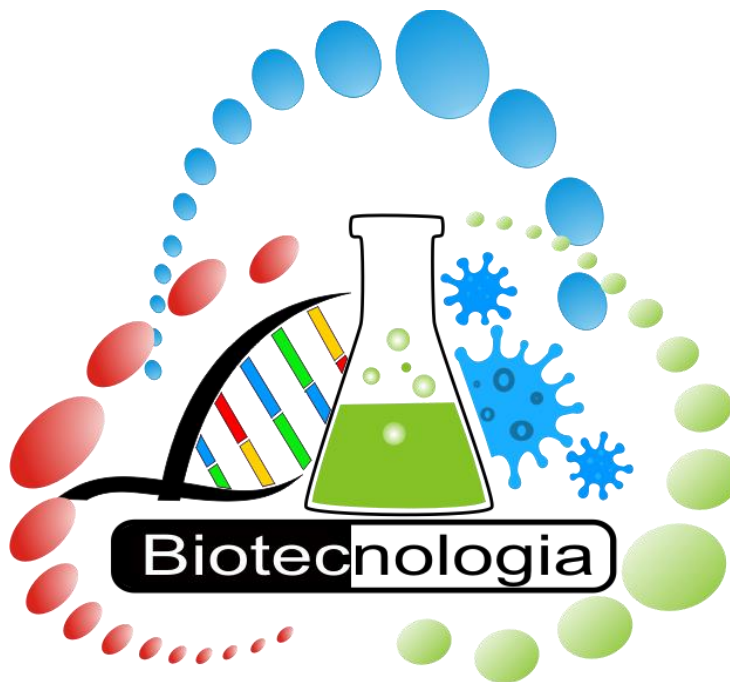
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

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

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

БІОТЕХНОЛОГІЯ

**методичні рекомендації для виконання
лабораторно-практичних робіт
для здобувачів ступеня доктора філософії
зі спеціальності 204 «Технологія виробництва і
переробки продукції тваринництва» (1, 2 курс)**



Миколаїв 2020

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від «24» березня 2020 р., протокол №8.

Укладачі:

- І. Ю. Горбатенко** – доктор. біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету
- О. І. Юлевич** – канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету

Рецензенти:

- С. І. Ковтун** – перший заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин НААН, д-р с.-г. наук, професор, академік НААН
- С. П. Кот** – завідувач кафедри зоогігієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету, канд. біол. наук, доцент

З М І С Т

ВСТУП	5
1. Сучасні уявлення про біотехнологію. Об'єкти біотехнології. Методи створення мікроорганізмів-продуцентів	6
2. Основні види сировини. Отримання біомаси мікроорганізмів як джерела білка. Процес і принципи контролю вирощування мікроорганізмів	12
3. Технологічні схеми отримання амінокислот шляхом мікробіологічного синтезу	19
4. Мікроорганізми – продуценти антибіотиків	23
5. Імобілізовані ферменти. Методи іммобілізації ферментів	27
6. Кінетика процесу періодичного культивування. Типові технологічні прийоми виділення і очищення продуктів біосинтезу. Отримання товарних форм препаратів біологічно активних речовин за типовими схемами	30
7. Сучасні підходи до створення ресурсо- і енергозберігаючих біотехнологій	39
8. Механізм реплікації та репарації ДНК. Експресія генів	42
9. Отримання генів. Виділення генів із ДНК. Застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у генетичній інженерії	45
10. Конструювання рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот. Характеристика та види векторів клонування	51
11. Геномні бібліотеки і бібліотеки кДНК. Способи ідентифікації генів у клонотеках. Методи секвенування ДНК. Будова рестрикційних карт	56
12. Методи створення трансгенних тварин та напрями їх використання	60
13. Способи створення трансгенних рослин. Застосування трансгенних рослин у медицині та промисловості	67
14. Трансгенні організми і біобезпека	73
15. ГМО в Україні. Контроль використання методів біоінженерії	78
16. Гібридомна технологія. Етапи процесу отримання гібридом. Отримання моноатів. Застосування моноатів. Імуноферментний аналіз	83
17. Критерії відбору корів-донорів та реципієнтів ембріонів. Стадії розвитку ембріона. Оцінка якості ембріонів. Техніка і методи трансплантації ембріонів різних видів тварин	87
18. Особливості заморожування-розморожування гамет і ембріонів.	91

Оцінка життєздатності деконсервованих гамет і ембріонів

19.	Етапи процесу отримання ембріонів <i>in vitro</i> . Методи попереднього відбору гамет за статтю. Відбір ембріонів за статтю	94
20.	Ембріональне клонування тварин. Клітини-донори ядер для ембріонального клонування. Особливості соматичного клонування тварин	97
21.	Методи отримання монозиготних близнюків. Оцінка якості половинок і чвертей ембріонів	100
22.	Методи створення партеногенетичних організмів. Методи створення експериментальних химер	102
	Список використаної літератури	106

ВСТУП

Біотехнологія – це наука про методи і технології створення генетично змінених біологічних об'єктів для інтенсифікації виробництва й одержання нових видів продуктів.

У традиційному розумінні біотехнологія – це наука про методи і технології виробництва різних речовин з використанням природних біологічних об'єктів і процесів. Сучасна біотехнологія використовує методи генної і клітинної інженерії.

Згідно з визначенням Європейської біотехнологічної федерації, біотехнологія передбачає «одночасне використання біохімії, мікробіології та хімічної технології для промислового застосування корисних властивостей мікроорганізмів і культур тканин».

Біотехнологія використовує досягнення таких наук, як молекулярна і клітинна біологія, генна інженерія, мікробіологія, біохімія, біоорганічна хімія, фізіологія, генетика і селекція, медицина, ветеринарія, інженерні технології.

Розрізняють такі напрями біотехнології:

«Червона» біотехнологія – виробництво біофармацевтичних препаратів, а також корекція генетичних дефектів.

«Зелена» біотехнологія – розробка і введення генетично модифікованих рослин у культуру.

«Біла» біотехнологія – виробництво біопалива, ферментів і біоматеріалів для різних галузей промисловості.

Академічні та урядові дослідження (наприклад, розшифрування генома деяких організмів).

Практичні досягнення біотехнології використовуються в медицині, екології, сільському, лісовому і рибному господарствах, харчовій, хімічній і гірничодобувній промисловості. У медицині біотехнологічні методи відіграють головну роль під час створення нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів, призначених для ранньої діагностики і лікування захворювань. За участі мікроорганізмів здійснюють очищення води, повітря і ґрунту від хімічних забруднень. У багатьох країнах за допомогою методів генетичної і клітинної інженерії створено високопродуктивні і стійкі до шкідників, хвороб, гербіцидів сорти сільськогосподарських культур. Біотехнологічні процеси з використанням мікроорганізмів і ферментів широко застосовуються у харчовій промисловості. Промислове культивування мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин використовують для одержання багатьох речовин: ферментів, гормонів, амінокислот, білків, вітамінів, антибіотиків, спиртів, органічних кислот.

Новими сферами застосування біотехнології є біоелектроніка і біоелектрохімія, в яких використовується взаємодія біологічних, електричних та електронних систем. Створено аналітичні прилади нового покоління, дія яких базується на використанні електродів з іммобілізованою біологічною системою. Пріоритетним напрямом біотехнології є біоенергетика.

1. Сучасні уявлення про біотехнологію. Об'єкти біотехнології. Методи створення мікроорганізмів-продуцентів

Біотехнологія як наука поступово формувалася з еволюційним розвитком людства. Передумовою для формування науки – «біотехнологія» слід визначити цілий ряд наук: біохімія, молекулярна біологія, генетика, органічна та фізична хімія, мікробіологія, фармакологія, імунологія та ін.

Існує багато визначень біотехнології як галузі. Найбільш поширене таке. *Біотехнологія* – це широкий спектр технологій, які використовують живі клітини і біологічні молекули для вирішення проблем людства у забезпеченні себе важливими засобами для життя (продуктами харчування, ліками та т.і.) Традиційні технології, які відомі людству вже протягом століть і навіть тисячоліть, такі як виробництво хліба, вина, спирту, сиру, народні лікарські засоби та інші підпадають під це визначення. Головною відмінністю сучасних біотехнологій від класичних є використання не емпіричних знань, нагромаджених людством з багатовікового досвіду, а широке застосування наукових даних про фізико-хімічні механізми, які забезпечують життєдіяльність організмів, а також властивостей біологічно активних молекул – нуклеїнових кислот, білків, вуглеводів, ліпідів.

Якщо коротко сформулювати *завдання*, що стоять перед сучасною біотехнологією, то їх можна визначити як створення нових біомолекул, мікроорганізмів, рослин, тварин, ліків, діагностичних препаратів, а також технологій вироблення продукції для потреб людства. Біотехнологія – це використання наукових та інженерних принципів для виробництва матеріалів за допомогою біологічних об'єктів і з метою надання людству сервісу або товарів.

Першочерговими завданнями біотехнології являються:

- створення нових біологічно активних речовин та лікарських препаратів для медицини (інтерферонів, гормонів, моноклональних антитіл та ін.), які дозволяють здійснювати в охороні здоров'я ранню діагностику та лікування важких захворювань – серцево-судинних, злоякісних, спадкових, інфекційних, в тому числі вірусних;
- створення засобів захисту рослин від хвороб та шкідників, бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин; нових високопродуктивних та стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів та гібридів сільськогосподарських рослин, які отримані методами генетичної та клітинної інженерії;
- створення цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів, ветеринарних препаратів та ін.) для підвищення продуктивності тваринництва; нових методів біоінженерії для ефективної профілактики, діагностики терапії основних хвороб сільськогосподарських тварин;
- освоєння технологій отримання господарсько-цінних продуктів для використання у харчовій, хімічній, мікробіологічній, парфумній, фармацевтичній галузях промисловості;

- освоювання глибокої та ефективної переробки сільськогосподарських, промислових та побутових відходів, використання стічних вод і газоповітряних викидів для отримання біогазу та високоякісних добрив.

Продукти біотехнології розповсюджені скрізь і всюди:

- молочні продукти, спирти та їх похідні, пекарські дріжджі, соя, гриби, протеїн одноклітинних організмів, біологічно активні домішки (глутамат натрію, барвники та ін.);
- лікарські засоби: антибіотики, діагностичні речовини, вакцини, стероїди;
- хімікати: хімічні реактиви (ферменти, полімери), сировина для хіміко-біологічного виробництва (етанол, ацетон, бутанол, органічні кислоти);
- сільськогосподарські продукти: корми для тварин, продукти силосування та компостування, мікробні біоциди, бактерії, рослинні клітини та культури тканин;
- обслуговуюча індустрія: очищення води, знешкодження технічних викидів, біологічне очищення ґрунтів, повітря, аналітичні інструменти (біосенсори);
- енергетичні джерела: етанол (газохол), метан (біогаз), біодизель, біоводень.

Кількість **біооб'єктів**, що використовуються в біотехнологічному виробництві дуже багато. Наприклад, в ролі біооб'єкту може виступати людина-донор. З його допомогою виробляють гомологічну імунну плазму (антистафілококову, проти корі, еритроцитарну і лейкоцитарну масу для трансфузій і так далі)

У ролі біооб'єкту може виступати тварина (кінь, олень, корова, свиня, курка, кролик і так далі). З їх допомогою забезпечується промислове виробництво інсуліну, панкреатину, лізоциму, пантокрину, антиоксидантних сироваток, вірусних вакцин і так далі.

В якості біооб'єкту можна використовувати різні рослини. наприклад, бруньки та однорічні пагони тополі представляють сировину при виготовленні простагландинів, смола сосни - це напівпродукт отримання скипидару, смола піхти - це сировина для бальзамів, камфорне дерево – сировина для отримання камфори і так далі.

В якості біооб'єктів широко використовуються і мікрооб'єкти:

- прокаріоти (синьо-зелені водорості, бактерії, віруси, бактеріофаги, актиноміцети) і прокаріоти – бактерії як біооб'єкти використовуються у виробництві, наприклад, вітаміну цианокобаламіна (вітаміну B₁₂).
- еукаріоти (найпростіші, водорості, гриби, цвілі, дріжджі). Наприклад, використання клітин цвілі при виробництві антибіотиків, а клітин дріжджів – при виробництві ергостерину (попередника вітаміну D), бетакаротина (попередника вітаміну A) і так далі.

Узагальнюючи все це, можна сказати, що в цілому до біооб'єктів, що використовуються у біотехнологічному виробництві належать:

1. Макроорганізми рослинного і тваринного походження

2. Гриби, бактерії, віруси, культури клітин еукаріот, біологічні макромолекули з інформаційною (ДНК, РНК), або функціональної активністю (ферменти, біокатализатори).

Що стосується нових технологій біотехнологічного виробництва, то особливе місце в біотехнології займають біооб'єкти рослинного походження, що використовуються для отримання культур клітин таких як калюсних (вирощування клітин на твердій поверхні) і суспензійні культури (вирощувані в рідких середовищах). Слово «калюс» позначає «грубий нарост», «мозоль» як сукупність клітин на пошкодженій тканини рослини.

Для біооб'єктів з мікросвіту характерно досить швидке розмноження (віруси, бактеріофаги). Ділення дріжджів відбувається 1 раз в 90-120 хвилин, а бактерій 1 раз в 20-60 хвилин.

Цілі, які необхідно досягати біотехнології при вдосконаленні продуцента:

1. Збільшення продуктивності для покращення виходу продукту на одиницю біомаси.

2. Надати продуценту здатність використовувати менш дефіцитні і більш дешеві середовища.

3. Продуцент не повинен ретроінгібувати біосинтез кінцевого продукту.

4. Стійкість продуцента до вірусних інфекцій (бактеріофагам).

5. Невимогливість до обладнання, тобто біосинтез не повинен уповільнюватися при несучасній технології обладнання (наприклад, досягнення меншої здатності до піноутворювання культуральної рідини)

6. Оптимізація властивостей продуцента в аспекті медичної промисловості (продуцент не повинен мати неприємного запаху і т.д.).

Підвищення продуктивності мікроорганізму як продуцента зводиться до селекції та мутагенезу. Селекційна робота з мікроорганізмом складається з пошуку природних форм, які володіють будь-якими корисними для людини властивостями (наприклад, синтез БАВ, висока швидкість росту, здатність засвоювати дешеві середовища і так далі, в подальшому вдосконаленні його, в створенні на його основі промислових штамів.

Сукупність життєздатних мікроорганізмів, вирощених на певному поживному середовищі, називається *культурою мікроорганізмів*, а сам процес вирощування – *культивуванням*. *Чиста культура* мікроорганізмів представляє собою популяцію мікроорганізмів одного виду, що виросла на стерильному поживному середовищі. *Вид* – таксономічна категорія, що об'єднує групу мікроорганізмів спільного походження, близьких за своїми властивостями, відокремлену відбором від інших видів і пристосовану до певної середовищі існування. Культуру, що складається з різних видів мікроорганізмів, називають *змішаною культурою*. У біотехнології застосовують високопродуктивні штами мікроорганізмів.

Штамом називають чисту культуру мікроорганізмів, виділених з певного джерела, тобто з середовища їх проживання, і відрізняються деякими спадковими властивостями від інших представників виду. Штам являє собою генетично однорідну культуру, яку штучно підтримують за допомогою відбору спадково однорідних клітин.

У реальних умовах одночасно співіснують різні види мікроорганізмів. З природного середовища існування мікроорганізми переносяться в спеціальні середовища, умови в яких будуть сприятливі тільки для певного виду мікроорганізмів і несприятливі для супутніх видів. Такі поживні середовища називають *елективними*.

Елективні умови можна створювати, змінюючи склад середовища, значення рН, температуру і т.і. Наприклад, дріжджі виділяють, використовуючи кислі середовища (рН 3,5-5,0) або середовища, збагачені вуглеводами (масова частка цукрів 20-50%). У елективному поживному середовищі відбувається накопичення певного виду мікроорганізмів і пригнічення життєдіяльності супутніх видів. Отримані культури називають *накопичувальними*.

З накопичувальної культури виділяють *чисту культуру* мікроорганізмів, використовуючи методи, що засновані або на біологічних властивостях мікроорганізмів, або на принципі механічного їх поділу. Практично виділення чистої культури зводиться до ізоляції однієї клітини і отримання чистої культури у вигляді потомства цієї батьківської клітини. Генетично однорідне потомство однієї клітини називається *клоном*.

Таким чином, отримання чистої культури мікроорганізмів та її використання включає три етапи: отримання накопичувальної культури, виділення чистої культури і контроль чистоти культури.

Накопичення чистої культури в лабораторії проводять у два етапи – вирощування в пробірках, а потім в колбах на рідких і щільних середовищах. Контролем чистоти виділеної культури служить однорідність клітин під мікроскопом і однотипність колоній на чашці Петрі при подальшому розсіві.

Дріжджі більш зручний об'єкт для дослідження, ніж інші мікроорганізми. Клітини дріжджів досить великі, мають круглу, овальну або подовжену форму, з максимальними розмірами від декількох мікрометрів до 15-25 мкм і більше. Дріжджі не токсичні і не патогенні для людини і з найдавніших часів використовуються в якості біологічного агента для виробництва харчових продуктів.

Термін "дріжджі" не має самостійного таксономічного значення. Дріжджами називають грибні організми, які проводять більшу частину свого життєвого циклу у вигляді окремих клітин. Отже, дріжджі можуть бути визначені як одноклітинні гриби, що розмножуються брунькуванням або поділом. Однак, як представники вищих грибів, вони можуть утворювати міцелій і розмножуватися спорами, в тому числі і статевим способом.

Дріжджі, що відносяться до недосконалих грибів, серед яких виділяються представники роду *Candida*, використовують для виробництва білкової біомаси, так як в дріжджових клітинах міститься багато білка, вуглеводів, амінокислот і вітамінів групи В. Окремі види дріжджів вирощують не тільки на вуглеводному сировині, але і на вуглеводневому.

Методи сучасної селекції – це генетичне конструювання, коли можна змінити генетичну програму мікроорганізму.

Генетичне конструювання в живій клітині *in vivo* включає отримання і виділення мутантів з використанням різних способів обміну спадковою інформацією живих мікробних клітин.

Генетичне конструювання *in vitro* засноване на застосуванні генетичної інженерії, яка маніпулює виділеною з організму ДНК.

Кожен організм має свій генотип і фенотип.

Біотехнолог для вдосконалення біооб'єкту використовує:

- спадкові зміни фенотипу, які передаються спадково;
- спадкові зміни генотипу.

Вдосконалення біооб'єкту – це отримання біооб'єктів-продуцентів з мутаціями в геномі, які відрізняються від вихідного біооб'єкту в бік поліпшення біотехнологічних властивостей, зокрема, в бік збільшення утворення цільового продукту.

Класифікація біооб'єктів і можливості цільового впливу на них:

1. Макрооб'єкти: людина, ссавці, рептилії, риби, комахи, рослини
2. Мікрооб'єкти:
 - 2.1. Еукаріоти – нижчі гриби, водорості (крім нитчастих)
 - 2.2. Прокаріоти – актиноміцети, бактерії, синьо-зелені водорості.
 - 2.3. Мікробіосистеми – ферменти, протопласти.

Людина: можна впливати тільки на окремі гени, але проти використання людини як біооб'єкту в плані мутагенного впливу заперечує етика.

Людину можна піддавати тільки неспадкової імунізації.

Людину можна використовувати:

1. Донор крові – необхідно, щоб людина була здорова, кров не повинна бути заражена, при взятті крові не повинен порушуватися гомеостаз.
2. Донор органів та тканин (після його смерті).

Людину можна використовувати в якості зразка для визначення продуктів, які необхідно отримувати (інтерферон, інсулін, гормони внутрішньої секреції, різноманітні фактори росту).

Питання етики перешкоджає вдосконаленню людини як біооб'єкту.

Ссавці: вдосконалення ссавців як біооб'єктів сумнівно, хоча в принципі, можна домогтися збільшення продукції інсуліну підшлунковою залозою свиней або великої рогатої худоби.

Рептилії: отруту змії краще збирати навесні.

Рослини: селекція і відбір – єдиний шлях їх вдосконалення до теперішнього часу. Щоб збільшити вихід цільового продукту сьогодні використовують культури рослинних клітин – отримують біоженьшень, серцеві глікозиди та ін.

Еукаріоти і прокаріоти: головні успіхи при селекції та відборі отримані у мікроорганізмів, оскільки вони легко розмножуються, мають велику кількість мутантів і легше відбирається біооб'єкт з важливими для біотехнолога властивостями. Методом відбору та мутагенезу було досягнуто підвищення активності у продуцента пеніциліну з 40-х років в 100 000 разів., стрептоміцину в 20 000 разів. Такі ж результати отримані в роботі з продуцентами вітамінів і амінокислот.

Існують традиційні методи вдосконалення:

Природний відбір - селекція.

Варіації обумовлені спонтанними мутаціями (неконтрольовані, раптові або причини яких не встановлені).

Індукований мутагенез – шлях вдосконалення біооб'єктів радикальними методами. До таких методів належать:

- Обробка біооб'єкту хімічними мутагенами, націленими на ДНК або ДНК-тропними агентами. Після цієї обробки число мутантів різко зростає, як «позитивних» так і «негативних». При цьому у частини мутантів різко змінюються ознаки, причому, чим більша доза мутагену, тим більше і летальних, не потрібних мутантів, але одночасно і більше відсоток тих мутантів, що вижили. Необхідно, щоб зберігався баланс між летальними мутаціями і кількістю тих мутантів, що вижили.

1. Хімічні мутагени:

- а) нітрозогуанідін - алкілує основи в реплікативній вилці, викликає мутації по типу трансверсії, транзичії і делеції,
- б) нітрозометілсечовина - викликає трансверсії
- в) акридинові барвники (акридиновий помаранчевий) - вставка іншого гена між основами
- г) деякі протипухлинні антибіотики, які є ДНК-тропними агентами.

2. Фізичні мутагени:

- а) УФ-опромінення, при цьому утворюються димери піридинових основ, йдуть мутації по типу транзичії і трансверсії. змінюється порядок зчитування генів на рівні трансляції.
- б) рентгенівське опромінення
- в) швидкі нейтрони
- г) γ -промені (гама-лучи)
- д) ультразвук.

Мутаційно-ступінчастий відбір – при цьому відборі підвищується частота мутацій. За допомогою цього методу вдалося домогтися збільшення активності продуцента пеніциліну в 100 000 разів за рахунок ампліфікації (множення) генів, що кодують утворення LLD- трипептида.

Питання для самоперевірки

1. Що таке «біооб'єкт»?
2. Які види біооб'єктів розрізняють?
3. Які цілі необхідно досягати біотехнології при вдосконаленні продуцента?
4. Що розуміють під терміном "чиста культура", "клон", "штам"?
5. Які ознаки встановлюють при ідентифікації чистих культур?
6. Які особливості необхідно враховувати при селекції мікроорганізмів?
7. Які мутанти називаються ауксотрофними?
8. В чому полягає гібридизація мікроорганізмів?
9. Які питання можна вирішити за рахунок гібридизації мікроорганізмів?

10. Вкажіть, які вимоги надаються до промислових штамів мікроорганізмів?
11. Вкажіть прийоми, що використовують для консервації продуцентів?
12. Які існують можливості цільового впливу на біоб'єкт залежно від його класифікації?
13. Що таке «індукований мутагенез»?
14. Які види мутагенів існують?

2. Основні види сировини. Отримання біомаси мікроорганізмів як джерела білка. Процес і принципи контролю вирощування мікроорганізмів

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

Поживними середовищами називають суміші речовин, на яких вирощують мікроорганізми в лабораторних і промислових умовах. Склад поживного середовища і його фізико-хімічні характеристики повинні відповідати фізіологічним потребам вирощуваної культури мікроорганізмів.

Характеристика компонентів поживних середовищ

Найбільше біогенне значення для будь-якого живого організму має вуглець. Він входить до складу всіх органічних молекул, що утворюються в клітині і на його частку припадає в середньому 50% клітинної речовини. З цієї причини джерела вуглецю займають основне місце серед компонентів поживних середовищ.

У мікробіологічній промисловості широко використовуються чисті вуглеводи, а також природні і технічні продукти, багаті вуглеводами. До них відносяться глюкоза, сахароза, лактоза, крохмаль, кукурудзяна мука, меляса, зелена патока.

Азотне живлення мікроорганізмів за своїм значенням наближається до вуглецевого, хоча поступається за обсягом. Азот входить до складу клітинних компонентів, які забезпечують життєздатність організмів. Джерелами азотного живлення для продуцентів БАР служать різні азотовмісні речовини неорганічного й органічного походження. Джерелами мінерального азоту найчастіше є солі амонію та азотної кислоти. В якості органічних джерел азоту в промисловості найбільш широко застосовуються кукурудзяний екстракт та соєве борошно.

Технічна глюкоза містить не менше 99,5% редукуючих речовин (в перерахунку на сухий залишок) і фактично являє собою чистий вуглевод.

Сахароза – буряковий чи тростинний цукор. Технічна сахароза, що використовується в промисловості, містить не менше 99,75% сахарози, яка являє собою дисахарид, що складається з глюкози і фруктози.

Крохмаль на 96-97% складається з полісахаридів, крім того, в ньому присутні мінеральні речовини і жирні кислоти. Полісахариди крохмалю представлені двома типами – амілози (10-20%) і амілопектину (80-90%).

Ці речовини сильно розрізняються за своїми фізичними та хімічними властивостями. Так, наприклад, від йоду амілоза забарвлюється у синій колір, а амілопектин – у червоно-фіолетовий. Вони розрізняються також за розчинністю: амілоза легко розчинюється у теплій воді та дає розчини з відносно невисокою в'язкістю, у той час, як амілопектин розчинюється у воді лише при нагріванні та під високим тиском та дає дуже в'язкі розчини.

Амілоза та амілопектин відрізняються за своєю хімічною будовою. У молекулі амілози окремі залишки глюкози зв'язані між собою у вигляді нерозгалуженої нитки. Молекулярна маса амілози коливається від $3 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$. Якщо амілоза представляє собою лінійний полімер, то молекула амілопектину є дуже розгалуженою. Молекулярна маса амілопектину сягає сотень мільйонів.

Крохмаль отримують з картоплі або кукурудзи. Крохмаль різного походження значно розрізняється за розгалуженістю ланцюгів, ступеня полімеризації та деяким іншим властивостям. Під дією амілолітичних ферментів крохмаль розщеплюється до глюкози, яка в подальшому утилізується продуцентом по гліколітичному або пентозофосфатному шляхах.

Кукурудзяне борошно отримують при розмелюванні зерен кукурудзи. У промислових середовищах кукурудзяна мука часто замінює крохмаль, будучи більш дешевою сировиною.

Кукурудзяна мука містить: крохмаль – 67-70%; інші вуглеводи (клітковина, пентозани, розчинні вуглеводи) – 10%; білки – 12%; зола – 0,9%.

Серед зольних елементів в найбільшій кількості присутні іони фосфору, калію, магнію. Склад кукурудзяного борошна може коливатися в значних межах залежно від сорту кукурудзи, умов її вирощування та зберігання.

Кукурудзяний екстракт – це відходи виробництва крохмалю з кукурудзи. За зовнішнім виглядом це густа рідина темно-коричневого кольору у вигляді пластівчастої суспензії або майже однорідна.

Основними елементами золи є фосфор, калій, магній. Кукурудзяний екстракт також містить вітаміни групи В, деякі ростові речовини, біостимулятори.

Соеве борошно отримують при розмелюванні соєвих бобів, а також соєвої макухи і шроту, що утворюються після вилучення соєвої олії. Соеве борошно підрозділяється на незнежирене, полузнежирене і знежирене. Крім того, соєве борошно буває дезодорованим (оброблене паром) і недезодорованим. Обробка паром дозволяє збільшити термін зберігання, і дезодороване борошно може зберігатися протягом року, а не дезодороване – 1,5-3 місяці.

З основних компонентів соєвого борошна особливе значення для процесів ферментації мають азотовмісні речовини. Азот соєвого борошна знаходиться головним чином у складі білків, на частку яких припадає 40,5%. Крім білків в соєвій борошні містяться вуглеводи – до 25%; органічні кислоти – 1,5%; зола – 4,5-6,5%.

У не знежиреному борошні міститься 19,5% жиру. До складу золи входять іони калію, фосфору, магнію, кальцію, а також ряд мікроелементів.

Мінеральні елементи в клітинах мікроорганізмів необхідні для регулювання осмотичного тиску, окисно-відновних умов і величини рН. Одна з основних функцій мінеральних елементів – участь у ферментативному каталізі. В даний час дія четвертої частини всіх ферментів у клітині пов'язано з металами. Мінеральний склад поживного середовища формує розподіл електричних зарядів на поверхні клітини. Зазвичай клітини мікроорганізмів мають негативний заряд. При додаванні в середовище електролітів він знижується і тим сильніше, чим вище валентність протиіона, що додається. Зміна електричного потенціалу клітин може змінити їх фізіологічну діяльність, впливати на селективність клітинної мембрани, викликати флокуляцію або флотацію клітин.

Лузга соняшника – відхід при виробництві масла з насіння соняшнику. Лушпиння містить 1,4% багатого вуглецем пігменту фітомелану, 23,6-28,0% пентозанів, 52-66% клітковини, 24,8-29,6% лігніну, 31,0-42,4% целюлози.

Для вирощування мікроорганізмів використовують пентозо-гексозні гідролізати лузги після видалення з них фурфуролу.

Пшеничні висівки – вторинна сировина при виробництві борошна із зерна пшениці. Відбір висівок здійснюється при складних (сортних) повторювальних помелах. Їх вихід складає 13-27% і визначається технологічними прийомами помелу зерна і просіювання борошна. Висівки містять крохмалю – 20,0-22,8%, клітковини – 22,05%, пентозанів – 22,5%, сахарози – 5,49%, ліпідів – 4,77%, азоту загального – 3,25%, золи – 5,49%. Мінеральний склад в мг/100г сухої речовини: калію – 1197,5; кальцію – 115,0; магнію – 475,8; заліза – 17,8; загального фосфору (нефітінового – 139,9; фітінового – 854,4-85,9%); Са:Mg – 0,242.

Продукти переробки зерна. Крупи являють собою цілі або роздроблені частини зерен злакових, гречки і насіння бобових, з яких повністю або частково вилучені оболонки. *Гречану крупу* виробляють 2-х видів: ядриця і січка (звичайна і швидкокорозварювана). Січка – це роздроблені ядра гречки, отримують її як побічний продукт при виготовленні ядриці.

З *рису* виробляють крупи таких найменувань: рис шліфований, полірований і подрібнений шліфований. Останній отримують як побічний продукт при виробництві шліфованого і полірованого. Він являє собою колені ядра рису розміром менше 2/3 цілого ядра.

Сорт крупи – *пшоно*, виробляють з проса. Залежно від показників якості, передбачених стандартом, пшоно поділяють на три сорти: вищий, перший і другий.

Деревна тирса є відходами лісового господарства. Для вирощування мікроорганізмів використовують гідролізати деревних відходів.

Солод – продукт штучного пророщування зерен злаків, що містить фермент. Солод випускають у вигляді цілих зерен і у вигляді порошку (розмелені зерна), ферментований – з низькою активністю ферментів, і неферментований – з високою активністю. Останній використовується у

виробництві для оцукрювання крохмальвмістної сировини, так як містить в активному стані амілолітичні ферменти. Відповідно до державного стандарту масова частка вологи у солоді не повинна перевищувати 10%.

Вимоги, що надаються до поживних середовищ

Поживні середовища за своїм призначенням поділяються на діагностичні, елективні та виробничі. *Діагностичні* середовища призначені в основному для виявлення, виділення та ідентифікації патогенних мікроорганізмів за морфологічними і фізіологічними ознаками. *Елективні* середовища забезпечують переважний розвиток одного виду або групи споріднених мікроорганізмів і непридатні або менш придатні для інших. *Виробничі* поживні середовища, в свою чергу, підрозділяють на *посівні та основні* ферментаційні. Перші призначені для приготування посівного матеріалу, другі для виробництва продукції.

Середовища повинні містити окремі інгредієнти в певних співвідношеннях, пропорційних потребам в них даної культури мікроорганізмів. Специфічність поживних середовищ визначається набором з'єднань, що поставляють клітинам вуглець і азот. У багатьох випадках сполуки, необхідні для існування одних мікроорганізмів, виявляються абсолютно непридатними для інших, і тому не може бути універсального поживного середовища для всіх мікроорганізмів. Менш різноманітні організми за потребами в мінеральних речовинах, тому мінеральний фон середовищ для багатьох мікроорганізмів буває дуже близьким за складом.

Поживні середовища за складом поділяють на природні, штучні і синтетичні. *Природні, або натуральні* середовища являють собою натуральні продукти тваринного або рослинного походження зі складним і невизначеним складом (солодове сусло, молоко, яйця, овочі і т.п.). Їх використовують для підтримки культур мікроорганізмів та накопичення біомаси. *Синтетичні* середовища готуються з певних хімічно чистих сполук у точно зазначених концентраціях. Ці середовища, на відміну від натуральних, мають певний склад і використовуються для вивчення обміну речовин у мікроорганізмів і складання рецептур поживних середовищ. *Штучні, або напівсинтетичні* середовища готують на основі натуральних продуктів складного складу (дріжджовий екстракт, солодове сусло, гідролізати рослинних матеріалів тощо) з додаванням органічних і неорганічних сполук відомого складу (вуглеводи, фосфати, нітрати та ін.) Такі середовища широко застосовуються в промисловій біотехнології для виробництва великотоннажних продуктів.

Для поживних середовищ крім складу дуже важливі і такі фізико-хімічні фактори, як рН, осмотичний тиск або активність води, окислювально-відновний потенціал, парціальний тиск кисню та ін.. Кислотність середовища є важливим фактором, значення якого для різних мікроорганізмів може істотно відрізнятися (рН від 3,5 до 9,0). Більшість мікроорганізмів розвивається в нейтральному або слабколужному середовищі, тоді як дріжджі зазвичай розвиваються в більш кислому середовищі.

Активність води (0,600-0,998) визначає межі життя мікроорганізмів і враховується при складанні рідких середовищ і визначенні вологості твердих

поживних середовищ. При тривалому культивуванні мікроорганізмів може відбуватися значне концентрування рідких середовищ внаслідок випаровування води, що міститься в них, що виявиться несприятливим для росту мікроорганізмів. Тому в процесі тривалого культивування необхідно регулярно доводити обсяг культуральної рідини до початкового об'єму стерильною водою.

Дефіцит білка в харчуванні населення у середньому у світі становит 56,1 млн т, або 25%, в Україні – 255 тис.т. Виникає дефіцит білка через виробництво і споживання середньо- і низькобілкових джерел його надходження, ліквідується – за рахунок включення до раціону високобілкових. Навіть в економічно розвинених країнах і на тих континентах, де рівень споживання білка досить високий, значна кількість людей недоїдає, має низький рівень його споживання.

Якщо рослини і більшість мікроорганізмів здатні синтезувати всі білкові амінокислоти з вуглекислоти, води, аміаку і мінеральних солей, то людина і тварини не можуть синтезувати деякі амінокислоти (валін, лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан і фенілаланін), які називають незамінними.

Виробництво білка одноклітинних. Особливий інтерес представляє використання мікроорганізмів як джерело білка і вітамінів при виробництві харчових продуктів. Перспектива і економічна доцільність використання мікроорганізмів в технології виробництва харчових продуктів диктуються рядом факторів:

- 1) можливістю використання найрізноманітніших хімічних сполук, у тому числі відходів виробництва, для культивування мікроорганізмів;
- 2) високою інтенсивністю синтезу білків;
- 3) нескладною технологією культивування мікроорганізмів, яке можна здійснювати цілодобово і в усі сезони року;
- 4) відносно високим вмістом білка і вітамінів, а також вуглеводів, ліпідів в продуктах на основі мікробів;
- 5) підвищеним вмістом незамінних амінокислот порівняно з рослинними білками;
- 6) можливістю спрямованого генетичного впливу на хімічний склад мікроорганізмів з метою вдосконалення білкової і вітамінної цінності продукту.

Використання білка мікробного походження для виготовлення харчових продуктів дозволяє економити високоцінні тваринні і рослинні білки, а також підвищувати біологічну цінність готового продукту.

Найбільш перспективний мікробіологічний синтез, що впливає з представлених нижче даних. Якщо для великої рогатої худоби потрібно 5 років для подвоєння білкової маси, для свиней – 4 міс, для курчат – 1 міс, то для бактерій і дріжджів – 1-6 год. Світове виробництво харчових білкових продуктів за рахунок мікробного синтезу становить більше 15 млн. т на рік.

Як джерела кормового білка частіше використовують різні види дріжджів і бактерій, мікроскопічні гриби, одноклітинні водорості, білкові коагуляти трав'янистих рослин.

У 60-і роки виник новий термін – білок одноклітинних (*single cell protein*,

«SCP»), що означає цілі неживі висушені мікробні клітини (водоростей, дріжджів, бактерій, грибів), призначені як білковий продукт для кормових і харчових цілей. Термін дещо умовний, оскільки в мікробних біомасах, окрім білків, суттєву частку займають інші компоненти – цукри, ліпіди, нуклеїнові кислоти. Білок одноклітинних повинен задовольняти спеціальні вимоги. Головними є: поживність, перетравність, економічна ефективність. Поживність мікробного білка за хімічним складом близька до традиційних білкових продуктів.

Мікробна біомаса поживна, якщо її компоненти перетравлюються ферментами травного тракту вищих тварин або людини. Перешкодою цьому можуть бути клітинні стінки окремих продуцентів, які заздалегідь доводиться руйнувати, а також високий рівень нуклеїнових кислот. Останні метаболізуються в організмі тварин і виводяться з організму із сечею, отже, не є для вищих тварин небезпекою. Для людини такий рівень нуклеїнових кислот неприйнятний, оскільки у процесі їх засвоєння можливе порушення обміну речовин і виникнення патологічного стану. Тому для харчових цілей мікробну біомасу заздалегідь обробляють, використовуючи різні методи руйнування і денуклеїзації.

У техніко-економічних показниках мікробіологічного синтезу білка визначальне значення мають питомі витрати і вартість сировини (до 50% в структурі всіх витрат) та енерговитрати (до 15-30%). Тому найважливішим питанням при розробці нових технологій отримання білка одноклітинних є доступність сировинної бази. Доступність сировини – це наявність різних резервних варіантів, що дозволяють оперативно замінювати і використовувати різні джерела сировини без суттєвої зміни якості отримуваного продукту. У сучасних промислових процесах використовують як чисту сировину постійного хімічного складу, так і комплексні сполуки, включаючи відходи різних виробництв. Останнє економічно найвигодніше і має величезне значення для охорони навколишнього середовища.

Мікроорганізми здатні засвоювати різні вуглеводовмісні субстрати, які прийнято підрозділяти на декілька поколінь:

- перше покоління – вуглеводи;
- друге покоління – рідкі вуглеводні;
- третє покоління – оксидати вуглеводнів, газоподібні вуглеводні, вуглекислий газ, включаючи суміші воднем.

Незалежно від виду використаної сировини, типова схема мікробіологічного виробництва білка передбачає п'ять операцій: підготовка сировини, підготовка біологічно діючого першоджерела, стадія ферментації, виділення і очищення цільового продукту, приготування товарних форм продуктів.

Велике значення має якість вихідного посівного матеріалу (інокуляту). Інокулят отримують з музейної культури в декілька стадій із застосуванням принципу масштабування.

Підготовлені інокулят, основний ростовий субстрат і всі необхідні поживні компоненти разом з повітрям додають у ферментер, в якому

відбувається основна стадія біотехнологічного процесу – ферментація.

Стадія ферментації проводиться відповідно до технологічного регламенту, розробленого для конкретного процесу, включаючи субстрат і тип продуцента. Вона зводиться до дозованого надходження у ферментер потоків поживних речовин і повітря (або газової суміші), стабілізації основних параметрів процесу на заданих рівнях і своєчасного відведення з апарату відпрацьованого повітря, продуктів, що утворюються, а також тепла.

Максимальні швидкості синтезу білкових речовин мікробними клітинами реалізуються за оптимальних умов середовища, коли питома швидкість росту близька до максимальної. Тому для отримання білка одноклітинних біотехнологічні процеси реалізують в проточному режимі, що дозволяє стабілізувати практично всі параметри стадії ферментації на рівнях, оптимальних для розмноження клітин з швидкостями росту, близькими до максимальних, тобто в режимі білкової спрямованості біосинтезу. За виробництва біомаси як кормового білкового продукту, як правило, здійснюється режим незахищеної ферментації, тобто без дотримання правил стерильності.

Отримувана на стадії ферментації суспензія з 1,0-2,5% вмістом мікробної біомаси за сухою речовиною (АСР), тобто 10-25 кг/м³, на стадії постферментації піддається згущуванню у декілька етапів до 12-16% АСР і термообробці, під час якої протягом 10-40 хвилин за температури 75-90°C практично всі клітини штаму-продуцента і супутня мікрофлора гинуть. Після стадії термообробки суспензію у вакуумвипарувальних установках згущують до концентрації 20-25% АСР і далі висушують до залишкової вологості кінцевого продукту близько 10%. Дрібнодисперсний порошок висушених клітин гранулюють. Порошок або гранулят фасують по 25-30 кг і затарюють у багатошарові паперові мішки.

Технологія отримання мікробного білка є в даний час найбільш великотоннажною галуззю біотехнології, що виробляє найважливіші кормові препарати і білкові добавки для тваринництва, звірівництва, птахівництва, рибництва, а також білок харчового призначення з використанням різноманітної сировини і субстратів.

Питання для самоперевірки

1. Які компоненти поживного середовища називають «субстратом»?
2. Які вуглеводи використовуються у мікробіологічній промисловості?
3. Які відходи виробництв використовують у мікробіологічній промисловості?
4. Як поділяються поживні середовища за своїм призначенням?
5. Як поділяють поживні середовища за складом?
6. Які існують нетрадиційні джерела білка?
7. Вкажіть сировинні джерела для синтезу мікробного білка.
8. Які види сировини крім рослинних гідролізатів використовуються для одержання кормових дріжджів?

9. Чому доцільне використання мікроорганізмів в технології виробництва харчових продуктів?
10. Які розрізняють вуглеводовмісні субстрати?
11. В чому полягає принципова технологічна схема вирощування кормової біомаси?

3. Технологічні схеми отримання амінокислот шляхом мікробіологічного синтезу

Щорічно у світі виробляється більше 800 000 т амінокислот вартістю понад 5 млрд доларів. У промисловому масштабі амінокислоти одержують шляхом екстракції з білкових гідролізатів або як продукти метаболізму бактерій *Corynebacterium* або *Brevibacterium*.

До складу живих організмів входить більш ніж 150 амінокислот, 20 з яких є структурними компонентами білків.

Загалом 66% амінокислот використовують для виготовлення кормів, 31% – у харчовій промисловості, 3% – у медицині, косметології, хімічних синтезах.

У найбільшій кількості (60% від загального обсягу одержання амінокислот) виробляються такі амінокислоти: глютамінова кислота, метіонін, лізин і гліцин. Щорічно у світі мікробіологічним способом одержують 500 000 т глютамінової кислоти і 180 000 т лізину.

Незамінні амінокислоти (лізин і метіонін) використовують як добавку до рослинних кормів. У тваринних білках міститься 7...9% лізину, а в білках пшениці – 3%. Додавання до кормів 0,3% лізину скорочує витрати на 20%. Підраховано, що 1 т лізину замінює 75 т зерна, 5 т рибної муки або 9 т соєвого шроту, що забезпечує додаткове утворення 10 т м'яса.

Основним продуцентом лізину є *Corynebacterium glutamicum*.

На основі *E.coli* був створений промисловий штам мікроорганізмів, що синтезують треонін. Додавання треоніну до рослинних кормів значно підвищує продуктивність сільськогосподарських тварин.

У харчовій промисловості амінокислоти використовують як ароматичні і смакові агенти. Гліцин має солодкий смак, тому його додають у солодкі напої. Також він володіє бактеріостатичною дією. Цистеїн покращує процеси випікання хліба та його якість. На основі глютамінової кислоти одержують глютамат натрію, що використовується як підсилювач смаку під час виготовлення приправ.

У медицині амінокислоти використовують для лікування деяких захворювань. Аргінін у комплексі з аспарагіною або глютаміною кислотами, К-На-аспарат застосовуються під час лікування захворювань печінки. Фенілаланін і дигідроксифенілаланін ефективні при лікуванні хвороби Паркінсона. Цистеїн захищає SH-групи ферментів від окиснення, має детоксикуючу дію. З поліамінокислот отримують шовний матеріал для хірургії.

На основі амінокислот одержують замінник цукру аспартам (метиловий ефір L-аспартил-L-фенілаланіну). Аспартам – дипептид, що складається з

аспарагінової кислоти і фенілаланіну. Аспартам у 150 разів солодший за глюкозу.

Ще один замінник цукру містить у своєму складі амінокислоти. Англійські біохіміки з плодів африканського куща *Dioscorephyllum cumminsii* Diels виділили білок, що у 100 000 разів солодший за цукор. Уведення гена цього білка у клітини *E.coli* дозволило одержати замінник цукру мікробіологічним шляхом.

Виробництво амінокислот

Треонін, а також лізин і метіонін відносяться до сімейства аспарагінової кислоти. У клітинах бактерій спочатку синтезується аспарагінова кислота, а потім на її основі синтезуються треонін, метіонін і лізин (тому вони і об'єднані в сімейство аспарагінової кислоти).

Синтез кожної з цих амінокислот здійснюється в кілька етапів з утворенням проміжних сполук. Кожен з цих етапів каталізується білком-ферментом, синтез якого контролюється (кодується) відповідним геном, в нуклеотидної послідовності якого записана структура цього білка.

Перша реакція синтезу цих амінокислот – перетворення аспарагінової кислоти в аспартил-фосфат (АФ) під впливом ферменту аспартокінази (АК).

Наступний етап – перетворення аспартил-фосфату (АФ) в напівальдегід аспарагінової кислоти (НААК-проміжна сполука). Цю реакцію каталізує фермент дегідрогеназа напівальдегіда аспарагінової кислоти (ДГГ). Ген, що контролює синтез цього ферменту, локалізується в іншій ділянці хромосоми і називається ASD. Під впливом ферменту гомосериндегідрогенази (ГСДГГ), що кодується геном треонін А-2, синтезується гомосерин (ГС), який є попередником для синтезу треоніну і метіоніну. В свою чергу гомосерин під впливом ферменту гомосеринкінази (ГСК) перетворюється в гомосерин-фосфат (ГСФ) (ген, який кодує цю реакцію, – треонін В). І, нарешті, гомосерин-фосфат під впливом ферменту треонін-синтетази (ТС) перетворюється в треонін. Ген, який кодує утворення (синтез) цього ферменту, – треонін С.

При додаванні в середу пирувату з треоніну утворюється ізолейцин. Всі структурні гени в хромосомі кишкової палички розташовані в певній послідовності в загальній регуляторній області, яка включає промотор і так званий аттенуатор – регуляторний елемент, який сприймає сигнали зворотного зв'язку.

Необхідно підкреслити, що синтез треоніну відбувається одночасно з ростом біомаси і після зупинки її росту синтез треоніну сповільнюється і поступово припиняється.

Регулюється біосинтез треоніну в клітинах кишкової палички таким чином: коли треонін в клітинах бактерій накопичується в кількості більшій, ніж його потрібно для метаболічних процесів і синтезу білка, і з'являється у вільному стані, – він пригнічує активність ферменту аспартокінази.

Фермент аспартокіназа – алостеричний фермент, що має крім активного центру ще один, так званий алостеричний центр, який може взаємодіяти з низькомолекулярними ефекторами. І таким ефектором в даному випадку є треонін. Приєднання до алостеричного центру треоніну змінює конформацію

аспартокінази, в результаті чого активний центр стає недоступним для субстрату, і фермент втрачає активність.

В свою чергу пригнічення активності аспартокінази веде до припинення синтезу аспартил-фосфату і, відповідно, припиняється синтез усіх проміжних сполук шляху біосинтезу треоніну.

Коли одного механізму виявляється недостатньо і треонін продовжує накопичуватися в надлишку, у кишкової палички включається ще один механізм регуляції біосинтезу – репресія. При цьому, якщо треонін накопичується в надлишку, він перетворюється в ізолейцин, який, в свою чергу, також накопичується в надлишку. В той момент, коли треонін і ізолейцин накопичуються в надлишку одночасно, вони опосередковано взаємодіють з атенюатором і пригнічують транскрипцію, викликаючи її термінацію. В цьому випадку синтез усіх білків-ферментів даного синтетичного шляху припиняється (рис. 1).

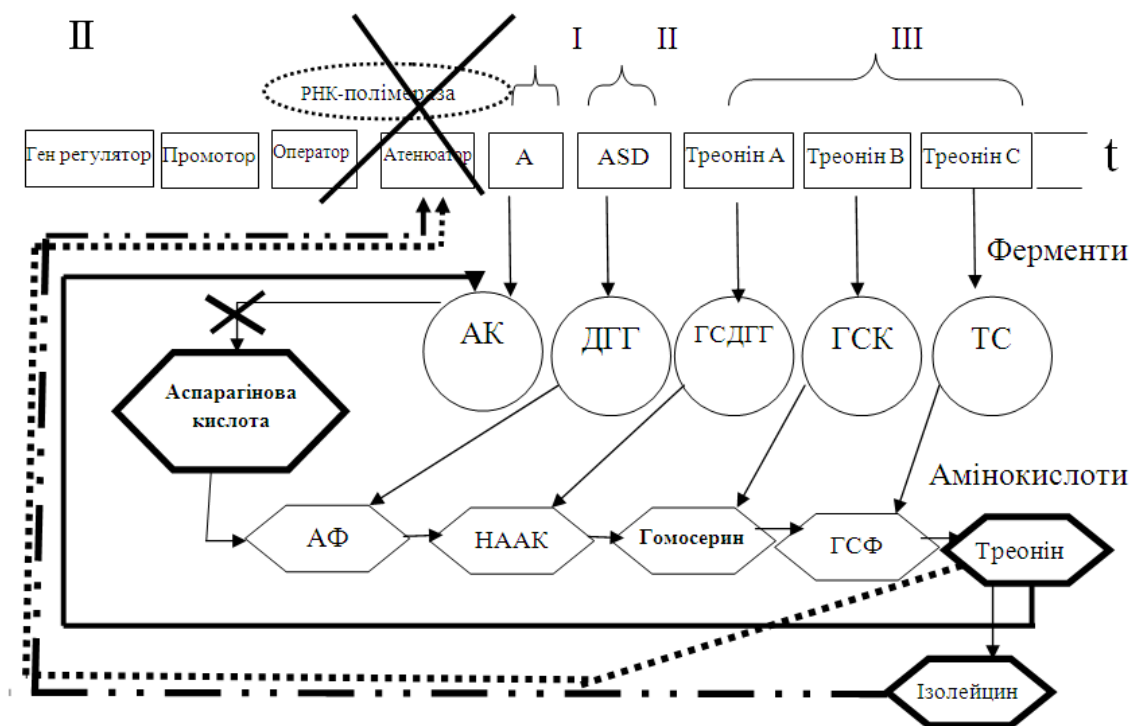


Рис. 1. Схема біосинтезу ізолейцину і треоніну в клітинах мікроорганізмів. Пунктир вказує інгибування за принципом зворотного зв'язку.

У промисловому виробництві лізину в даний час використовується штам-суперпродуцент коринебактерій. Тривалість ферментації 2-3 доби. Рівень накопичення цільового продукту становить 50-100 г/л. Коринебактерії є грампозитивними, більш давніми в еволюційному відношенні мікроорганізмами, відрізняються від грамнегативної кишкової палички також тим, що у них дуже низька активність внутрішньоклітинних протеїназ, тому синтезовані клітиною білки-ферменти довго залишаються в активному стані.

У штамі коринебактерії існує тільки один механізм регуляції біосинтезу за принципом зворотного зв'язку – спільне (узгоджене) ретроінгибування

активності аспартокінази. Це єдиний фермент, активність якого регулюється спільно треоніном і лізином. Коли треонін і лізин одночасно надлишкове накопичуються в клітині, вони разом приєднуються до алостерічного центру; в результаті, активність аспартокінази пригнічується, і цей біосинтетичний шлях блокується.

Отже, синтез лізину контролюється треоніном і лізином, а щоб отримати штам-суперпродуцент лізину, потрібно «вилучити» треонін, так як треонін і лізин, перебуваючи в надлишку, пригнічують активність аспартокінази. Тому потрібно блокувати синтез треоніну. Для цього необхідно отримати мутацію, що блокує цей ген, але в цьому випадку в живильне середовище необхідно додавати чистий треонін (так як більшість продуцентів лізину нездатні синтезувати гомосерин або треонін – вони є «ауксотрофами» по цих амінокислотах).

Якщо блокувати в іншому місці ланцюга біосинтезу, то мутант потребує метіонін і треонін, тоді в середовище додають гомосерин. Якщо додати в середу треонін і метіонін в обмеженій кількості, то штам буде рости доти, поки вони не будуть витрачені, але в клітинах цього штаму будуть присутні також ферменти, необхідні для синтезу лізину, які тривало зберігаються в клітинах коринебактерій в активному стані. І штам почне синтезувати лізин, тобто синтез лізину штамом коринебактерії здійснюватиметься, тільки коли вичерпано треонін. Експериментально підбирають таку кількість треоніну і метіоніну, яка при внесенні в живильне середовище забезпечує максимальний синтез лізину. Як тільки треонін зникає з середовища і зростання біомаси припиняється, починається активний синтез лізину. Таким чином, даний процес має дві стадії розвитку: зростання біомаси і синтез лізину.

Питання для самоперевірки

1. Пояснить значення незамінних амінокислот та їх застосування.
2. Вкажіть методи отримання амінокислот.
3. Коли є сенс застосовувати біологічний метод отримання амінокислот?
4. Які проблеми виникають при хімічному способі отримання амінокислот?
5. Які амінокислоти отримують хіміко-ензиматичним шляхом? З чим пов'язана недоцільність його використання для синтезу інших амінокислот?
6. Які мікроорганізми називають ауксотрофами?
7. Які існують рівні механізму регуляції біосинтезу кінцевого продукту?
8. Чому треонін, лізин і метіонін відносяться до сімейства аспарагінової кислоти?
9. За яких умов біосинтезу з треоніну утворюється ізолейцин?
10. Який механізм регуляції біосинтезу лізину існує у штамі коринебактерії?
11. За яких умов можна отримати штам-суперпродуцент лізину?
12. Як пов'язані синтез треоніну і лізину з ростом біомаси?

13. Які методи генетичної інженерії дозволяють збільшити ефективність використання субстрату при біосинтезі цільової амінокислоти?
14. Чому корисно отримання амінокислот за допомогою іммобілізованих ферментів і клітин?

4. Мікроорганізми – продуценти антибіотиків

Антибіотики – це речовини, що діють проти хвороботворних мікроорганізмів і отримують за допомогою мікроорганізмів-продуцентів. Найчастіше вони синтезуються актиноміцетами, рідше – бактеріями. Серед актиноміцетів найбільший внесок робить рід *Streptomyces* (зокрема, тільки один вид *Streptomyces griseus* синтезує більше 50 антибіотиків).

Найбільш поширеними з комерційної точки зору антибіотиками виявилися пеніциліни, цефалоспорини і тетрациклін.

В основному антибіотики застосовують для боротьби з хворобами людини, тварин і рослин, як стимулятори росту тварин, при консервуванні продуктів, у наукових дослідженнях (у біохімії, молекулярної біології, генетиці, онкології).

Утворення антибіотиків – це спадково закріплена особливість метаболізму мікроорганізмів, що виявляється в тому, що кожен вид (або навіть штам) здатний продукувати один або кілька суворо специфічних для нього антибіотичних речовин, що є результатом еволюції даного мікроорганізму.

Специфічність дії антибіотиків пояснюється:

- їх високою біологічною активністю по відношенню до чутливих до них організмів, тобто здатністю виявляти ефект навіть у дуже низьких концентраціях;

- вибірковістю дії, тобто здатністю певного антибіотика виявляти свою дію лише до певних організмів або груп організмів, не здійснюючі помітного впливу на інші форми живих істот.

Залежно від місця впливу і механізму біологічної дії, антибіотики поділяють на:

- специфічні інгібітори біосинтезу клітинної стінки (пеніциліни, цефалоспорини, цефаміцини);

- препарати, що порушують молекулярну організацію і функції клітинних мембран (валіміцин, полієни);

- препарати, що пригнічують синтез білка на рівні рибосом (тетрациклін, левоміцетин, фузидин);

- інгібітори синтезу РНК на рівні РНК-полімерази та інгібітори, що діють на метаболізм фолієвої кислоти (рифампіцин);

- інгібітори синтезу РНК на рівні ДНК-матриці (актиноміцин, канаміцин);

- інгібітори синтезу ДНК на рівні ДНК-матриці (антрацикліни, мітоміцин С, нітрофурані, налидиксова кислота).

У зв'язку із складністю виділення ефективних антибіотиків і поширенням стійкості у великої кількості патогенних бактерій до сполук, що найбільш застосовуються, існує потреба у нових препаратах. Для цього дослідники перейшли від пошуку нових антибіотиків до модифікації структури

вже існуючих. Вони прагнуть підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист від інактивації ферментами стійких бактерій і поліпшити фармакологічні властивості препаратів. У деяких випадках природні мікробні антибіотичні продукти хімічним або ензиматичними шляхом можуть бути перетворені в так звані напівсинтетичні антибіотики, що володіють більш високими терапевтичними властивостями.

Всі антибіотики, незважаючи на відмінності хімічної структури і механізму дії, об'єднує ряд *унікальних якостей*:

По-перше, унікальність антибіотиків полягає в тому, що, на відміну від більшості інших лікарських засобів, їх мішень-рецептор знаходиться не в тканинах людини, а в клітині мікроорганізму.

По-друге, активність антибіотиків не є постійною, а знижується з часом, що зумовлено формуванням лікарської стійкості (резистентності). Антибіотикорезистентність – неминуче біологічне явище, і запобігти її практично неможливо.

По-третє, антибіотикорезистентні мікроорганізми становлять небезпеку не тільки для пацієнта, у якого вони були виділені, але і для багатьох інших людей, навіть розділених часом і простором. Тому боротьба з антибіотикорезистентністю в наш час набула глобальних масштабів.

Процес промислового виробництва антибіотиків включає наступні стадії:

1) *Підготовка поживного середовища*: в технології отримання антибіотиків застосовують тверді поживні середовища – агаризовані або сипучі субстрати (пшоно, ячмінь, пшеничні висівки і т.п.) і рідкі поживні середовища.

Умови синтезу антибіотиків:

Стерильність. Відсутність сторонньої мікрофлори при культивуванні продуцентів антибіотиків – найважливіший фактор біотехнологічного процесу. Для забезпечення стерильності процесу вся апаратура і комунікації герметизуються, стерилізуються і тримаються під тиском. Живильне середовище і повітря для аерації також стерилізуються. Засівання ферментера, відбір проб на аналіз проводиться в асептичних умовах.

Живильне середовище. Умови синтезу антибіотиків полягають в тому, що в живильному середовищі повинні бути присутніми джерела азоту, вуглецю, фосфору, попередники антибіотиків і вітаміни.

До джерел азоту відносяться: амінокислоти, амонійні солі та нітрати; до джерел вуглецю – глюкоза і лактоза; також у живильному середовищі повинні бути присутніми сірка, магній, марганець, залізо, цинк, кобальт. Крім того, при виробництві антибіотиків до складу живильного середовища повинні входити соєве борошно, кукурудзяний екстракт і макуха олійних культур.

pH. Для бактерій pH живильного середовища становить 7, для грибів – 4,5-5, для актиноміцетів – 6,7-7,5. Для більшості відомих антибіотиків оптимальна величина pH близька до нейтральної. При значному закисленні або залуженні середовища процес біосинтезу гальмується. Для регулювання pH в поживні середовища для отримання антибіотиків часто додають деяку кількість крейди, яка вступає в реакцію з виникаючими в ході процесу метаболізму

кислотами, утворюючи при цьому нейтральні солі і вуглекислий газ, який згодом видаляється з середовища.

Температура. Для біосинтезу антибіотика потрібна певна температура: для біосинтезу пеніциліну грибом роду пеніциліум оптимальною температурою є 25-26°C, у той час як при утворенні антибіотиків актиноміцетами зазвичай підтримують більш високу температуру 27-29°C.

Перемішування і аерація: оскільки продуценти антибіотиків є аеробами, при їх синтезі потрібна добра аерація. В цілому потреба в кисні залежить від концентрації біомаси та її метаболічної активності. Призначення аерації і перемішування – забезпечення культури киснем, але водночас вони сприяють підтримці міцелію в підвішеному стані і вирівнюванню концентрації поживних речовин і продуктів обміну в культуральній рідині.

Спінювання. Поживні середовища, що застосовують при отриманні антибіотиків, містять речовини, здатні утворювати досить стійкі піни. Аерація і перемішування середовища викликають утворення шару піни на поверхні рідини, що погіршує умови розвитку продуцента. У зв'язку з інтенсивним піноутворенням, супроводжуваним процесом синтезу антибіотиків, до складу середовища вводять піногасники (рослинні і тваринні жири, мінеральні масла, ПАР).

2) *Підготовка посівного матеріалу* (продуценти-мутанти → колба на гойдалке → перший інокулятор (10 л) → другий інокулятор (100-500 л) → ферментер).

3) *Ферментація:* для отримання антибіотиків використовують методи поверхневого і глибинного культивування. У промисловому виробництві антибіотиків використовують апарати різної ємності. У ході ферментації культура безперервно аерується стерильним підігрітим повітрям. Температура середовища, рН і ряд ін. параметрів автоматично регулюються відповідно до регламенту виробництва антибіотика. Процес ферментації здійснюється в строго стерильної, глибинної, аеробної, періодичної культурі і носить виражений двофазний характер.

4) *Виділення антибіотиків.* Локалізація антибіотика, сфера його застосування визначають специфіку прийомів постферментаційної стадії. Якщо антибіотик знаходиться в клітинах, на першому етапі обробки біомасу виділяють з культуральної рідини (фільтрацією або центрифугуванням); після руйнування клітин антибіотик екстрагують і переводять в розчинну фазу. Потім даний розчин і культуральні середовища (якщо антибіотик виділяється з клітин у середу) піддають різним методам екстракції, розділення, очищення та концентрування для отримання готового продукту. Мета всіх процедур постферментаційної стадії – отримання стерильних препаратів високого ступеня чистоти.

5) *Очищення антибіотиків.* Дана стадія технологічного процесу включає в себе: осадження, сорбцію, сушку. Крім традиційних екстракційних та сорбційних методів при виділенні і очищенні антибіотиків все більшого значення набуває комплекс прийомів, що об'єднуються назвою *мембранні технології*. При зневодненні препаратів антибіотиків в залежності від

властивостей використовують ліофілну або розпилюючу сушку. Потім препарат фасують у стерильні флакони з дотриманням умов, що гарантують стерильність.

б) *Отримання готового продукту*: оскільки біосинтез антибіотиків ведеться в асептичних умовах, то при виділенні, очищенні та отриманні ЛФ (лікарських форм) також дотримуються максимально можливих заходів проти контамінації. Тим не менше, проблема стерильності ін'єкційних препаратів і обсіменіння препаратів для зовнішнього застосування залишається однією з найскладніших для виробництва як антибіотиків, так і лікарських засобів в цілому, тому при виявленні розфасованих, нестерильних серій препаратів іноді застосовують методи радіаційної та термічної стерилізації, а також стерилізацію мембранної фільтрації.

Готовий продукт піддається біологічному і фармакологічному контролю. Біологічний контроль визначає ступінь стерильності препарату. При фармакологічному контролі проводять всебічні випробування препарату на токсичність, пірогенність (наявність пірогенних речовин - сполук ліпополісахаридної природи. При потраплянні пірогенів у кров'яне русло людини спостерігається швидке підвищення температури тіла до 40°C, прискорення пульсу, лихоманка, підвищене потовиділення, нудота, головний біль. В особливо тяжких випадках можлива смерть.), токсикогенність та ін., оцінюють антимікробний спектр препарату, дію на лейкоцити крові, встановлюють максимально стерпну дозу антибіотика, дози, що викликають повну і 50% загибель експериментальних тварин.

Готова форма лікарського препарату антибіотичної речовини надходить до споживача із зазначенням біологічної активності і дати випуску.

Удосконалення виробництва антибіотиків

Внаслідок поганої розчинності кисню у воді і високої щільності культури *Streptomyces spp.* його часто виявляється недостатньо, ріст клітин сповільнюється і вихід антибіотика знижується.

Одна із стратегій, яку використовують деякі аеробні мікроорганізми для виживання в умовах нестачі кисню, полягає в синтезі гемоглобінподібного продукту, здатного акумулювати кисень і доставляти його в клітини (аеробна бактерія *Vitreoscilla sp.* синтезує гомодімерний гемвмістний білок, функціонально подібний еукаріотичному гемоглобіну). Ген «гемоглобіну» *Vitreoscilla* виділений, вбудований в плазмідний вектор *Streptomyces* і введений в клітини цього мікроорганізму. Після його експресії на частку гемоглобіну *Vitreoscilla* припадає приблизно 0,1% всіх клітинних білків *Strept. coelicolor* навіть у тому випадку, коли експресія здійснювалася під контролем власного промотора гена гемоглобіну *Vitreoscilla*, а не промотора *Streptomyces*. Трансформовані клітини *Streptomyces coelicolor*, що росли при низькому вмісті розчиненого кисню (5% від концентрації, що насичує), синтезували в 10 разів більше *актінородіна* на 1 г сухої клітинної маси, ніж нетрансформовані. Цей підхід можна застосовувати для забезпечення киснем інших мікроорганізмів, що ростуть в умовах нестачі кисню.

Питання для самоперевірки

1. Що таке антибіотики і на які групи їх поділяють?

2. За рахунок порушення яких процесів здійснюється механізми дії антибіотиків?
3. Де у медицині використовують антибіотики?
4. Вкажіть причини пошуку нових антибіотиків.
5. Вкажіть основні напрямки пошуку нових антибіотиків.
6. В чому полягають особливості біосинтезу антибіотиків?
7. Вкажіть основні групи продуцентів антибіотиків.
8. Вкажіть способи отримання антибіотиків.
9. Які існують шляхи підвищення виходу антибіотиків?
10. Вкажіть стадії процесу промислового виробництва антибіотиків.
11. Що включає підготовка поживного середовища в технології отримання антибіотиків?

5. Імобілізовані ферменти. Методи іммобілізації ферментів

Нещодавно вважалося, що використання іммобілізованих ферментів може докорінно змінити ферментну індустрію, особливо проблеми, пов'язані з дорожнечою і складністю виділення ферментів. Імобілізовані ферменти знайшли найрізноманітніше використання в медицині, фармацевтичній, хімічній і харчовій промисловості, в аналітичних цілях, в якості ферментних електродів для визначення концентрації цукрів, амінокислот і інших сполук (рис. 2).

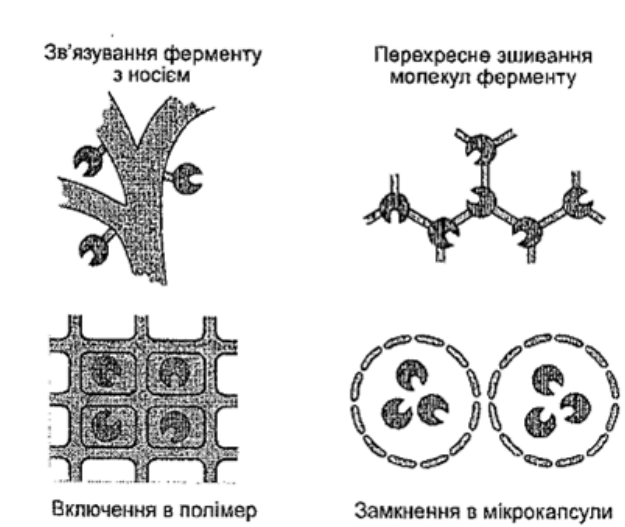


Рис. 2. Способи іммобілізації ферментів

Крім того, можливість використання іммобілізованих ферментів призвела до створення таких нових напрямків, як радіоімунний і ферментативний імуносорбентний аналіз. Однак, незважаючи на це, іммобілізовані ферменти не застосовуються в практичних цілях в таких масштабах, які передбачалися.

Переваги, якими володіють іммобілізовані ферменти в порівнянні зі своїми розчинними аналогами:

- іммобілізовані ферменти легко відділяються від реакційного середовища і можуть бути використані повторно;

- ферменти в іммобілізованому стані проявляють підвищену стабільність до екстремальних умов і зберігають активність протягом більш тривалого часу;
- використання іммобілізованих ферментів дозволяє розробляти безперервні технології;
- методами іммобілізації можливе створення мультиферментних іммобілізованих композицій. Це, у свою чергу, дозволяє здійснювати послідовні ферментні реакції різних процесів.

Іммобілізовані ферменти характеризуються і деякими недоліками. У результаті іммобілізації в ряді випадків спостерігається зменшення питомої активності системи. Відбувається це в силу різних причин. Наприклад, ковалентне зв'язування ферменту з носієм може втягувати у взаємодію який-небудь з амінокислотних залишків, що знаходиться в безпосередній близькості від активного центру. Іммобілізовані ферменти, завдяки фіксації ферментів на носії, не діють на нерухомі або нерозчинні субстрати (целюлоза, ксилан, лігнін та ін.).

Ще одним недоліком іммобілізованих ферментів є вартість іммобілізації, яка може виявитися неприйнятно високою. Таким чином, при використанні іммобілізованих ферментів доводиться вирішувати комплекс питань, пов'язаних з економічною обґрунтованістю їх практичної реалізації.

В даний час у світі розроблені наступні великомасштабні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів і клітин:

1. Отримання глюкозо-фруктозних сиропів.
2. Отримання оптично активних L-амінокислот з їх рацематних сумішей.
3. Синтез L-аспарагінової кислоти з фумарату амонію.
4. Синтез L-аланіну з L-аспарагінової кислоти.
5. Синтез L-яблучної кислоти з фумарової кислоти.
6. Отримання безлактозного молока.
7. Одержання цукрів з молочної сироватки.
8. Отримання 6-амінопеніцилланової кислоти.

Отримання глюкозо-фруктозних сиропів. Фруктоза (фруктовий, плодовий або медовий цукор) – найважливіший у фізіологічному і технологічному відношенні природний моносахарид. Вона в 2,5 рази солодше глюкози і в 1,7 рази солодше тростинного цукру (сахарози), завдяки чому фруктоза – менш калорійний харчовий продукт порівняно з останніми. На відміну від глюкози, обмін фруктози не контролюється інсуліном, тому фруктовий цукор може споживатися хворими на діабет. Фруктоза практично не викликає карієсу зубів. У суміші з глюкозою фруктоза не кристалізується, тому широко використовується для виробництва кондитерських виробів.

Однак, незважаючи на явні переваги використання фруктози, перша промислова установка для перетворення глюкози у фруктозу за допомогою іммобілізованої глюкоїзомерази була запущена лише у 1973 р (компанія «Клінтон Корн», США). Початковою сировиною для цього процесу служить глюкоза, яку отримують при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю у присутності мінеральних кислот. Комерційні препарати іммобілізованої глюкоїзомерази мають вигляд гранул, кульок, волокон або

аморфної маси. Найбільш ефективними біореакторами для отримання фруктози визнані апарати колонного типу висотою близько 5 м, в яких порівняно з реакторами перемішування витрата ферменту мінімальна. Продуктивність такого реактора варіює від 600 до 9000 кг глюкозо-фруктозного сиропу на 1 кг іммобілізованого ферменту в залежності від чистоти вихідної сировини, а час напівінактиваци каталізатора - 20-50 діб. Глюкозо-фруктозну суміш широко застосовують для виробництва тонізуючих напоїв, консервованих фруктів, кондитерських виробів, хліба, морозива та ін. Економічні розрахунки показали, що виробництво глюкозо-фруктозних сиропів з використанням іммобілізованої глюкоізомерази в 1,5 рази вигідніше отримання сахарози з цукрового буряка за традиційною технологією.

Отримання L-амінокислот з їх рацемічних сумішей. Поряд з мікробіологічними способами важливе значення мають хімічні методи промислового отримання природних амінокислот, у тому числі незамінних. Проте в результаті хімічних реакцій, що використовуються для синтезу амінокислот, що містять асиметричні атоми вуглецю, з однаковою швидкістю утворюються як D-, так і L-стереоізомери, тобто завжди виникає рацемічна суміш. Тим часом в живих клітинах обміну піддаються лише L-амінокислоти. Розподілення рацемічних сумішей на їх оптичні ізомери (представляє важку задачу) стало першим промисловим процесом з використанням іммобілізованих ферментів. Цей процес був здійснений в Японії у 1969 р. (компанія «Танабе Сейяку») за допомогою аміноацілази, іммобілізованої на ДЕАЕ-целюлозі (диетиламіноетилова целюлоза – похідна целюлози). В якості вихідних сполук у даному перетворенні використовують суміш D- і L-амінокислот, отриману за допомогою хімічного синтезу. Внаслідок своєї стереоспецифічності аміноацілаза гідролізує лише L-стереоізомер, в результаті чого розчинність L-амінокислоти, що утворюється, різко зростає і її легко можна відокремити від свого антипода фізико-хімічними методами. При нагріванні D-амінокислота, що залишилася, рацемізується, тобто перетворюється у вихідну суміш, яка знову піддається впливу ферменту.

Аміноацілаза строго специфічна до структури тільки ацильної частини субстрату, тому одна й та ж установка з іммобілізованим ферментом використовується для отримання різних амінокислот, у тому числі L-валіну, L-метіоніну, L-фенілаланіну і L-триптофану. Час напівінактиваци іммобілізованого ензиму складає 65 діб; на японських підприємствах він використовується без заміни більше 8 років і забезпечує зниження вартості виробництва амінокислот на 40% у порівнянні з технологією, де застосовуються вільні молекули ферменту.

Отримання L-аспарагінової кислоти. Аспарагінова кислота широко застосовується в якості харчової добавки (підсолоджувач і підкислювач). Перша в світі промислова установка для синтезу L-аспарагінової кислоти з одержуваного хімічним шляхом фумарату амонію була запущена в 1973 р. в Японії (фірма «Танабе Сейяку»); в ній використані іммобілізовані в поліакриламідному гелі клітини кишкової палички *E. coli*, що містять аспартат-аміак-ліази.

Питання для самоперевірки

1. Які види ферментних препаратів використовуються в різних галузях виробництва?
2. Що таке «іммобілізовані» ферменти?
3. Якими перевагами володіють іммобілізовані ферменти?
4. Які існують способи іммобілізації ферментів?
5. Якими недоліками характеризуються іммобілізовані ферменти?
6. Які великомасштабні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів і клітин розроблені?
7. В чому полягає особливість отримання L-амінокислот з їх рацемічних сумішей?

6. Кінетика процесу періодичного культивування. Типові технологічні прийоми виділення і очищення продуктів біосинтезу. Отримання товарних форм препаратів біологічно активних речовин за типовими схемами

Культивування біологічних об'єктів може здійснюватися в періодичному і проточному режимах, напівбезперервному з підживленням субстратом. В ході періодичної ферментації вирощувана культура проходить ряд послідовних стадій (рис. 3):

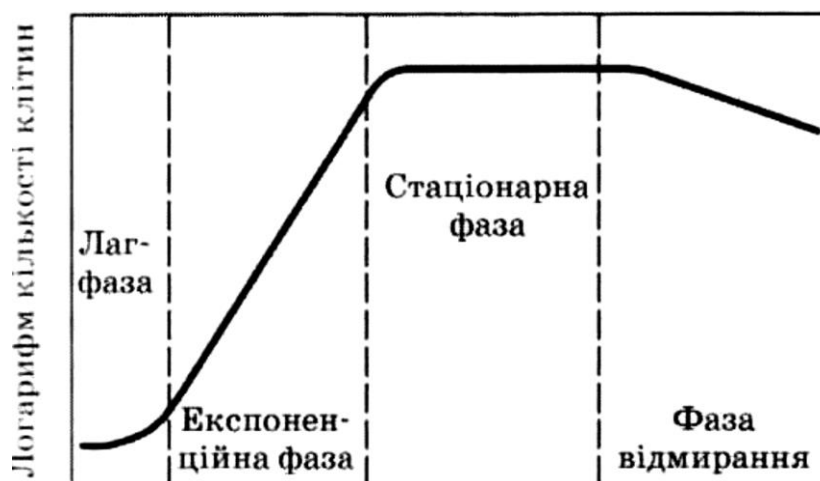


Рис. 3. Крива росту клітинної популяції. (Фази росту: I – лаг-фаза; II – експоненційна; III – сповільненого росту; IV–стаціонарна; V – відмирання; VI – виживання)

- лаг-фазу,
- експоненційну,
- уповільнення зростання,
- стаціонарну
- відмирання.

При цьому відбуваються суттєві зміни фізіологічного стану біооб'єкту, а також ряду параметрів середовища. *Цільові продукти утворюються в експоненційній* (первинні метаболіти – ферменти, амінокислоти, вітаміни) і *стаціонарній* (вторинні метаболіти – антибіотики) фазах, тому в залежності від цілей біотехнологічного процесу в сучасних промислових процесах застосовують принцип диференційованих режимів культивування. В результаті цього створюються умови для максимальної продукції того чи іншого цільового продукту.

Лag-фаза. Починається з моменту посіву клітин у свіже поживне середовище. У цей період клітини адаптуються до даних умов культивування. Тривалість лag-фази залежить від передісторії інокуляту та його віку, а також від того, наскільки придатним для росту є дане середовище і умови культивування (рН, температура, концентрація розчиненого кисню). Наприклад, якщо джерело вуглецю та енергії в новому середовищі відрізняються від тих, які були в середовищі під час одержання посівного матеріалу, то адаптація до нових умов передбачає синтез нових ферментів, які раніше були не потрібні і тому не синтезувались. Утворення нових ферментів індукується новим субстратом.

Експоненційна фаза. Ця фаза характеризується максимальною швидкістю поділу клітин. У цій фазі процеси росту проходять збалансовано (тобто подвоєння біомаси супроводжується подвоєнням кількості білка, ДНК, РНК та ін.). Можна сказати, що культура в експоненційній фазі складається із «стандартних» клітин. Але треба мати на увазі, що і в експоненційній фазі клітини періодичної культури зазнають змін, оскільки постійно змінюється середовище — зменшується концентрація субстрату, збільшується густина клітинної суспензії, накопичуються продукти обміну. У зв'язку з тим що в цій фазі швидкість поділу відносно постійна, вона найзручніша для визначення швидкості поділу та швидкості росту.

Фаза сповільненого росту. Настання цієї фази зумовлене якісними змінами поживного середовища (споживання поживних речовин, накопичення продуктів метаболізму, дефіцит кисню, зміна рН).

Стаціонарна фаза. Вона настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватись, тобто характеризується рівновагою між клітинами, що утворюються, та клітинами, що гинуть. У стаціонарній фазі спостерігається максимальна біомаса і максимальна сумарна кількість клітин.

Фаза відмирання. Характеризується зниженням кількості живих клітин, підвищенням гетерогенності популяції. Іноді клітини лізуються під дією своїх власних ферментів (автоліз).

Фаза виживання. Характеризується наявністю окремих життєздатних клітин в умовах загибелі більшості клітин популяції. Якщо такі клітини пересіяти в свіже поживне середовище, вони починають активно рости та ділитися. Такі виживанні клітини характеризуються низькою інтенсивністю процесів метаболізму.

Основні фактори середовища, що визначають ріст і біосинтетичну активність продуцентів: склад і концентрація поживних речовин, концентрація

продуктів та інгібіторів, температура, осмотичний тиск, вміст розчиненого кисню, діоксиду вуглецю, перемішування середовища, в'язкість середовища та ін.

Відділення цільового продукту

Майже у всіх випадках для отримання цільового продукту необхідно відокремити зважену фазу – масу мікроорганізмів – від культуральної рідини.

Культуральні рідини зазвичай є складними сумішами і містять велику кількість компонентів, багато з яких мають близькі фізико-хімічні властивості.

Поряд з розчиненими мінеральними солями, вуглеводами, білками і іншими органічними речовинами культуральні рідини містять в значній кількості полідисперсні колоїдні часточки і суспензії. Отже, вони є не тільки багатокомпонентними розчинами, а й суспензіями. Дисперсна фаза цих суспензій складається з міцелію або клітин мікроорганізмів, а також з твердих часточок, що містяться в багатьох поживних середовищах: борошні, пластівців із кукурудзяного екстракту і т.і.

Вміст мікроорганізмів в культуральній рідині, як правило, дуже низький. В 1 л міститься зазвичай 5-10 г сухої біомаси. Відділення такої кількості зваженої фази – важка технологічна задача, яку доводиться вирішувати шляхом концентрування різними способами (флотація, сепарування, упарювання).

Способи *відділення клітинної біомаси мікроорганізмів* від культуральної рідини можна розподілити на:

- механічні (відстоювання, фільтрування, центрифугування);
- теплотехнічні (сушка).

Всі методи *виділення продуктів мікробіологічного синтезу* з культуральної рідини ділять на дві групи:

- 1) екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація, якщо цільовий продукт міститься в розчині;
- 2) осаджування, фільтрування, центрифугування, сепарування, якщо цільовий продукт у вигляді твердої фази.

Часто неможливо виділити цільовий продукт за допомогою одного методу, тоді застосовують комбінацію декількох методів і в процесі виділення переводять продукт з розчинної форми в нерозчинну (або навпаки). Як правило, при виділенні розчинених речовин культуральну рідину доводиться піддавати попередній обробці та очищенню за допомогою осаджування, фільтрування, центрифугування, сепарування і мембранних методів (електродіаліз, ультра- і мікрофільтрація).

Осаджування (седиментація) - це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення дисперсної фази в вигляді осаду.

Швидкість осаджування біомаси з культуральної рідини незначна і складає близько 10^{-6} - 10^{-7} м/с.

Для прискорення процесу осаджування застосовують:

- 1) коагулянти – речовини, що переводять зважуванні часточки в агрегатно-нестійкий стан;
- 2) флокулянти – речовини, що сприяють руйнуванню колоїдних структур і утворенню великих пластівців.

В якості коагулянтів застосовують зазвичай желатин, рибний клей, казеїн, як флокулянти – метилцеллюлозу, пектин, альгінат натрію тощо.

Центрифугування – це розподіл неоднорідних систем під впливом поля відцентрових сил.

Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій.

Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном, називають *сепараторами*. В мікробіологічній промисловості сепаратори є одним з самих розповсюджених типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%.

В останні роки з'явилися спеціальні герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі, оптимально підібраному для специфічних умов конкретних культуральних рідин.

Область застосування центрифугування:

1. Виділення біомаси з культуральної рідини (дріжджі, бактерії, гриби).
2. Відділення різних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотики, ферменти, вітаміни та ін.), що попередньо переведені в тверду фазу.
3. Поділ емульсій, що утворюються при екстракції.

Фільтрування – це поділ твердої і рідкої фаз суспензії при пропущенні її через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – отримання твердої або рідкої фази (коли одна з них є відходом), а також одночасне отримання твердої і рідкої фаз.

В якості допоміжних фільтрувальних матеріалів використовуються фільтрувальні порошки, які вносять у рідину, що фільтрується, як наповнювачі або попередньо наносять на робочу поверхню фільтра у вигляді ґрунтового шару.

Екстракція – процес розподілу суміші твердих і рідких речовин за допомогою виборчих (селективних) розчинників (екстрагентів).

Фізична сутність екстракції полягає в переході компонента, що вилучається з однієї фази (рідкої або твердої) в фазу рідкого екстрагента при їх взаємному контакті. Компоненти, що екстрагуються, переходять з вихідного розчину в розчинник внаслідок різниці концентрацій, тому даний процес відноситься до числа дифузійних.

Процес екстракції проводиться зазвичай в двофазних системах: «тверде тіло-рідина» або «рідина-рідина».

Область застосування екстракції: виділення і очистка антибіотиків, вітамінів і амінокислот.

Очищення цільового продукту

Адсорбція – це процес поглинання одного або декількох компонентів цільового продукту з газової суміші або розчину твердою речовиною – *адсорбентом*.

Процеси адсорбції (як і інші процеси масопередачі) вибагливі і зазвичай зворотні. Завдяки цьому стає можливим виділення поглинутих речовин з адсорбенту, тобто проведення процесу *десорбції*.

Перші сорбційні методи виділення і очищення біологічно активних речовин та антибіотиків були засновані на застосуванні *молекулярних сорбентів* (активоване вугілля, окис алюмінію і ін.). Молекулярні сорбенти однаково добре збирають речовину, що виділяється, і ряд домішок.

В даний час розроблені іонообмінні сорбенти (*іоніти*), які характеризуються різною вибірковістю і високою специфічністю.

Іоніти – це органічні і неорганічні речовини, практично не розчинні у воді і звичайних розчинниках, які містять активні (іоногенні) групи з рухомими іонами, здатні обмінювати ці іони на іони електролітів при контакті їх з розчинами.

Найбільш перспективні синтетичні іонообмінні смоли. Іоніти знайшли широке застосування в технології виробництва антибіотиків на етапі їх сорбції з культуральної рідини.

Кристалізація – це виділення твердої фази у вигляді кристалів, головним чином з розчинів і розплавів.

Кристалізація антибіотиків та інших біологічно активних речовин заснована на різкому зменшенні їх розчинності в результаті зміни температури розчину (зазвичай зниження, але іноді, наприклад, у випадку еритроміцину – підвищення) або переведення їх в іншу важко розчинну хімічну форму. Останнє досягається зміною рН розчину або додаванням відповідного реагенту, часто з одночасним зниженням температур.

Кристалізація є не тільки способом отримання антибіотиків в твердому вигляді, але і дуже ефективним засобом очищення від супутніх домішок, що є суттєвою перевагою в порівнянні з деякими іншими методами поділу.

Метод кристалізації знайшов застосування в технології отримання антибіотиків (тетрацикліну, еритроміцину та ін.), вітамінів, полісахаридів.

Модифікація і виділення кінцевих продуктів

Упарювання – це процес концентрування рідких розчинів шляхом часткового видалення розчинника випаровуванням при нагріванні рідини. У ряді випадків упарений розчин піддають подальшій кристалізації.

Концентровані розчини та тверді речовини, одержувані в результаті упарювання, легше і дешевше переробляти, зберігати і транспортувати.

Зазвичай виробництво антибіотиків здійснюють при температурі 60-70°C під вакуумом, тому метод неприпустимий при переробці термолабільних біологічно активних речовин.

До *мембранних методів* поділу відносяться:

1. Діаліз і електродіаліз.
2. Зворотний осмос.
3. Мікрофільтрація.
4. Ультрафільтрація.

В основі цих методів лежить явище осмосу – дифузія розчинених речовин через напівпроникну перегородку, що представляє собою мембрану з великою кількістю (до 10^{10} - 10^{11} на 1 м^2) дрібних отворів – пор, діаметр яких не перевищує 0,5 мкм.

Під мембраною зазвичай прийнято розуміти високопористу або безпористу плоску або трубчасту перегородку, зроблену з полімерних або неорганічних матеріалів і здатну ефективно розділяти частинки різних видів (іони, молекули, макромолекули і колоїдні частинки), що знаходяться в суміші або розчині. Використання мембран дозволяє створювати економічно високоефективні і маловідходні технології.

До основних мембранних методів поділу рідких систем відносяться зворотний осмос, ультра- і мікрофільтрація. ці методи характеризуються такими загальними рисами, як використання напівпроникних мембран, які різним чинбом пропускають компоненти розчинів і суспензій, застосування в якості рушійної сили процесів надлишкового тиску, способи боротьби з концентраційного поляризацією.

Перспективним напрямком використання мікрофільтрації в біотехнології є метод культивування мікроорганізмів, який поєднує мембранні елементи з ферментаційним обладнанням, що привело до створення *мембранних біореакторів (МБР)*.

Під МБР розуміється звичайний апарат, в якому конструктивно об'єднані біореактор для глибинного культивування клітин і мембранний модуль, що забезпечує виведення потоку безклітинної культуральної рідини.

Застосування мембран в біореакторах засноване на принципі зміщення хімічної рівноваги в бік утворення цільового продукту шляхом видалення цього продукту з системи, в якій здійснюється реакція (принцип Ле-Шательє). Для цього регулюючі компоненти приводять в контакт з напівпроникною мембраною, яка переважно проникна для цільових продуктів.

У МБР здійснюється проведення одночасно двох процесів:

- кероване культивування мікроорганізмів в обсязі біореактора;
- видалення культуральної рідини (або її частини) та заміна її свіжим поживним середовищем.

Завдяки цьому стає можливим створення процесу культивування мікроорганізмів, безперервного по рідкій фазі і періодичного по умовно твердій фазі – біомасі, що дозволяє усунути ряд недоліків, властивих періодичним способам культивування.

Необхідність *стабілізації* матеріалів біологічного походження, що пов'язана з їх надзвичайної нестійкістю, виникла на зорі біологічної науки. Відомо, що в звичайних умовах тривалість збереження більшості біологічних продуктів обмежується кількома днями. У зв'язку з цим розроблялися різні способи консервування біологічних препаратів, які час можна розділити на:

- *консервування* при позитивних температурах за допомогою хімічних сполук (хлороформ, фенол, гліцерин, формалін і т.д.);
- консервування при низьких температурах (заморожування);
- консервування висушуванням.

Висушування є одним з найбільш досконалих процесів стабілізації властивостей продуктів біологічного (рослинного, тваринного, мікробіологічного) походження і дозволяє зберігати дані продукти в звичайних

умовах тривалий час. Крім того, істотно зменшена маса дозволяє значно знизити транспортні витрати і витрати на тару.

Необхідно відзначити, що зневоднення – важкий технологічний процес, який часто є вирішальним етапом виробництва, що впливає на якість продукції, що випускається.

Перевагою штучного висушування є значно менші витрати часу на видалення вологи. Процес сушіння – це різноманітний комплекс теплових, дифузійних, часто біологічних і хімічних явищ (особливо коли справа стосується інтенсивної сушки). Препарати біологічного походження зазвичай представляють собою складні об'єкти сушки, які характеризуються рядом показників, найважливішими з яких є початкова, кінцева і рівноважна вологість, термічні, електрофізичні, структурно-механічні та масообмінні характеристики. Різноманітність властивостей продуктів вимагає індивідуального підходу до розробки раціональних методів їх сушки (з урахуванням вимог до якості готового виробу).

В даний час розрізняють *природну сушку* на відкритому повітрі і *штучну*, в спеціальних пристроях з організованим і регульованим підведенням сушильного агента.

Найбільш широке впровадження на практиці отримали наступні методи сушки:

- сублімаційний (ліофільні);
- конвективний;
- контактний;
- терморадіаційний;
- струмами високої частоти;
- комбінований.

Одним з основних методів консервування біопрепаратів, що дозволяє тривалий час зберігати їх активність, є метод *ліофільного сушіння*. Він дозволяє зберегти практично без зміни первинні властивості живих і рідше інактивованих вакцин – діагностичних і лікувальних сироваток, агентів та інших біологічно активних препаратів, що використовують для профілактики, діагностики та лікування.

Ліофільне висушування складається з двох прийомів консервування: заморожування і висушування. Вологу з заморожених препаратів видаляють з використанням глибокого вакууму, минаючи рідку фазу. В процесі сушки волога переміщається в препараті не у вигляді рідини, а у вигляді пари. В результаті вдається максимально зберегти специфічні властивості білків, звести до мінімуму їх денатурацію, забезпечити живим клітинам і вірусам стан тривалого анабіозу, що дозволяє отримати стандартизовані за активністю біопрепарати.

Консервування біопрепаратів методом ліофільного висушування має ряд переваг перед іншими методами:

- знижується маса біопрепарату;
- тривалий час зберігається вихідна активність: вакцин – до 12-18 міс., сироваток – до 2-3 років;

- припиняється ріст мікробних контамінантів.

Висушені препарати можна зберігати при температурі $+4...+8^{\circ}\text{C}$; допускається короткочасне підвищення температури до $+10...+15^{\circ}\text{C}$ (на період транспортування до 7 днів).

Сухий матеріал в ампулах запаюють під вакуумом, у флаконах герметично закупорюють, попередньо заповнивши їх інертним газом (аргоном, неоном, азотом).

Конвективний метод висушування є найпоширенішим в біологічній промисловості, на ньому заснована робота переважної більшості сушильних установок. В якості сушильного агента застосовують нагріте повітря, топковий газ або перегріту пару. Сушильний агент передає тепло матеріалу, під дією якого з матеріалу видаляється волога у вигляді пари, яка надходить у навколишнє середовище. Таким чином, сушильний агент при конвективному сушінні є теплоносієм і поглинає вологу. Сушильні установки камерного типу безперервного і періодичної дії мають ряд *недоліків*:

- велика тривалість сушки;
- нерівномірність висушування матеріалу;
- значні втрати тепла при завантаженні і вивантаженні продукту;
- трудомісткість процесу.

У сушильній техніці також використовуються барабанні сушильні установки, що представляють собою порожнистий циліндр з внутрішньої насадкою для безперервного пересипання і переміщення матеріалу, що висушується, до якого подається теплоносіє.

Контактний метод висушування. Цей метод сушіння ґрунтується на передачі тепла матеріалу при зіткненні з гарячою поверхнею. В якості гарячого теплоносія використовують найчастіше водяну пару, рідше газу і висококиплячі рідини. Потік повітря (вакуум) при цьому способі служить тільки для видалення водяних парів із сушарки.

Широке застосування отримали вальцеві сушильні установки безперервної дії різних конструктивних модифікацій. В корпусі сушильної установки обертається порожнистий барабан, який обігрівается зсередини тепловим агентом. Вихідний рідкий матеріал безперервно подається на барабан, де за один неповний оборот останнього висушується і зрізується ножами.

Сутність *терморадіаційного методу* сушки полягає в тому, що тепло матеріалу передається за рахунок невидимих теплових (інфрачервоних) променів. Інфрачервоні промені (ІФП) – це промені з довжиною хвилі 0,77-340 мкм.

Чим менше довжина хвилі, тим більше проникаюча здатність інфрачервоних променів. Проникність матеріалів залежить в основному від товщини шару і вологості продукту. Для матеріалів, у яких розмір частинок більше глибини проникнення інфрачервоних променів, рекомендується переривчасте опромінення. За характером випромінювачів інфрачервоних променів розрізняють терморадіаційні сушарки з електричним і газовим

обігрівом. Найбільш широко використовуються на практиці терморадіаційні сушарки з газовими панельними випромінювачами.

При сушінні *струмами високої частоти* (частота коливання 10-3000 МГц) органічний матеріал поміщається між обкладинками конденсатора, до яких подається електричний струм високої частоти. Продукти біологічного походження являють собою діелектрики, що мають деяку провідність, тобто мають властивості напівпровідників. При зміні заряду на обкладинках вони переміщуються в протилежних напрямках, в результаті чого неминуче виникає тертя з виділенням тепла. В електричному полі високої частоти нагрів частинок органічного матеріалу здійснюється за частки секунди. Під дією температурного градієнта волога зсередини переміщається до поверхні частинки. *Переваги* сушіння струмами високої частоти порівняно з конвективною і контактної полягає в можливості регулювання і підтримки певної температури всередині матеріалу та інтенсифікації процесу.

Однак великі витрати електроенергії, складне устаткування і обслуговування, підвищені вимоги техніки безпеки обмежують застосування струмів високої частоти для сушки.

В даний час для висушування термолабільних препаратів, крім розглянутих вище методів, застосовуються їх різні комбінації, які дозволяють досягти високої якості одержуваної продукції, підвищення продуктивності та економічності процесу, зменшення витрат праці. Прикладами комбінованих способів сушіння можуть служити розпилювально-сублімаційні висушування, контактно-сорбційне зневоднення та ін.

Питання для самоперевірки

1. Що таке дезінтеграція, в яких випадках її здійснюють?
2. Розкажіть про основні методи дезінтеграції клітин.
3. У чому відмінність сепарування від центрифугування?
4. У яких випадках виконується стадія очищення цільового продукту?
5. Що таке сорбція?
7. Що може міститися в культуральній рідині після закінчення процесу ферментації?
8. Які основні способи концентрації біомаси Ви знаєте?
9. Які застосовуються методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини, якщо цільовий продукт знаходиться в розчині?
10. Які застосовуються методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини, якщо цільовий продукт знаходиться в твердій фазі?
11. Які речовини застосовують для прискорення процесу осадження біомаси?
12. Які технологічні особливості сепарування і до якої вологості вони дозволяють сконцентрувати осад?
13. Від чого залежить швидкість фільтрування?
14. Що таке екстракція культуральної рідини?

15. Які молекулярні сорбенти Вам відомі?
16. В чому перевага кристалізації, і в яких біотехнологічних процесах вона використовується?
17. Що лежить в основі мембранних методів розділення рідких систем?
18. Що об'єднують в собі мембранні біореактори, і в чому їх перевага перед періодичними біореакторами?
19. Які методи консервування біологічних препаратів Вам відомі?
20. З яких етапів складається ліофільне висушування біопрепаратів, і в чому його переваги?
21. За яких температурах і як довго зберігаються біопрепарати, консервування яких здійснювали методом ліофільної сушки?
22. Які гази використовуються при упаковці біопрепаратів в ампули?
23. У чому суть конвективного методу висушування біоматеріалу?
24. Які недоліки сушильних установок камерного типу?
25. У чому суть контактного методу висушування?
26. У чому суть терморадіаційного методу висушування?
27. Переваги і недоліки методу сушки струмами високої частоти.

7. Сучасні підходи до створення ресурсо- і енергозберігаючих біотехнологій

Одним із ключових напрямів якісного технологічного розвитку в цілій низці галузей аграрного виробництва є біотехнологія – сукупність методів одержання біологічної продукції завдяки використанню певних технологічних, мікробіологічних і генно-інженерних методів. Біотехнологія – яскравий приклад інноваційної моделі розвитку в сфері виробництва багатьох видів продукції, на основі глибоких фундаментальних досліджень, що характеризуються високими темпами зростання виробництва. Із розвитком біотехнології пов'язують вирішення глобальних проблем людства – ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я й якості навколишнього середовища.

На думку міжнародних експертів, ефект синергії, який буде досягнуто у результаті застосування біотехнологічних рішень у аграрному секторі, очікується набагато більшим, ніж передбачалося. На жаль, в Україні, як свідчить вітчизняний досвід, рівень розвитку біотехнології порівняно зі світовим залишається невисоким. За оцінками експертів, обсяг виробництва українського сектору біотехнології нині не перевищує 20 млн дол. США.

Сучасні прогнози та моделювання розвитку світового аграрного ринку, в якому Україна займає певні позиції, свідчать про те, що в усіх країнах все більше засобів і ресурсів вкладатимуться в упровадження досягнень високих технологій саме у сільське господарство, що пов'язане з потребою підвищення ефективності використання природних ресурсів, передусім землі та води. У більшості країн зростатиме тенденція до використання сільськогосподарських ресурсів, насамперед для продовольчих цілей, а також як сировини для виробництва біоенергії.

Реалізація аграрного потенціалу (в частині збільшення продукції рослинництва та тваринництва) сировини для випуску біопалива та біоенергії можлива тільки зі збільшенням частки біотехнологічної продукції на внутрішньому ринку України. Модернізація сировинного та переробного виробництва, зниження його енергоємності, збільшення глибини переробки сировини потребують нових підходів і вимог до якості та безпеки сільськогосподарської продукції. Це, у свою чергу, потребує якнайшвидшого впровадження сучасних методів аграрної та ветеринарної біотехнологій у сільськогосподарське виробництво завдяки використанню нових біопрепаратів, біодобрих і біопестицидів, поглиблення переробки відходів сільського господарства (гною, рослинних відходів та ін.) з метою отримання нових продуктів, альтернативних видів палива та енергії.

Нині є сприятливі кон'юнктурні умови для відродження гідролісної промисловості на основі новітніх біотехнологій з метою збільшення асортименту продукції – ферментів, амінокислот, різних гідролізатів та ін. Актуальним є створення біозаводів для глибокої переробки біомаси та виробництва нових БАДів, кормових і харчових продуктів. До пріоритетних напрямів біотехнології належить також розвиток харчової біотехнології з метою підвищення якості та поживної цінності вітчизняних продуктів харчування, збільшення випуску харчових ферментних препаратів, замінників цукру тощо. Переважного значення набула «зелена» біотехнологія, яка поділяється на біотехнологію для рослинництва (біологічний захист рослин, створення сортів рослин біотехнологічними методами, біотехнологія ґрунтів і біодобрих), біотехнологію для тваринництва (технології молекулярної селекції тварин і птиці, трансгенні та клоновані тварини, біопрепарати для тваринництва, біологічні компоненти кормів і преміксів), а також включає переробку сільськогосподарських відходів. Нині у світовій науці відбувається бурхливий розвиток напрямів генної інженерії рослин (ізолювання та клонування нових генів, створення різноманітних генетичних конструкцій, застосування антисмислових конструкцій нуклеїнових кислот) і розвивається новий напрям — метаболічна інженерія біосинтезу рослинних алкалоїдів.

Україна має величезні можливості для використання нових технологій у системах рослинництва, а саме, великі площі сільськогосподарських угідь і сучасний низький рівень продуктивності порівняно з виробничими системами в західних сільськогосподарських економіках. Тому запровадження генномодифікованої технології становить значний потенціал для сфери вітчизняного орного рослинництва і може забезпечити швидкий технологічний та продуктивний поступ, якщо фермерам буде надано доступ до технології.

Збільшення вирощування сільськогосподарських культур, які можуть бути сировиною для біопалива (кукурудзи, ріпаку, сорго, сої та ін.), можливе лише на основі використання сучасних біотехнологій. На фоні нарощування темпів світового виробництва біопалива в Україні воно у промислових масштабах не здійснюється, а це один із пріоритетних напрямів у аграрній біотехнології. Вітчизняне виробництво твердих видів біопалива (з деревини та її відходів), біогазу (водневе та метанове бродіння біомаси) має спорадичний

характер, хоча, без сумніву, є проєкційним напрямом «зеленої» біотехнології завдяки великим об'ємам, дешевизні та доступності біомаси для отримання енергії. Перспективним у цій сфері для розвитку економіки України є технологія виробництва біопалива 2-го покоління, тобто з непродуктивних біомас: деревини, соломи, біовідходів, енергоємних рослин. Так, наприклад, економічно обґрунтований енергетичний потенціал наявних відходів біомаси в Україні становить 24,5 млн т умовного палива (т у. п.), а енергетичний потенціал енергетичних культур, які можна вирощувати на сільськогосподарських землях (приблизно 4 млн га), що не використовуються, – близько 13,7 млн т у. п. Сумарний потенціал – 38,2 млн т у. п., що становить до 18% загального обсягу споживання первинних енергоресурсів в Україні. Потенціал виробництва біогазу – 2,9 млрд м³/рік з відходів тваринництва та 31,7 млрд м³/рік з відходів рослинництва. Комплексний підхід у створенні механізму стимулювання розвитку біотехнологій у аграрному секторі дасть змогу розв'язати такі проблеми: підвищити ефективність всіх галузей сільського господарства (рослинництва, тваринництва, переробки та ін.), отримати нові високопродуктивні культури та види сільськогосподарських тварин, стійких до вірусних, бактеріальних, грибкових захворювань і шкідників; підвищити їх продуктивні та якісні характеристики. «Зелені» біотехнології дадуть змогу зменшити використання пестицидів і гербіцидів, зберегти екологічну безпеку країни. Особливу роль «зелені» біотехнології можуть зіграти у розвитку промислового виробництва деревини завдяки генетичним модифікаціям саджанців дерев, стійких до захворювань, із високою швидкістю росту, збільшеним утриманням целюлози у деревині. Все це у комплексі забезпечить збільшення площ лісових масивів і поліпшення екологічного стану, запобігання ерозії ґрунту та ін.

Стратегічним напрямом розвитку аграрної біотехнології, яка відповідає питанням біобезпеки країни, є розвиток ветеринарної науки у напрямі біовиробництва вакцин і засобів діагностики, біофармації з акцентом на тваринництво та птахівництво. Рання діагностика захворювань інфекційної та неінфекційної природи за допомогою біочипів, а також виявлення спадкової стійкості тварин до технологічних стресів і захворювань є найактуальнішими напрямками розвитку ветеринарної біомедицини. Застосування сучасних біотехнологічних методів дасть змогу впровадити клітинну терапію, тканинну інженерію та отримувати трансгенних тварин із запланованою продуктивністю та корисними властивостями (якістю молока, м'яса та ін.). Роботи у напрямі клітинних технологій дадуть можливість отримати тварин-донорів для медичних цілей, трансплантації окремих органів і шкіри від тварин-донорів до людини. Розвиватиметься геномна селекція високопродуктивних порід тварин і птиці з використанням сучасних біотехнологічних методів. Усе це надасть можливість збільшити виробництво продукції тваринництва та зменшити імпорт країни за основними видами продуктів харчування.

Питання для самоперевірки

1. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в промисловості.
2. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в медицині.
3. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в тваринництві.
4. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в рослинництві.
5. Вкажіть найбільш перспективні напрями використання біотехнології в екології.
6. Вкажіть напрями створення трансгенних рослин.
7. В чому полягає різниця в створенні генно-модифікованих рослин «трьох хвиль»?
8. Вкажіть напрями створення трансгенних тварин.
9. Які досягнення клітинної інженерії застосовують у тваринництві?

8. Механізм реплікації та репарації ДНК. Експресія генів

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

Кожна амінокислота кодується в ДНК групою нуклеотидів, яка має назву триплет. Вважаючи, що у білку 20 амінокислот, а у молекулі ДНК всього чотири типи нуклеотидів, кодон повинен складатися як найменш з трьох нуклеотидів. В цьому випадку можливо 64 (4^3) тринуклеотидних комбінації, а цього достатньо для кодування усіх амінокислот білка. Три кодони – UGA, UAG, UAA – це стоп-кодони, а один – AUG – старт-кодон, який кодує ще і амінокислоту метіонін. Якщо кодон AUG знаходиться не на початку молекули іРНК (матричної, або інформаційної РНК), а всередині неї, то під час елонгації він зчитується рибосомою за участю тРНК (транспортної РНК) та комплексу ферментів у вигляді метіоніну.

Носій генетичної інформації повинен задовольняти дві основні вимоги: відтворюватися (*реплікуватися*) з високою точністю і *детермінувати* (кодувати) синтез білкових молекул. Модель ДНК Уотсона-Крика повністю відповідає цим вимогам. По-перше, згідно з принципом комплементарності, кожен ланцюг ДНК може слугувати матрицею для утворення нового комплементарного ланцюга. Отже, після одного раунду реплікації утворюються дві дочірні молекули, кожна з яких має таку ж нуклеотидну послідовність, як початкова молекула ДНК. По-друге, нуклеотидна послідовність структурного гена однозначно задає амінокислотну послідовність білка, яку вона кодує.

Механізм реплікації був запропонований Дж. Уотсоном і Ф. Криком – авторами теорії подвійного ланцюга ДНК. Він передбачає розплітання двох

ланцюгів ДНК таким чином, щоб кожен з них міг слугувати матрицею для збірки іншого ланцюга відповідно принципу комплементарності. На матричному, або батьківському ланцюзі поодинокі нуклеотиди вишиковуються певним чином, а їх наступна полімеризація призводить до утворення нового, або дочірнього ланцюга (*репліки*), комплементарного першому.

Запропонований механізм реплікації був названий напівконсервативним, оскільки кожна з ідентичних одна до одної дочірніх молекул складається з одного старого і одного нового ланцюга ДНК.

Механізм реплікації повинен забезпечувати безпомилкове копіювання матриці. Включення в новий ланцюг ДНК некомплементарних нуклеотидів викликає виникнення мутацій, які можуть спричинити генетичні зміни, що порушують структуру і функції генетичного матеріалу. Наслідки таких мутацій відображаються негативно, а інколи й згубно на житті клітини і всього організму.

Для запобігання помилкового парування ДНК-полімерази володіють здатністю до самокорекції. Коригувальний механізм полягає в тому, що перед приєднанням кожного наступного нуклеотида до ростучого ланцюга, ДНК фермент «перевіряє» правильність парування попереднього нуклеотида. Якщо нуклеотиди спаровані вірно (відповідно до принципу комплементарності), полімераза приєднує наступний нуклеотид, який згодом також буде перевірений. У випадку помилки парування, «невірний» нуклеотид відщеплюється від ланцюга ДНК. Потім перевіряється попередній перед вирізаним нуклеотид і так далі. Вирізання нуклеотидів здійснюється завдяки тому, що ДНК-полімераза володіє крім полімеразної ще й 3'→5'-екзонуклеазною активністю. Коли полімераза відщепить неспарений нуклеотид або декілька нуклеотидів і дійде до нормально спарених нуклеотидів, відновлюється її полімеразна активність, і синтез ДНК продовжується до виявлення чергової дефектної пари.

Наявність у фермента коригувальної здатності передбачає, що для ініціації реплікації на матриці йому необхідна хоча б коротка ділянка дволанцюгової ДНК, з якої починається синтез комплементарного ланцюга. Така ділянка називається *праймером*, або запалом.

Для синтезу лідируючого ланцюга, який триває безперервно, праймер необхідний лише на початку полімеразної реакції. Полімераза, що здійснює синтез відстаючого ланцюга, потребує праймер перед синтезом кожного фрагмента. Існує спеціальний фермент, що синтезує праймери. Він називається РНК-праймаза і створює короткі РНК-праймери довжиною біля 10 нуклеотидів. Після синтезу фрагментів Оказаци праймер треба видаляти.

Для видалення праймерів і забудови створених проломів починає діяти особлива система *репарації* (відновлення) ДНК. Основна роль в цьому належить ДНК-полімеразі I *E.coli* і аналогічним ферментам інших організмів. ДНК-полімеразу I можна розглядати як два ферменти на одному поліпептидному ланцюзі. Перший називається *фрагментом Кленова* і володіє полімеразною і коригувальною (3'→5'-екзонуклеазною) активністю. Інший фермент здатний відщеплювати нуклеотиди в напрямку 5'→3', тобто в

напрямку синтезу ДНК. Ця 5'→3'-екзонуклеазна активність і надає можливість видаляти праймер.

У генах закодована інформація про білки, що синтезуються в клітині. Однак сама ДНК не використовується в якості безпосередньої матриці для синтезу білка. Реалізація генетичної інформації становить двостадійний процес. На першій стадії ген слугує матрицею для синтезу молекул РНК, на які досконало *транскрибується* (перепишується) послідовність нуклеотидів відповідного гена і, отже, інформація про послідовність амінокислот, що закодована в ньому. На другій стадії нуклеотидна послідовність РНК *трансляється* (перекладається) у поліпептидний ланцюг.

РНК – це лінійна полінуклеотидна молекула, що відрізняється від ДНК у двох позиціях. По-перше, моносахаридом у РНК є рибоза, що містить не одну, а дві гідроксильні групи; вони пов'язані з 2'- і 3'-атомами вуглецю. По-друге, однією із чотирьох основ у РНК є урацил (U), що займає місце тиміну. Більшість молекул РНК одноланцюгові, хоча часто в них є взаємнокомплементарні ділянки, що утворюють дволанцюгові структури – «шпильки». Спарювання основ відбувається таким чином, як і в ДНК, за винятком того, що замість пари А-Т утворюється А-U.

Матрицею при синтезі РНК служить певна ділянка одного з ланцюгів ДНК. РНК-полімераза копіює цю ділянку, послідовно з'єднуючи рибонуклеотиди один з одним за допомогою 3'→5'-фосфодіефірних зв'язків відповідно до правила комплементарності. Транскрипція починається після приєднання РНК-полімерази до специфічної нуклеотидної послідовності – *промотора*. Завершується транскрипція коли РНК-полімераза досягає послідовності стоп-сигналу, або сигналу *термінації* транскрипції. Ділянка ДНК, що обмежена промотором і стоп-сигналом, становить одиницю транскрипції – *транскриптон*. Розбивка ДНК на множину транскриптонів забезпечує можливість незалежного зчитування різних генів, їх індивідуального включення і вимикання.

У ході транскрипції новосинтезована молекула РНК від'єднується від ДНК і подвійна спіраль ДНК відновлюється. Щоб забезпечити транскрипцію тільки окремих сегментів ДНК, повинні існувати якісь сигнальні послідовності, що вказують, де починається (*ініціюється*) транскрипція й де вона зупиняється (*термінується*). Сигнал ініціації звичайно розташовується перед послідовністю, що кодує, а сигнал термінації – слідом за нею. Ділянка ДНК, що передує гену, який транскрибується, називається 5'-фланкуючою послідовністю, а розташована за ним - 3'-фланкуючою.

Питання для самоперевірки

1. В чому різниця між ДНК і РНК?
2. На підставі чого визначена загальна кількість кодонів?
3. Що таке правило виродження, яке значення воно має для експресії генів?
4. В чому різниця будови генів прокаріот і еукаріот?

5. Яку функцію в процесі експресії генів виконує ділянка термінусу?
6. В чому полягає основна догма молекулярної біології?
7. Чому модель ДНК Уотсона–Крика відповідає вимогам, що надаються до носія генетичної інформації?
8. Які ферменти беруть участь у синтезі молекули ДНК?
9. Чому механізм реплікації має назву напівконсервативний?
10. Яка ділянка необхідна для початку синтезу дочірнього комплементарного ланцюга ДНК?
11. В чому полягає особливість функціонування фермента ДНК-полімерази I?

9. Отримання генів. Виділення генів із ДНК. Застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у генетичній інженерії

Розрізняють декілька методів отримання генів:

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

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

Виділення генів з ДНК – рестрикційний метод. Отримання генів за допомогою специфічних ендонуклеаз – рестриктаз. Ці ферменти відкриті в 1953 р. у бактерій. За допомогою рестриктаз розщеплюють ДНК бактерій іншого штаму або клітини-господаря. До теперішнього часу з різних мікроорганізмів виділено понад тисячі різних рестриктаз; в генетичній інженерії використовується близько 200.

Рестриктази гідролізують ДНК строго по певних специфічних послідовностях, так званих *сайтах рестрикції*. Кожна з рестриктаз розпізнає свій сайт рестрикції і розрізає ДНК або всередині сайту, або в безпосередній близькості від нього. Позначення рестриктаз складається з початкових літер латинської назви виду бактерії, з якої виділено фермент, і додаткового позначення, оскільки з бактерій одного виду може бути виділено декілька різних рестриктаз: *Escherichia coli* – *Eco RI*, *Eco RV*; *Thermus aquaticus* – *TaqI*.

З декількох типів рестриктаз у генній інженерії часто використовуються рестриктази двох типів, які розпізнають певну послідовність ДНК і гідролізують її всередині послідовності сайту рестрикції. Однак рестриктази не «вирізують» повністю ген і його потрібно або добудовувати хімічним шляхом, або відщеплювати зайві нуклеотидні послідовності. Тому цей метод виділення генів з ДНК має *недоліки*:

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

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

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

Ферментативний синтез.

У подальших дослідженнях із синтезу генів почали застосовувати менш трудомісткий і швидший метод – синтез за участю ферменту зворотної транскриптази (ревертази). Цей фермент наявний у деяких РНК-вірусів, у яких генетична інформація зберігається не в ДНК, а в РНК. При вивченні цього ферменту було з'ясовано, що матрицею для утворення ДНК може служити навіть синтетична мРНК. Це відкривало нові шляхи для синтезу різноманітних генів за допомогою матричної РНК. Якщо *in vitro* у спеціальну інкубаційну суміш додати певну мРНК (наприклад, мРНК проінсуліну), то синтезується ген, комплементарний саме цій мРНК, у якому закодована структура відповідного

білка (проінсуліну). На мРНК ревертаза синтезує комплементарну їй ДНК-копію (кДНК). Тому роботу починають із виділення та очищення потрібної мРНК із суміші багатьох різних мРНК. Для цього використовуються спеціалізовані клітини, які продукують переважно певний різновид білка. Наприклад, із ретикулоцитів – незрілих кров'яних клітин, у яких міститься багато гемоглобіну (90% від усіх білків), виділяють мРНК для одержання α - і β -поліпептидних ланцюгів гемоглобіну, з клітин інсуліноми – пухлини β -клітин підшлункової залози, виділяють мРНК проінсуліну, із лейкоцитів – мРНК інтерферону і т.ін. Клітини руйнують, збирають центрифугуванням рибосоми (полісоми), оброблюють їх антитілами проти того білка, ген якого прагнуть здобути. Білок, який нас зацікавив, але ще прикріплений до полісом, що синтезують його на матриці мРНК, взаємодіючи зі специфічними антитілами, випадає в осад. Специфічні мРНК, на яких синтезувався білок, можна потім вилучити з осаду за допомогою хроматографічних методів практично в чистому вигляді, тобто без домішок інших мРНК. Тепер одержану специфічну мРНК використовують як матрицю для ферментативного синтезу кДНК за допомогою ревертази. Для початку реакції синтезу ДНК-ревертазою потрібний «запал» у вигляді невеликого дволанцюжкового відрізка. Цю функцію виконують короткі олігонуклеотиди з 18-20 тимінових залишків (полі-Т), які з'єднуються за принципом комплементарності з полі-А-послідовністю мРНК. В результаті утворюється гібридна мРНК-кДНК молекула, причому на кінці у неї буде синтезуватися короткий відрізок дволанцюжкової ДНК – *шпилька*. Шпилька служить запалом для синтезу другого комплементарного ланцюга ДНК, що здійснюється вже ферментом ДНК-полімеразою. В утвореному гібриді мРНК-кДНК усувається ланцюг мРНК за допомогою ферментів РНКаз, і на одноланцюговій кДНК за допомогою ДНК-полімерази І добудовується другий ланцюг кДНК. У результаті утворюється дволанцюгова кДНК, яка потім з'єднується з необхідним вектором.

У лабораторіях різних країн цим способом були синтезовані гени, які кодують білки людини, кроля, миші, гени вірусу віспи, деяких бактеріофагів і т. ін. Однак необхідно враховувати, що при використанні мРНК як матриці для синтезу ДНК утворюється не весь ген з регуляторними ділянками, а тільки його структурна інформаційна частина. Тому ще складнішим завданням є виділення готового гена з генома клітини. Це пов'язано з тим, що на частку кожного гена припадає лише невелика частина всього генома і, крім того, багато генів еукаріот побудовані складно – іноді вони складаються з ряду окремих ділянок, розташованих на різних ділянках генома. Тому всю клітинну ДНК розщеплюють на фрагменти за допомогою обробки рестриктазами, багато з яких дають дволанцюгові розриви тільки в обмежених ділянках ДНК.

Хіміко-ферментативний синтез. Цей метод є альтернативою "вирізанню" генів за допомогою рестриктаз з нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8-16-фрагментів) одноланцюгових фрагментів ДНК (олігонуклеотидів) за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігази з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів. Хіміко-ферментативний

синтез дозволяє точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів. Крім того, існує можливість уведення в гени ділянок розпізнання різних рестриктаз, регуляторних послідовностей. Хімічним шляхом синтезують олігонуклеотиди: лінкер, адаптери, праймери, промотори, а гени синтезують ферментативним методом.

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

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

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

Промотор (80...10 нуклеотидів) – фрагмент ДНК, що розпізнається РНК-полімеразою.

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

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

Для здійснення ПЛР необхідно:

- два синтетичних олігонуклеотидних *праймери* (короткі олігонуклеотиди, що гібридизуються із матрицею і слугують запалом при її копіюванні), довжиною приблизно 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів, що *фланкують* (оточують) послідовність-мішень, яку розмножують;

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

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

- чотири дезоксирибонуклеотиди;

- іони Mg^{2+} , що необхідні для роботи полімерази.

Буферний розчин, що забезпечує відповідні умови реакції – рН, іонну силу розчину. Містить солі, бичачий сироватковий альбумін.

Типова ПЛР-ампліфікація складається з багаторазового повторення наступних реакцій.

1. *Денатурація.* Перший етап ПЛР полягає в тепловій денатурації зразка ДНК витримуванням його при температурі 95°C протягом мінімум 1 хв.

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

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

Застосування ПЛР. ПЛР використовується в багатьох галузях для проведення аналізів і в наукових експериментах. Полімеразна ланцюгова реакція нині є найбільш досконалим діагностичним методом молекулярної біології, молекулярної генетики і клінічної лабораторної діагностики, що дозволяє виявляти в тканинах і біологічних рідинах організму поодинокі клітини збудників багатьох інфекційних захворювань, виявляти і ідентифікувати навіть одонуклеотидні зміни в структурі генів.

Криміналістика. ПЛР використовують для порівняння так званих "генетичних відбитків пальців". Необхідно зразок генетичного матеріалу з місця злочину (події) – кров, слина, сперма, волосся і т. ін. Його порівнюють з генетичним матеріалом підозрюваного. Достатньо зовсім малої кількості ДНК, теоретично – однієї копії. ДНК розщеплюють на фрагменти, потім ампліфікують за допомогою ПЛР. Фрагменти розділяють за допомогою електрофорезу ДНК. Отриману картину того, що має в розпорядженні смуг ДНК і називають генетичним відбитком пальців (англ. genetic fingerprint).

Встановлення батьківства. Хоча "генетичні відбитки пальців" унікальні (за винятком випадку однойцевих (конкордантних) близнюків), родинні зв'язки все ж можна встановити, зробивши декілька таких відбитків. Той же метод можна застосувати, злегка модифікувавши його, для встановлення еволюційної спорідненості серед організмів.

Медична діагностика. ПЛР дає можливість істотно прискорити і полегшити діагностику спадкових і вірусних захворювань. Певний ген ампліфікують за допомогою ПЛР з використанням відповідних праймерів, а потім секвенують для визначення мутацій. Вірусні інфекції можна виявляти відразу після ураження, за тижні або місяці до того, як проявляться симптоми захворювання.

Медицина, що персоналізується. Іноді ліки виявляються токсичними або алергенними для деяких пацієнтів. Причини цього – частково в індивідуальних відмінностях у сприйнятті і метаболізмі ліків та їх похідних. Ці відмінності детермінуються на генетичному рівні. Наприклад, у одного пацієнта певний цитохром (білок печінки, що відповідає за метаболізм сторонніх речовин) може бути активніший, у іншого – менш. Для того, щоб визначити, який різновид цитохрому має цей пацієнт, запропоновано проводити ПЛР-аналіз перед застосуванням ліків. Такий аналіз називають попередніми генотипуванням (англ. prospective genotyping).

Клонування генів. Клонування генів (не плутати з клонуванням організмів) – це процес виділення генів і, в результаті генно-інженерних маніпуляцій, отримання великої кількості продукту цього гена (рис. 59). ПЛР використовується для того, щоб ампліфікувати ген, який потім вставляється у

вектор – фрагмент ДНК, що переносить сторонній ген у той же самий або інший, зручний для вирощування, організм. Як векторів використовують, наприклад, плазміди або вірусну ДНК. Вставку генів у сторонній організм зазвичай використовують для отримання продукту цього гена – РНК або, найчастіше, білка. Таким чином у промислових кількостях отримують багато білків для використання в сільському господарстві, медицині та ін.

Секвенування ДНК. У методі секвенування з використанням мічених флуоресцентною міткою або радіоактивним ізотопом дідезоксінуклеотидів ПЛР є невід'ємною частиною, оскільки саме в ході полімеризації в ланцюг ДНК вбудовуються похідні нуклеотидів, мічені флуоресцентною або радіоактивною міткою. Це зупиняє реакцію, дозволяючи визначити положення специфічних нуклеотидів після розподілу синтезованих ланцюжків у гелі.

Мутагенез. Нині ПЛР стала основним методом проведення мутагенезу (внесення змін до нуклеотидної послідовності ДНК). Використання ПЛР дозволило спростити і прискорити процедуру проведення мутагенезу, а також зробити її надійнішою і відтворюючою.

Таким чином, основною перевагою методу ПЛР є надзвичайно висока чутливість цього молекулярно-біологічного дослідження. Використані в медичній практиці тест-системи, засновані на принципі ампліфікації ДНК, дозволяють сьогодні виявляти патогенні для людини бактерії і віруси навіть в тих випадках, коли іншими способами (імунологічним, бактеріологічним) їх виявлення неможливе (внаслідок різниці в чутливості в 1-2 порядки). Можливості, закладені в методі ПЛР, дозволяють, з одного боку, досягати максимальної специфічності аналізу, тобто здібності виявляти ДНК конкретного інфекційного агента у присутності ДНК інших мікроорганізмів і ДНК організму-хазяїна, а також проводити генотипування. З іншого боку, відповідний вибір олігонуклеотидних праймерів, що в основному визначають специфічність аналізу, дозволяє одночасно виявляти ДНК близькоспоріднених мікроорганізмів.

Іншою перевагою методу є те, що для ПЛР-діагностики практично усіх інфекційних захворювань, а також спадкових захворювань людини, може бути використаний один набір устаткування, універсальні процедури пробопідготовки і постановки аналізу, а також однотипні (що відрізняються в основному структурою праймерів) набори реактивів. Для проведення ПЛР-аналізу не потрібно проведення культуральних і мікробіологічних процедур, що раніше займало велику кількість часу. Уніфікований метод обробки біоматеріалу і детекції продуктів реакції, і автоматизація процесу ампліфікації дають можливість провести повне дослідження протягом 4,0-4,5 годин. Особливо ефективний метод ПЛР для діагностики важко-культивованих, некультивованих і персистуючих форм мікроорганізмів, з якими часто доводиться стикатися при латентних і хронічних інфекціях, оскільки цей метод дозволяє уникнути складнощів, пов'язаних з вирощуванням таких мікроорганізмів у лабораторних умовах. Застосування ПЛР-діагностики також украй ефективно відносно збудників з високою антигенною мінливістю і внутрішньоклітинних паразитів. Слід зазначити, що методом ПЛР можливе

виявлення збудників не лише в клінічному матеріалі, отриманому від хворого, але і в матеріалі, що отримується з об'єктів зовнішнього середовища (вода, ґрунт), і в продуктах харчування.

Висока чутливість і специфічність, безпосереднє виявлення інфекційного агента і можливість проведення генотипування будь-якого гена людини визначають широку сферу застосування методу ПЛР в клінічній діагностиці і медичній практиці.

Питання для самоперевірки

1. Які існують методи отримання генів?
2. В чому полягають недоліки рестрикційного методу отримання генів?
3. На використанні якого ферменту заснований ферментативний метод отримання генів?
4. Для синтезу яких олігонуклеотидів використовується хіміко-ферментативний метод отримання генів?
5. З яких реакцій складається процес здійснення ПЛР?
6. Якою особливістю відрізняється ДНК-полімераза *Taq*?
7. Яку роль грають праймери у здійсненні ПЛР?
8. Які вимоги надаються до праймерів, що використовуються у ПЛР?
9. Які компоненти необхідні для здійснення ПЛР?
10. Вкажіть в яких галузях досліджень застосовується ПЛР?

10. Конструювання рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот. Характеристика та види векторів клонування

Конструювання рекомбінантних ДНК. Рекомбінантними вважають ДНК, які створені *in vitro* при об'єднанні двох або більш фрагментів ДНК, що виділені з різних біологічних джерел. З'єднання фрагментів ДНК у єдину молекулу здійснюється декількома методами в залежності від того, які кінці мають фрагменти ДНК, що зшиваються.

З'єднання фрагментів по однойменним „липкім” кінцям. „Липкі” кінці, що створюються при розщепленні рестриктазами комплементарні один одному і тому між ними відбувається процес спарування за рахунок утворення водневих зв'язків між одноланцюговими ділянками комплементарних нуклеотидів. Однак після цього цілісність подвійної спіралі не відновлюється, оскільки залишаються розриви у фосфодієфірному остові. Для їх відновлення використовують фермент лігазу, яка завершує створення рекомбінантної молекули ДНК.

З'єднання фрагментів з „тупими” кінцями. В цьому випадку реакція лігівування (зшивання) має власні особливості. ДНК-лігаза, що кодується фагом Т4, здатна з'єднувати дволанцюгові фрагменти, але для ефективного перебігу реакції необхідна наявність високої концентрації ДНК і майже в 10 разів більшої концентрації ферменту. Однак, і в цьому випадку ефективність цієї реакції на порядок нижча за ефективність зшивки по „липких” кінцях.

З'єднання фрагментів з різнойменними кінцями. „Липкі” кінці можна ферментативним шляхом з'єднати з молекулою ДНК з „тупими” кінцями. Для цього „затуплюють” „липкі” кінці. Це досягається або відщепленням нуклеотидів „липких” кінців за допомогою ферменту – нуклеази S1, яка руйнує лише одноланцюгову ДНК, або „липкі” кінці добудовують, тобто за допомогою ДНК-полімерази на одноланцюговому „липкому” кінці синтезують другий ланцюг, а потім проводять зшивання фрагментів за допомогою ДНК-лігази.

Коннекторний метод з'єднання фрагментів ДНК. Суть методу полягає у приєднанні до кінців одного з фрагментів ДНК одноланцюгового полінуклеотиду, наприклад, полі А (dA), а до іншого – комплементарного до нього, наприклад, полі Т (dT). Фрагменти, що добудовані таким чином потім змішують і обробляють лігазою.

Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК. В тому випадку коли виникає необхідність клонувати фрагменти ДНК, що отримані при розщепленні одною рестриктазою, у векторі, який має сайт рестрикції для іншої рестриктази, використовують короткі синтетичні дволанцюгові олігонуклеотиди, у складі яких є сайти рестрикції для одної або декількох рестриктаз. Лінкер довжиною 6 – 12 п.н. лігірують по „тупих” кінцях з ДНК-мішенню, потім нову молекулу розрізають за допомогою певної (такої самої, як і у векторі) рестриктази і отримують фрагменти з „липкіми” кінцями, комплементарними до „липких” кінців вектору. З'єднання векторної молекули з ДНК-мішенню здійснюють за допомогою лігази.

Введення у клітину і наступна стабільна підтримка генетичної інформації, що міститься у рекомбінантних молекулах ДНК, досягається за допомогою векторних молекул, або *векторів*. Справа у тому, що при звичайному введенні ДНК, наприклад, у бактеріальну клітину вона, як правило, піддається атаці ферментів, які розкладають її на складові компоненти – нуклеотиди. В деяких випадках ДНК «виживає» у клітині, однак у процесі розподілу клітин вона не успадковується і втрачається. Для того, щоб рекомбінантна ДНК стала складовою частиною генетичного апарату клітини, вона повинна або вбудуватися в її геном (інтегруватися у хромосому) і реплікуватися за його рахунок, або бути здатною до автономної реплікації. *Векторами* називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (перенесення в інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткової генетичної інформації.

У цілому до векторних молекул надають наступні основні вимоги:

- вектор повинен мати унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз (в найкращому випадку по одному для кожної), що надає можливість вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;
- вектор повинен володіти певною ємністю і не виключати вбудований фрагмент;
- вектор повинен бути репліконом, тобто здатним до реплікації, в певних клітинах за рахунок послідовності початку реплікації або власної, або клітини-хазяїна;

- вектор повинен містити послідовність маркерного гену, за допомогою якої можливо здійснити селекцію клітин з векторної конструкцією.

Для конструювання векторів у генній інженерії використовують хромосоми вірусів, віруси тварин, бактеріофаги, мобільні елементи, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин, а також невеликі молекули нуклеїнових кислот, здатних до автономної реплікації в бактеріальних і еукаріотичних клітинах – *плазмід*и.

Найбільш поширеним методом генної інженерії є метод отримання рекомбінантних плазмід, тобто плазмід, що містять чужорідний ген. Плазмідами є кільцеві дволанцюгові молекули ДНК, що складаються з декількох тисяч пар нуклеотидів. Цей процес включає наступні етапи:

1. Рестрикція – розрізання ДНК, наприклад, людини на фрагменти.
2. Лігування – фрагмент з потрібним геном включають у плазмід і зшивають їх.
3. Трансформація – введення рекомбінантних плазмід у бактеріальні клітини. Трансформовані бактерії при цьому набувають певних властивостей. Кожна з трансформованих бактерій розмножується й утворює колонію з багатьох тисяч нащадків – клон
4. Скринінг – відбір серед клонів трансформованих бактерій тих, які містять плазмід, що несуть потрібний ген людини.

Весь цей процес називається клонуванням.

За допомогою плазмідних векторів можна клонувати фрагменти ДНК довжиною до 10 т.п.н. Кожна така колонія являє собою клон або потомство однієї клітини. Плазмід однієї колонії містять клон геномної ДНК, а сукупність плазмід можна назвати бібліотекою геномної ДНК. Недолік такого методу в тому, що фрагменти ДНК утворюються у величезній кількості. Розрізання геномної ДНК відбувається випадково, тому лише частина фрагментів містять повноцінні гени. Деякі фрагменти можуть містити тільки частину гена або ж інтронні послідовності.

Однак при створенні геномних бібліотек часто доводиться працювати із більшими фрагментами. Для цього розроблено вектори на основі бактеріофага λ *E. coli*.

Після проникнення фагу λ у клітину *E. coli* події можуть розвиватися за двома сценаріями. Якщо реалізується *літичний цикл*, то фаг починає інтенсивно розмножуватися й приблизно через 20 хв клітина руйнується (лізує) з вивільненням до 100 нових фагових часток. При альтернативному варіанті розвитку подій фагова ДНК включається в хромосому *E. coli* як профаг і реплікується в клітині разом із нормальними бактеріальними генами. Однак, при нестачі живильних речовин або інших несприятливих обставинах інтегрована фагова ДНК вивільнюється і запускається літичний цикл розвитку.

Розмір ДНК фага λ становить близько 50 т.п.н., причому значна її частина (близько 20 т.п.н.) несуттєва для розмноження фага й відповідає за його вбудовування в ДНК власника. У зв'язку із цим виникла ідея, що її можна замінити фрагментом іншої ДНК еквівалентного розміру. Рекомбінантна

молекула, що створюється, буде реплікуватися у клітині як ДНК рекомбінантного фага λ , що встав на літичний шлях розвитку.

Фагові вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК довжиною 15-25 т.п.н. Однак, цього явно недостатньо, щоб клонувати цілком багато генів тварин і рослин, довжина яких найчастіше перевищує 35-40 т.п.н. Необхідною місткістю володіють векторні молекули, називані *космідами*. Косміди являють собою невеликі плазмиди, в які *in vitro* введені *cos*-сайти ДНК фага λ . Звідси походить назва всього типу даних векторів (*cosmid*). У ДНК нормальних фагових часток *cos*-сайти розташовані на кінцях молекул, вони розділяють мономери фагової ДНК. У процесі пакування *cos*-сайти розпізнаються компонентами ферментативної системи й по них відбувається послідовне відокремлення (відрізання) упакованої у фагову часточку λ -ДНК від іншої не упакованої ДНК.

Дослідження генів у хромосомах вищих рослин, тварин і людини зажадало створення векторів для клонування фрагментів ДНК довжиною в кілька сотень тисяч пар основ. Цим завданням відповідає система, створена для клонування наддовгих молекул ДНК на основі штучно отриманої міні-хромосоми дріжджів *YAC* (*yeast artificial chromosome*). *YAC*-вектор являє собою кільцеву молекулу ДНК, що містить ряд генетичних елементів, які дозволяють їй існувати у позахромосомному стані в клітинах дріжджів.

При всіх своїх достоїнствах системи клонування, засновані на векторах сімейства *YAC*, володіють рядом істотних недоліків. У рекомбінантних ДНК, підтримуваних у таких системах, часто виникають внутрішні делеції. Крім того, при введенні рекомбінантних ДНК у клітини дріжджів іноді має місце проникнення в одну клітину декількох молекул вектора із вставками.

У підсумку окремі клони дріжджових клітин можуть містити декілька незчеплених одну з одною молекул рекомбінантних ДНК, а рекомбінація між ними взагалі може приводити до утворення химерних молекул. Все це дуже утрудняє фізичне картирування генів у хромосомах досліджуваних об'єктів. Для подолання такого роду труднощів були сконструйовані альтернативні векторні системи, серед яких найбільш популярними в цей час є системи, засновані на *штучних хромосомах бактерій* – *BAC* (*bacterial artificial chromosome*).

Сучасні *BAC*-вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК довжиною до 300 т.п. н. і вище. Рекомбінантні молекули вводяться в клітини *E. coli* за допомогою електропорації, причому ефективність утворення трансформантів в 10–100 разів вище, ніж при звичайній трансформації *сферопластів* (клітини, оболонка яких зруйнована лише частково) дріжджів векторами сімейства *YAC*. Це дозволяє зменшити вихідну кількість ДНК, необхідну для конструювання репрезентативних клонотек генів.

Оскільки рекомбінантні *BAC*-вектори існують у бактеріальних клітинах у вигляді однієї копії, виключається спільне клонування в одній клітині різних фрагментів ДНК і утворення химерних молекул, що досить істотно для фізичного картирування великих геномів.

Використання транспозонів для клонування ДНК. Транспозони, повсюдно поширені в живій природі, є мобільними генетичними елементами, що володіють здатністю переміщатися з однієї частини геному в іншу шляхом вирізання й наступної інтеграції за механізмом, незалежним від гомологічної рекомбінації.

Питання для самоперевірки

1. Які молекули ДНК називають векторами? Які існують типи векторів?
2. Які нові властивості можуть надавати клітинам маркерні гени?
3. Які вимоги надають до векторів?
4. Чому плазмідні вектори майже не використовують при створенні геномних бібліотек?
5. Чим відрізняються кон'югативні плазмідни від некон'югативних?
6. Як називається процес перенесення некон'югативної плазмідни за допомогою кон'югативної?
7. З яких етапів складається життєвий цикл фага?
8. В чому різниця між вірулентними і помірними фагами?
9. Чому процес трансфекції значно ефективніший процесу трансформації?
10. В чому полягає стан компетентності клітин і яким чином його можна підвищити?
11. Яку роль грає *cos*-ділянка у фага λ ; для чого її використовують при конструюванні космід?
12. Які вектори називають космідами? У чому полягає їх особливість?
13. Чим відрізняються косміди і плазмідни?
14. Які особливості має YAC-вектор? У чому переваги та недоліки їх використання?
15. Що таке транспозони і які особливості для них характерні?
16. Які види транспозиції існують і в чому їх різниця?

11. Геномні бібліотеки і бібліотеки кДНК. Способи ідентифікації генів у клонотеках. Методи секвенування ДНК. Будова рестрикційних карт

Мета біотехнологічних експериментів часто полягає в ідентифікації генів, які кодують певні білки (структурних генів). Оскільки у прокаріот кодуючі домени (ділянки) структурних генів безперервні, а у еукаріот кодуючі області (екзони) розділені не кодуючими (інтронами), то при їх клонуванні використовуються різні методи. У прокаріот сумарну ДНК гідролізують рестриктазою і кожен з отриманих фрагментів вбудовують у вектор. Потім необхідно виявити специфічну лінію клітин (клон), яка містить необхідну послідовність, відділити її і охарактеризувати. Процес розподілення геномної ДНК на елементи для клонування, введення цих елементів у клітини-хазяїв має

назву створення геномної бібліотеки. Повна бібліотека за визначенням містить весь геном даного організму.

Один із способів створення бібліотеки ДНК полягає в обробці донорської ДНК рестриктазою в умовах, коли відбувається лише часткове розщеплення, таким чином, що створюються фрагменти різних розмірів. Частковий гідроліз дозволяє клонувати цілі гени, однак, оскільки сайти рестрикції розташовані не випадкове, деякі фрагменти можуть виявитися занадто великими для клонування. Для вирішення цієї проблеми використовують іншу додаткову рестриктазу.

Фрагменти, що отримані, з'єднують з ДНК векторів за допомогою лігази і, за можливістю, упаковують в підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом при $t = -70^{\circ}\text{C}$. Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років.

Для клонування еукаріотичних структурних генів необхідні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони з первинних РНК-транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК у бактеріальній клітині неможлива. Більш того, експресія еукаріотичної ДНК може здійснюватися тільки при наявності прокаріотичних сигнальних послідовностей, що регулюють транскрипцію й трансляцію.

Саму мРНК не можна вмонтувати у ДНК-вектор, спочатку на ній необхідно синтезувати дволанцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотну транскриптазу й фрагменти Кленова ДНК-полімерази I. Матрицею в цьому синтезі слугує молекула зрілої мРНК, а каталізує його зворотна транскриптаза, що продується деякими ретровірусами.

У реакційну суміш додають фрагмент Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, що добудовує другий ланцюг ДНК, використовуючи перший ланцюг як матрицю. Він приєднує дезоксинуклеотиди до зростаючого ланцюга, в наслідок цього створюється безінтронна клонована ДНК, так звана кДНК.

Різні кДНК можна вбудовувати в плазмідний вектор і отримати кДНК-бібліотеку.

Наступний після створення бібліотеки етап – це розшук клону (клонів), які містять необхідну послідовність ДНК. Для цього використовують такі методи: гібридизацію з міченим ДНК-зондом з наступним радіоавтографічним аналізом; імунологічний *скринінг* (ідентифікація одиничного об'єкту шляхом перевірки чисельних об'єктів); скринінг за активністю білку, який кодується геном – мішенню.

Скринінг за допомогою гібридизації. Необхідну нуклеотидну послідовність у зразку ДНК можна виявити за допомогою ДНК-зонду, який з'єднується лише з послідовністю, що розшукується.

ДНК-гібридизація полягає в тому, що ДНК-мішень піддають денатурації (роз'єднанню ланцюгів ДНК під дією теплової обробки або впливу лугів) і одноланцюгові молекули міцно приєднують до твердої підложки (нітроцелюлозного або нейлонового фільтру). Потім фільтр інкубують з одноланцюговим ДНК-зондом, який помічений радіоізотопами або іншими мітками. Якщо

нуклеотидні послідовності зонду і ДНК-мішені комплементарні, то відбувається їх спарування (тобто гібридизація). Гібридні молекули можна виявити радіографічним або іншими методами. Для гібридизації необхідно, щоб на ділянці довжиною 50 нуклеотидів співпадало більш 80% з них.

Мічені ДНК-зонди для скринінгу бібліотеки можна отримати як найменш двома способами. По-перш, можна використовувати клоновану ДНК близькоспорідненого організму (гетеролітичний зонд). По друге, зонд можна отримати методом хімічного синтезу, заснованого на відомій амінокислотній послідовності білкового продукту гену, який розшукується.

Імунологічний скринінг. При відсутності ДНК-зонду можна використовувати інші методи, наприклад, якщо клонований ген здатний до експресії (реалізації генетичної інформації), то його продукт – весь білок, або його частину – можна виявити імунологічними методами. Всі клітинні лінії (клони) бібліотеці висівають на чашки з поживним середовищем. Колонії, що вирости, переносять на фільтр, клітини лізують (руйнують), а білки, що звільнилися, фіксують на фільтрі. Потім на фільтр наносять перші антитіла, які специфічно зв'язуються з певним білком (антигеном), усі антитіла, що не зв'язалися віддаляють, а фільтр поміщають у розчин других антитіл, специфічних до перших антитіл. Часто використовують кон'югати других антитіл з ферментом, під впливом якого відбувається гідроліз субстрату з утворенням забарвленої речовини в тому місті, де здійснюється реакція.

Скринінг за активністю білку. В тому випадку, коли ген, що розшукується, кодує фермент, який не синтезується клітиною-хазяїном, використовують метод ідентифікації на чашках. Для виявлення клонів, які містять цей ген, клони *E.coli*, що складають геномну бібліотеку даного організму (клітини-хазяїна), висівають на середовищі із специфічним субстратом. Клітини, які здатні утилізувати цей субстрат, після фарбування набувають певного забарвлення.

Якщо ген, що розшукується, кодує продукт, без якого клітина-хазяїна не здатна рости на мінімальному середовищі, то бібліотеку можна створювати методом *трансформації мутантних клітин*. Клони, що не містять цього гену будуть гинути, а на мінімальному поживному середовищі залишаться лише клітини, до складу яких увійшов необхідний ген.

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

Хімічне секвенування засновано на вибіркової хімічної деградації нуклеотидів. Для цього методу необхідно отримати одноланцюгову молекулу ДНК, на одному з кінців якої роблять радіоактивну мітку за допомогою ізотопу фосфору ^{32}P , препарат міченої ДНК поділяють на чотири порції і кожен обробляють реагентом, який специфічно руйнує одну, або дві з чотирьох основ. Необхідно підібрати умови реакції таким чином, щоб на одну молекулу припадало лише декілька пошкоджень. При обробці піперидином в ДНК утворюється розрив в тому місті, де знаходилася зруйнована основа.

В результаті створюється набір мічених фрагментів, довжина яких визначається відстанню від зруйнованої основи до кінця молекули. Фрагменти, що створилися в усіх чотирьох реакціях, піддають електрофорезу на чотирьох доріжках в акриламідному гелі, потім роблять радіографію, і фрагменти, що містять радіоактивну мітку, залишають „відбитки” на рентгенівській плівки. По їх положенню можна визначити, на якій відстані від міченого кінця знаходилася зруйнована основа. Таким чином, на підставі набору смуг на рентгенівської плівки визначають нуклеотидну послідовність фрагменту, що аналізується.

За допомогою цього методу вдалося встановити багато послідовностей різноманітних ДНК, але він має ряд недоліків, що пов'язані з тривалістю і трудомісткістю процедур.

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

Оскільки метод секвенування заснований на процесі реплікації ДНК, то основним ферментом є ДНК-полімераза. В присутності одноланцюгової ДНК-матриці, короткого полінуклеотидного праймеру і нуклеотидів за принципом компліментарності буде відбуватися синтез другого ланцюгу ДНК. При цьому подовження ланцюгу здійснюється до того часу, коли замість дезоксинуклеотиду не приєднається дидезоксинуклеотид. Приєднання останнього викликає зупинку синтезу.

Використання флуоресцентних барвників, пов'язаних з нуклеотидами термінації, дозволяє проводити усі реакції в одній пробірці. Крім того, розроблені принципово нові підходи до секвенування, наприклад, секвенування шляхом гібридизації з фіксованими олігонуклеотидними чіпами, секвенування з використанням екзонуклеаз та інші. Усі ці методи дозволяють досить швидко вирішувати проблеми секвенування як великих ділянок ДНК, так і будь яких геномів. Отримані дані вносять у бази даних – банки генів.

Ферменти рестрикції стали ефективним інструментом дослідження. Вони дозволяють перетворювати молекули ДНК великих розмірів в набір фрагментів довжиною від декількох сотень до декількох тисяч пар основ. За допомогою методу *електрофорезу в агарозному гелі* фрагменти ДНК, які розрізняються за розмірами, можна легко розділити, а потім досліджувати кожен фрагмент

окремо. Метод електрофорезу заснований на розподіленні фрагментів молекул ДНК, які рухаються з різною швидкістю в електричному полі. Короткі фрагменти у агарозному гелі рухаються значно швидше, ніж довгі. При забарвленні гелів фарбами, які зв'язуються з ДНК, виявляється набір смуг, кожна з яких відповідає певному фрагменту рестрикції. Молекулярну масу фрагменту можна визначити при калібруванні за допомогою фрагментів ДНК з відомими молекулярними масами.

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

Питання для самоперевірки

1. Чим відрізняється клонувана ДНК (кДНК) від звичайної ДНК еукаріот?
2. Яким чином зберігають бібліотеку генів?
3. Яким чином можна визначити довжину ділянок ДНК?
4. Що таке "рекомбінантні ДНК" і за допомогою якого класу рестриктаз можливо їх створювати?
5. Що таке секвенування, для чого воно потрібно?
6. У чому різниця між хімічним і ферментативним секвенуванням?
7. У чому полягає особливість хімічної будови дидезоксинуклеотиду?
8. Який метод надає можливість визначити довжину всіх фрагментів ДНК, що створилися?
9. Де в генній інженерії використовуються штучні олігонуклеотиди?
10. Що таке "праймер"? для чого він використовується?

12. Методи створення трансгенних тварин та напрями їх використання

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

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

Метод мікроін'єкції ДНК. Отримання трансгенних тварин шляхом мікроін'єкцій гена включає вилучення ембріонів на стадії пронуклеуса хірургічним шляхом або після забою донорів. Для отримання запліднених яйцеклітин, необхідних для мікроін'єкції, у тварин гормональною обробкою викликають суперовуляцію за схемою визначеною для кожного виду тварин, а

потім вилучають яйцеклітини при промиванні яйцепроводів. Для ін'єкції ембріони за необхідністю фіксують на столі мікроскопа за допомогою фіксуєної піпетки так, щоб пронуклеус, в який проводять ін'єкцію, було добре видно. Для ін'єкції піпетку через прозору оболонку і клітинну мембрану вводять у пронуклеус, після чого додають у нього 1-2 пкл розчину ДНК. Про точність операції свідчить набухання пронуклеусу. Лише візуальне збільшення об'єму ядра вказує, що розчин ДНК дійсно потрапив у пронуклеус. Після ін'єкції ембріони звільняють від фіксуєної піпетки і культивують до часу пересадки реципієнтам.

Проведення мікроін'єкцій трансгена у запліднені *in vitro*, а не лише в отриманні від донорів хірургічним шляхом, або після забою, ембріони великої рогатої худоби зробило цей метод доступним для більшості лабораторій. Однак ефективність методу залишається дуже низькою. Необхідно якнайменш 100 вагітностей після пересадки ін'єктованих ембріонів, щоб отримати одну трансгенну тварину, в геном якої включений трансген, і він здатний передаватися спадково нащадкам.

На жаль інтеграція трансгена, як правило, носить випадковий характер:

- у деяких випадках чужорідна ДНК стимулює виникнення мутацій;
- не завжди трансгенна тварина характеризується експресією трансгена.

Наприклад, експерименти по введенню гена гормону росту людини сільськогосподарським тваринам дозволили отримати трансгенних кролів і свиней, однак ріст їх не відрізнявся від росту контрольних тварин;

- експресія трансгену в організмі трансгенної тварини крім позитивного ефекту, що очікується, може викликати і негативну реакцію. Збільшення рівня гормону росту в крові трансгенних овець у деяких випадках приводило до виникнення діабету і загибелі тварин;

- внесення трансгена в ембріон може викликати народження *мозаїків*.

Мозаїками вважаються тварини, які складаються з двох або декількох клітинних ліній, що походять з однієї зиготи, але мають різні генотипи. Трансгенні мозаїки крім клітинних ліній, що містять трансген, мають нетрансгенні лінії. При отриманні від таких тварин нащадків можуть виникнути певні труднощі. Так, якщо клітини гонад не містять трансгена, нащадки не можуть успадкувати ін'єкований ген від трансгенних батьків. Існуючі дані свідчать, що біля 30% первинних трансгенів, що отримані за рахунок методу мікроін'єкцій, є мозаїками. Частина мозаїків зовсім не здатна створити трансгенну лінію, оскільки в них відсутня передача трансгена спадково.

Незважаючи на досягнуті в сфері трансгенезу успіхи, ефективність (число отриманих трансгенних тварин від числа пересаджених ембріонів) класичного методу мікроін'єкції залишається дуже низькою і варіює від 0,5% у великої рогатої худоби до 1,0-2,0% у кролів. У свиней, овець і кіз результативність методу мікроін'єкції становить 0,5-1,0%.

Метод мікроін'єкції у пронуклеус залишався домінуючим при створенні трансгенних сільськогосподарських тварин до середини 90-х років XX століття і був практично повністю витіснений методом пересадки ядер соматичних клітин, генетично трансформованих *in vitro* (SCNT).

Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин. Клітини, що отримані з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферувати в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь які типи клітин, у тому числі і в клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти. Такі клітини називають *тотипотентними ембріональними стовбуровими клітинами (ES)*.

ES-клітини у культурі легко модифікувати методами генної інженерії без руйнування їх тотипотентності. Наприклад, у певний сайт неістотного гена в їх геномі можна вбудовувати функціональний трансген. Потім можна відібрати клітини, що змінилися, культивувати їх і використовувати для отримання трансгенних тварин. Це дозволяє запобігти випадкового вбудовування, що властиве для методу мікроін'єкцій.

Ефективність трансгенезу становила 100%, в той час як застосування методу мікроін'єкції в тій же лабораторії дозволяло отримувати лише 4,35% трансгенних нащадків від числа народжених тварин. Для отримання одного трансгенного ягняти за допомогою SCNT в середньому потрібно 20,8 овець, у той час як при використанні методу мікроін'єкції - 51,4 вівці.

У специфічний хромосомний сайт ES-клітин можна не лише вбудовувати трансген, який кодує нову функцію, але і спрямовано руйнувати цей сайт за рахунок інтеграції з його кодуючою областю специфічної послідовності (як правило, селективного маркерного гена). Одна з задач спрямованого руйнування ("нокаута") гена полягає в дослідженні впливу цього процесу на розвиток організму і фізіологічні функції, які в ньому здійснюються. Крім того, є надія, що трансгенні тварини з порушеннями в певному гені можна використовувати як модель для вивчення хвороб людини на молекулярному рівні.

Використання ретровірусних і лентівірусних векторів. Перевага цього методу полягає в його ефективності і відносній простоті виконання.

Принципові відмінності між двома вищезгаданими типами векторів полягають у тому, що ретровірусні вектори можуть інтегруватися лише у клітини, що активно діляться, в той час як лентівіруси здатні реплікуватися, як у клітинах, що діляться, так і в тих, що не діляться. Використання ретровірусів дозволяє вбудовувати в РНК фага зрілу мРНК трансгена без створення на її основі ДНК. Літичний цикл розвитку фага дає можливість отримувати одразу до 100 копій вектора. Однак, існують і певні недоліки при використанні цього методу. Розмір трансгена не повинен перебільшувати 8 т.п.н., а це, у свою чергу, може позбавити його регуляторних послідовностей, які необхідні для експресії.

Крім того, незважаючи на те, що ретровірусні вектори створюють так, щоб вони були не здатні до реплікації, може виникнути ймовірність подвоєння вірусу в організмі тварини, що заборонено у випадку використання тварини для їжі, або отримання комерційного продукту.

Використання сперматозоїдів у якості векторів трансгена (SMGT).

Використання сперматозоїдів у якості носіїв для трансгена можливо здатне забезпечити інтродукцію їх у геном зародку у найбільш оптимальний

для цього період. Однак, це залежить від місця, в яке потрапляє чужорідна ДНК. Встановлено, що для бугаїв і кнурів здатність до зв'язування трансгену обмежена головним чином екваторіальною зоною і постакросомальним районом головки сперматозоїда. Потрапляння чужорідної ДНК у залишки цитоплазми в основі хвоста не призводить до трансгенезу.

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

Недавні дослідження виявили, що переніс трансгенів за допомогою сперматозоїдів у геном зиготи може здійснюватися не лише в умовах *in vitro*, але і при заплідненні *in vivo*. В цих експериментах відмиті від сім'яної плазми сперматозоїди кнура утримували в культуральному середовищі з плазмідом, яка містила трансген, протягом 30 хвилин, після чого оброблені сперматозоїди центрифугували до об'єму 1 мл і вносили в кожен ріг матки за допомогою ін'єкції по 0,5 мл трансформованих спермій. Відсоток запліднення свиноматок становив 73 (16 свиноматок з 22), і 10 з 48 (21%) поросят виявилися трансгенними.

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

Технології активного трансгенезу. Прогрес у геномній інженерії сільськогосподарських тварин у даний час пов'язують із розвитком технологій так званого *активного трансгенезу*, які за допомогою екзогенних ферментів або ДНК, що їх кодують, забезпечують можливість спрямованої (сайт-специфічної) інтеграції з метою привнесення нових функцій (gain-of-function) або, навпаки, втрати функцій (loss-of-function). У якості інструментів у технологіях активного трансгенезу знаходять застосування системи ДНК-транспозонів і сайт-специфічних ендонуклеаз. ДНК-транспозони або транспозони другого типу – це мобільні генетичні елементи, які переміщуються по геному господаря, використовуючи механізм «вирізати-вставити». Основною перевагою використання транспозонів для трансгенезу є їх інтеграція в ділянки еухроматину, що запобігає *сайленсінгу* (процес відключення) трансгенів, що спостерігається при випадковій інтеграції в ділянки гетерохроматину.

Нову епоху в області трансгенеза тварин пов'язують із застосуванням для геномної інженерії ссавців системи CRISPR/Cas9.

У даний час за допомогою CRISPR/Cas9 створені генетично модифіковані лінії фетальних фібробластів практично всіх основних видів сільськогосподарських тварин (великої рогатої худоби, свиней, кіз) з нокаутом і вставками цілого ряду генів.

Безперечно, технологія CRISPR/Cas9 найближчим часом стане домінуючою в створенні трансгенних сільськогосподарських тварин.

В наш час основними напрямками створення трансгенних тварин є:

- тварини зі зміненим обміном речовин для підвищення якості та ефективності виробництва продукції;
- тварини стійкі до захворювань;
- тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення;
- тварини – донори внутрішніх органів для пересадки людині (ксенотрансплантація);
- тварини – генетичні моделі захворювань людини.

Тварини зі зміненим обміном речовин для підвищення якості та ефективності виробництва продукції. Найбільш раннім напрямком стало отримання особин з генами, продукти експресії яких є регуляторами обміну речовин тварин, забезпечуючи досягнення високої продуктивності, економної витрати кормів і змуну якісних характеристик продукції. З генетичної точки зору найбільш цікаві гени, що кодуєть протеїни каскаду гормону росту, а саме, безпосередньо гормон росту (ГР), рилізінг фактори гормону росту (РФ-ГР) і інсулінподібний фактор гормону росту (ІФ-ГР).

Перші трансгенні миші з геном ГР пацюка були отримані у 1982 р. В них спостерігалось підвищення швидкості росту (у чотири рази) і подвоєння живої маси.

Що стосується сільськогосподарських тварин, у трансгенних свиней і овець не спостерігалось відповідного прискорення росту, або підвищення його не перебільшувало 15-16% порівняно з контролем. Деякі дослідники пояснюють це тим, що піддослідні тварини походять з популяцій, в яких протягом десятиліть проводилася селекція за цією ознакою. Поряд з цим, відмічено збільшення вмісту білка і зменшення вмісту жиру у тканинах трансгенних тварин з додатковими генами гормону росту, що значно підвищує якість і товарну цінність отриманих м'ясопродуктів.

Наступні експерименти були спрямовані на підвищення бактерицидних властивостей молока корів за допомогою додаткової експресії лізоциму. Синтез молочною залозою лізоциму не тільки здійснює антибактеріальний вплив, але і зменшує ймовірність захворювання на мастити, викликає специфічний пасивний імунітет у новонароджених. Крім того, він також сприяє збільшенню виходу сиру, оскільки пов'язаний з казеїнами. Ще один білок молока людини – лактоферин володіє бактеріостатичними властивостями і посилює адсорбцію заліза. Він міститься в молоці корів у незначній кількості і його збільшенням можна досягнути декілька цілей. Оскільки він покращує адсорбцію заліза, то за його рахунок можна підвищити збереженість нащадків, крім того, він контролює розмноження бактерій.

Зменшення кількості лактози в молоці також було б корисно і не лише для людей, які не здатні розщеплювати її із-за недостатнього синтезу ферменту лактази, а і для молочної промисловості, оскільки збільшило б ефективність виробництва сиру. Проблема була вирішена за рахунок створення трансгенних корів, у молочній залозі яких відбувалася експресія лактази, яка гідролізувала лактозу безпосередньо у тканинах вимені.

Можливо також зниження алергенних властивостей молока за допомогою нокауту основного алергену – β -лактоглобуліну.

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

Тварини стійкі до захворювань. Підвищення генетичної стійкості тварин до інфекційних захворювань є одним з головних завдань сучасного тваринництва. Одним із шляхів вирішення проблеми може стати генетична модифікація тварин. Стратегії, що розробляються в зв'язку з цим, можуть бути глобально розподілені на два напрямки: (1) введення генів стійкості в геном господаря («gain-of-function») і (2) специфічний таргетинг ендегенних або екзогенних генів чутливості до захворювань («loss-of-function» або «exchange-of-function»).

Підхід, що дозволяє отримати стійких до захворювань тварин, полягає в інтеграції в їх геном генів імуноглобулінів, специфічних до тих чи інших збудників інфекційних захворювань. Експресія цих генів захистить тварин від хвороботворних мікроорганізмів. До захисних білків також відносяться інтерферони, вони захищають організм від вірусних захворювань. У зв'язку з цим можна очікувати, що трансгенні тварини з геном інтерферону будуть менш схильні до вірусних інфекцій, ніж нетрансгенні.

Ще один напрямок, який може підвищити стійкість тварин до вірусних захворювань, полягає у введенні в їх геном генів, що кодуєть антисмислову РНК. Експресія її у клітинах викликає наступну гібридизацію із смисловою РНК вірусу і, відповідно, інгібування реплікації вірусного геному. Створені трансгенні кролі, кури, велика рогата худоба з геном асРНК проти вірусу лейкозу, стійкі до зараження лейкозом.

Тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення. Для нормального функціонування білків людини дуже важливі ті зміни, що відбуваються на посттрансляційному рівні: глікозилювання, ацетилювання, фосфорилювання, карбоксилювання і деякі інші перетворення. Значна частина біохімічних механізмів, що забезпечують ці процеси, відсутня у прокаріот, і білки, синтезовані ними з матриць генів людини, не повністю ідентичні білкам з клітин людського організму. Інша складність пов'язана з виділенням і очищенням лікарського білка – бактеріальні клітини йдуть у переробку цілком, і тому важко позбутися від усіх сторонніх домішок у кінцевому продукті. Трансгенні дріжджові культури і культури клітин людини не мають цих недоліків, але продуктивність таких систем у даний час нижча, ніж та, яка вже отримана у експериментальних трансгенних тварин.

Достатня кількість якісних і дешевих лікарських білків людини могла б врятувати багатьох пацієнтів. Це завдання і лягло в основу робіт по отриманню трансгенних тварин – продуцентів білків людини.

Стратегія цих робіт така: отримати трансгенну тварину, в якій чужий ген експресується в клітинах молочної залози і продукт роботи цього гена

виділяється в молоко. Тоді отримання лікарського білка зведеться до процесу, що відомий людині вже багато тисяч років, – до доїння. Використання молока доцільно тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості і його можна надоювати за необхідністю без шкоди для тварини. Запропоновано новий термін “*біофармінг*”, який належить до процесу отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів.

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

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

Тварини – донори внутрішніх органів для пересадки людині (ксенотрансплантація). Найбільш придатним видом тварин – потенційних донорів є свині. Однак до останнього часу використання свиней в якості донорів розглядалося тільки теоретично, оскільки пересадка їх органів та тканин приматам супроводжувалася відторгненням протягом декількох днів або навіть годин після трансплантації (надгостра реакція відторгнення). Рішенням проблеми зняття такої надгострої реакції відторгнення може стати створення GAL-KO трансгенних свиней з нокаутом гена GGTA1.

Подальші модифікації свиней пов'язують із додатковою експресією генів, що перешкоджають процесу клітинного відторгнення. Незважаючи на те, що досягнення вищезгаданих цілей вимагає проведення нових широкомасштабних досліджень, досягнуті успіхи в нокауті GGTA1 дозволяють вже сьогодні говорити про потенційну значимість GAL-KO свиней у вирішенні деяких завдань трансплантаційної медицини. Зокрема, розглядається їх використання в якості джерела шкіри в терапії опікових ран і як донорів серцевих клапанів.

Тварини – генетичні моделі захворювань людини. Багато хвороб мають спадкову зумовленість. І це стосується не лише моногенних захворювань, що відбуваються внаслідок мутації в якомусь одному певному гені. Часто причиною захворювання є цілий комплекс порушень геному. Для вирішення цих питань все частіше залучаються трансгенні моделі спадкових захворювань людини.

Після того, як виявлений ген, імовірно відповідальний за дане захворювання, можуть бути створені два типи модельних тварин: миші з функціонуючим трансгеном і миші з втратою функції даного гена. Перший тип – це класичні трансгенні миші, в геном яких запроваджено ген людини, відповідальний за конкретне захворювання. Якщо схильність до захворювання залежить від наявності в геномі одного з алелів, то для перевірки цієї гіпотези створюються лінії трансгенних мишей, що несуть різні алелі даного гена. На

цих моделях можна досліджувати вплив кількості копій гена і рівня його експресії на прояв захворювання, а також розробляти нові методи лікування. Другий тип модельних тварин – це миші, у яких вимкнений ген, аналогічний тому, що викликає це захворювання у людини. На цій моделі досліджують конкретні функції генів, що особливо важливо для аналізу причин мультигенних захворювань.

Питання для самоперевірки

1. Які тварини називаються трансгенними?
2. Що таке трансгенез?
3. Які існують способи введення трансгена в організм тварини?
4. Які переваги та недоліки існують при введенні трансгена за допомогою ретровірусів?
5. Чому мікроін'єкція трансгена робиться у чоловічий пронуклеус?
6. Яких тварин називають мозаїками, в чому особливості будови їх геному?
7. Що таке спрямований “нокаут” і для чого його використовують?
8. Які існують види клонування за допомогою пересадки ядер?
9. З яких стадій складається процес отримання трансгенних корів?
10. Які дослідження зробили метод мікроін'єкцій для В.Р.Х. більш ефективним і доступним?
11. Які існують особливості внесення трансгена при використанні в якості векторів сперматозоїдів?
12. У чому полягає суть методу створення трансгенних тварин *in vivo* за допомогою сперматозоїдів у якості векторів?
13. Які існують напрямки створення трансгенних тварин?
14. Чому ген гормону росту не виявив ефективність для сільськогосподарських тварин?
15. В яких напрямках змінюють властивості молока?
16. Що визначає поняття біофармінг?
17. Чому доцільно використовувати молоко тварин для створення білків людини або технологічного і фармацевтичного призначення?
18. Що необхідно зробити для того, щоб трансгенні продукти синтезувалися молочною залозою?
19. Які проблеми виникають при здійсненні ксенотрансплантації? В чому полягає значення трансгенних тварин для ксенотрансплантації?
20. Чому застосовують два типи тварин – генетичних моделей захворювань людини?
21. Які напрями створення трансгенних риб досліджуються в наш час?
22. В чому полягає особливість антифризних протеїнів риб? Чому корисно отримання трансгенних лососів з вбудованими генами антифризних протеїнів риб?
23. Які проблеми виникають при створенні трансгенних птахів?
24. Чому недоцільно створювати трансгенну птицю за допомогою ретровірусних векторів?

13. Способи створення трансгенних рослин. Застосування трансгенних рослин у медицині та промисловості

Трансгенні рослини – це організми, які містять у своєму геномі рекомбінантний ген (гени). Генетична інженерія дає змогу виділяти ділянки ДНК, які містять потрібні гени, та вводити їх у геном рослин. У такий спосіб одержують рослини, стійкі проти шкідників і гербіцидів, вірусів, грибних патогенів, бактеріозів, абіотичних стресових чинників, з підвищеною загальною продуктивністю, з покращеною якістю рослинної продукції, поліпшеним зберіганням тощо. У рослини вводять гени, які контролюють білки тварин, людини, у тому числі гени, продуктами яких є лікарські речовини тваринного походження, інші важливі компоненти.

Зараз у світовій науці спостерігається бурхливий розвиток таких напрямів генетичної інженерії рослин:

- ізолювання та клонування нових генів;
- створення різноманітних генетичних конструкцій;
- застосування антисмислових конструкцій нуклеїнових кислот.

З практичною метою методи генетичної інженерії застосовують для:

- створення нових форм трансгенних рослин у сільському господарстві, квітникарстві та озелененні, лісівництві;
- одержання вакцин та інших фармацевтичних препаратів;
- створення і використання трансгенних рослин у фіторе mediaції (очищенні ґрунтів, ґрунтових вод від полутантів: важких металів, радіонуклідів, інших шкідливих сполук) та біодеградації.

Зокрема, проведено молекулярне клонування багатьох генів, які кодують біосинтетичні шляхи важливих для медицини алкалоїдів. Ці гени уведено в різні рослини і в культивовані клітини, де вони експресуються. Результати – таких досліджень дають підстави говорити про започаткування нового напрямку *метаболічної інженерії* біосинтезу рослинних алкалоїдів.

Іntenсивно розвивається такий напрям, як генетична трансформація пластидної ДНК, яка має низку переваг порівняно з ядерною трансформацією. Підвищений інтерес до цієї технології зумовлюється такими її особливостями:

- поліцистронний тип експресії дозволяє вводити відразу декілька генів у одній трансформованій системі;
- багатокопійність хлоропластного генома сприяє накопиченню великої кількості білка;
- материнський тип успадкування пластид зменшує ризик розповсюдження трансгенів у довкіллі;
- наявність у хлоропластах механізмів гомологічної рекомбінації дає змогу вбудовувати трансген у визначене місце пластома.

Розвиток цього напрямку біотехнології рослин є перспективним для її широкого застосування у створенні систем накопичення корисних білків, їстівних вакцин, стійких до біотичних та абіотичних стресових чинників рослин тощо.

Наразі вже вбудовані у пластом тютюну гени синтезу соматотропіну, сироваткового альбуміну людини, інсуліну, холерного токсину, біополімерів, що зазнають біодеградації, а також гени стійкості до посухи, комах, грибів, гербіцидів. Одержано хлоропластні трансформанти для деяких видів сільськогосподарських рослин, зокрема картоплі та томата.

Рослина як природний «біореактор» з виробництва важливих для медицини рекомбінантних білків має певні переваги порівняно з клітинами тварин, людини та мікроорганізмів:

- рекомбінантні білки, синтезовані в рослині, не потрібно піддавати денатурації та ресинтезу;
- рослини здатні не лише до синтезу і збирання, а й до глікозилювання білків тварин; це є абсолютно необхідним для синтезу антитіл і деяких інших функціонально повноцінних білків;
- рослини, порівняно із клітинами ссавців і трансгенними тваринами, забезпечують значне здешевлення виробництва рекомбінантних білків, причому без обмежень, пов'язаних зі зростанням обсягів такого виробництва; наприклад, якщо середня вартість очищених пептидів, створених за допомогою інших сучасних методів, становить 100 тис.-1 млн. дол. США за 1 кг, то їхня вартість у разі одержання із трансгенних рослин – 1 тис. дол. за 1 кг;
- у препаратах, вироблених із рослин, порівняно з препаратами тваринного чи мікробного походження, значно менше або й зовсім відсутні небажані віруси та пріони; відсутні домішки, що справляють алергенну, імуносупресивну, канцерогенну, тератогенну дію на організм людини; це зумовлює порівняну легкість очищення синтезованих рослинами фармацевтичних пептидів;
- під час вживання сирих овочів і фруктів, що містять гени, які кодують синтез білківвакцин, відбувається імунізація організму.

Перший відлік історії генної інженерії рослин прийнято вести з 1982 р., коли вперше були отримані генетично трансформовані рослини. Метод трансформації був заснований на природній здатності бактерії *Agrobacterium tumefaciens* генетично модифікувати рослини. Спочатку трансформація застосовувалася для генетичної інженерії дводольних рослин, а потім цей метод застосували і для однодольних. Іншим широко розповсюдженим методом трансформації є технологія, заснована на обстрілі тканини мікрочастинками золота (або інших металів), покритими розчином ДНК.

Усі вирощувані з комерційною метою трансгенні сорти отримані за допомогою цих двох методів. Однак сучасний арсенал методів трансформації досить великий і, крім уже названих, включає ще і такі підходи як:

- уведення ДНК у голі клітини (протопласти);
- електропорація клітин;
- мікроін'єкції ДНК у клітини;
- проколювання клітин шляхом струшування їх у суспензії мікрого-лок;
- опосередкована вірусами інфекція й ін.

Системи швидкого перепрограмування рослин постійно удосконалюються. Наприклад, внесення генетичного матеріалу в рослини

можна здійснювати шляхом агробактеріальної інфільтрації. У цьому разі генетичний матеріал потрапляє у клітину після ін'єкції в листки рослини агробактерій, які містять відповідний вектор. Агробактерії переносять свою Т-ДНК у клітини мезофілу листка. У Т-ДНК агробактерій вбудовано кДНК, одержану на основі необхідних для утворення і проліферації вірусу ділянок вірусної РНК, а також ген (гени) рекомбінантного білка. У рослинних клітинах утворюється РНК після зчитування Т-ДНК. Далі відбувається процес, аналогічний зараженню вірусними РНК. Такий підхід дає змогу обходитись без синтезу РНК у безклітинній системі, а також використовувати не лише цілісні, а й розділені ділянки генів, які клоновано в різні штами бактерій. Ці гени остаточно збираються всередині рослинної клітини після одночасної інфільтрації цими штамами агробактерій.

На основі описаних технологій створено трансгенні рослини, які використовують для виробництва оральних вакцин.

Генна інженерія рослин створює зовсім новий механізм генетичної мінливості – *трансгенез*, що на відміну від раніше існуючих (рекомбіогенез, мутагенез) характеризується можливістю перенесення окремих генів. Правда, ця особливість утруднює застосування методів генної інженерії для поліпшення ряду господарсько-цінних ознак, що успадковуються полігенно. Але вже отримані химерні рослини, що несуть гени стійкості до хвороб, комах, гербіцидів.

Зернові культури є важким об'єктом для генної інженерії. Це обумовлено, насамперед, відсутністю векторних систем для введення генів у геном клітин злаків. Найбільш ефективна для ряду видів рослин векторна система на основі плазмід *Agrobacterium tumefaciens* малоприсадаблена для злаків.

Генна інженерія розробляє методи прямого перенесення генів у клітини рослин. До цих методів перенесення чужорідної ДНК у протопласти рослин і тварин належать *електропорація*: короточасні електричні розряди збільшують проникність мембран протопластів, через які і проникає ДНК, що знаходиться у розчині. Так були отримані трансформанти кукурудзи, рису і цукрового очарету.

Розроблено метод введення чужорідної ДНК з використанням *електрофорезу* в агарозному гелі, показана можливість застосування даного методу для трансформації калюсів пшениці з наступною регенерацією з них трансгенних рослин.

Спосіб *балістичної трансформації* застосували, наприклад, для введення гена вірусу тютюнової мозаїки у клітини цибулі. Метод високошвидкісної балістичної трансформації у даний час широко використовується при створенні трансгенних рослин пшениці, кукурудзи, соняшнику, плодових культур.

Генетично змінені рослини зі стійкістю до різних класів гербіцидів зараз є найбільш успішним біотехнологічним продуктом. Одержання гербіцидостійких рослин є важливим, тому що широке застосування гербіцидів – це неодмінна риса нових інтенсивних технологій у сільському господарстві, а істотним недоліком багатьох високоефективних гербіцидів є здатність не тільки впливати на бур'яни, але й пригнічувати багато культурних рослин.

Застосування гербіцидостійких рослин дозволить істотно видозмінити тактику боротьби з бур'янами, досягти помітної економії на оранці, обробці ґрунту і прополці.

Біотехнологія дозволила генетично змінювати стійкість рослин до тих або інших гербіцидів або шляхом введення генів, що кодують білки, нечутливі до даного класу гербіцидів, або за рахунок введення генів, що забезпечують прискорений метаболізм гербіцидів у рослині.

Стійкість рослин до заморозків є частиною більш загальної проблеми морозостійкості. Істотним фактором ушкодження багатьох рослин ранніми заморозками є епіфітна і сапрофітна мікрофлора. Механізм цього явища пов'язаний з білком, що здатні синтезувати мікроорганізми. Його називають білок формування кристалів льоду (БФКЛ). БФКЛ викликає формування кристалів льоду в різних частинах рослин – листі, стеблах, коренях. Він і є одним з головних факторів, відповідальних за ушкодження тканин чутливих рослин при ранніх заморозках.

В основі генно-інженерного підходу до боротьби з пошкоджуючою дією ранніх заморозків лежить той факт, що деякі БФКЛ-мутанти, як природні, так і експериментально отримані, втрачають здатність ушкоджувати сільськогосподарські рослини (наприклад, цитрусові, томати, картоплю) при низьких температурах.

Одним з важливих напрямків біотехнологічних досліджень є створення трансгенних рослин-продуцентів рекомбінантних сполук медичного призначення, так зване «молекулярне виробництво» (molecular farming).

Першою рекомбінантною фармацевтичною сполукою, синтезованою у рослинах соняшника, був гормон росту. Першими комерціалізованими продуктами, синтезованими у трансгенних рослинах, стали авідин та бета-глюкуронідаза, які накопичувалися у насінні рису. Спрямованість досліджень пов'язана з визначеною можливістю синтезування цих сполук рослинними клітинами, а також тим, що у деяких випадках такі сполуки, синтезовані, зокрема, у клітинах ссавців, потребують додаткового перетворення.

Серед напрямків досліджень, спрямованих на «молекулярне виробництво», можна виділити такий, метою якого є продукування у трансгенних рослинах рекомбінантних сполук для їх подальшого виділення та використання у медичних цілях. При цьому створюються трансгенні рослини, що синтезують рекомбінантні білки, наприклад, антигени, цитокіни тощо, а також шляхом перенесення відповідних генів змінюється метаболізм рослин таким чином, що або підвищується рівень накопичення властивих для даного виду рослин сполук, або рослини синтезують невласиві сполуки (метаболічна інженерія).

Інший напрямок пов'язаний з використанням для трансформування та перенесення цільових генів таких рослин, які вживаються у їжу без термообробки та можуть стати «їстівними» вакцинами. У клітинах рослин з трансформованим геномом можуть синтезуватися білки, які використовуються у харчовій промисловості, наприклад, казеїн та лактальбумін, полімери, використовувані у хірургічній практиці, гормони, зокрема, соматотропін та ін.,

фактори росту, ферменти (глюкоцереб्रोзидаза, трипсин), цитокіни, у тому числі інтерлейкіни та інтерферони, імуноглобуліни, глікопротеїни тощо. У трансгенних рослинах синтезувалися антитіла, зокрема, до вірусу сказу, герпесу, вірусу Ебола, вірусу грипу H5N1, вірусу лихоманки Західного Нілу, гепатиту В та С та інші.

Доведено біологічну активність синтезованих у трансгенних рослинах сполук, наприклад, антигенів, потенційну можливість використання для імунізації та лікування, зокрема, грипу, туберкульозу, вірусу імунодефіциту людини, гепатиту В, СНІДу, вірусів, які уражають тварин, сибірки.

До геному рослин банану, картоплі, фізалісу, тютюну, томату, арахісу перенесено ген поверхневого антигена вірусу гепатиту В. Отримано рослини, які мають гени термолабільної субодиниці В *Escherichia coli*, субодиниці В холерного токсину, капсидного білка вірусу Норвалк, онкопротеїна 16E7 папіломавірусу.

Клінічними випробуваннями вакцин рослинного походження було визначено безпечність їх застосування та високий рівень імунної відповіді. Об'єктами досліджень являлися рослини тютюну, класичного модельного об'єкту багатьох біотехнологічних робіт, а також крім зазначених вище також важливі сільськогосподарські та їстівні культури, наприклад, рослини сої, люцерни, кукурудзи, картоплі, салату, моркви.

Ряд дослідників використовували таку важливу культуру як рис. Американська біотехнологічна компанія *Ventria Bioscience* використовували рис для продукування антибактеріальних, противірусних та протигрибкових сполук, зокрема, лактоферин, лізозим, а також сировотковий альбумін людини. Запропоновано використовувати трансгенний рис як вакцину (*MucoRiceCTB*) проти холери. Takagi et al. створили рослини рису з антиалергійними властивостями.

Таким чином, біотехнологія вже допомагає лікувати різноманітні хвороби, розвиваючи і поліпшуючи методи терапії. Саме біотехнологія дала нам методи лікування кардіологічних хвороб, атеросклерозу, гемофілії, гепатиту, СНІДу тощо.

Сьогодні створюються біотехнологічні продукти харчування, які зроблять дешевими та доступними для найбільшої частини населення планети життєво необхідні вітаміни і вакцини. Збільшуючи поживну цінність продуктів харчування, біотехнологія водночас дає змогу поліпшити якість харчування. Так, вже створюються сорти рису та кукурудзи з підвищеним вмістом білків; сорти ріпаку, сої та кукурудзи зі зменшеним вмістом олій. Окрім того, генетичну інженерію можна застосовувати для виробництва продуктів харчування з підвищеним вмістом вітаміну А, що допоможе вирішити проблему сліпоти у країнах, які розвиваються. Генетична інженерія також пропонує інші переваги для здоров'я, адже сьогодні вже розроблено методи, які дозволяють видаляти певні алергенні білки з продуктів харчування або запобігати їх передчасному псуванню.

Питання для самоперевірки

1. Генетична інженерія у рослинництві – приклади застосування; біологічні, економічні і соціальні проблеми, пов'язані з нею.
2. Тотипотентність рослинних клітин та використання цього явища для отримання трансгенних рослин.
3. Які існують методи введення ДНК в клітини рослин? Їх характеристика.
4. В чому полягають переваги застосування трансгенних рослин в якості «біореакторів»?
5. Механізм взаємодії *Agrobacterium tumefaciens* з рослиною.
6. Будова Тіплазмід, локалізація і роль генів вірулентності у функціонуванні плазмід
7. Що таке Ті-плазмід? Їх використання в генетичній інженерії рослин. Вектори на основі Ті-плазмід.
8. Біодеградація ксенобіотиків за допомогою рекомбінантних мікроорганізмів.
9. Що таке репортерні гени і як вони використовуються при трансформації рослинних клітин?
10. Опишіть можливості використання рослин як продуцентів рекомбінантних білків медичного значення.

14. Трансгенні організми і біобезпека

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

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

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

Останнім часом у галузі генної інженерії перелік завдань, які вирішують дослідники, значно розширився. Якщо перші роботи були зосереджені насамперед на трансформації рослин за ознаками, що можуть мати певне значення для сільського господарства (стійкість до вірусів, певних гербіцидів і

шкідників), то зараз спектр питань у цьому напрямку значно більший. На сьогодні існують три покоління ГМ-культур:

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

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

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

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

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

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

Друге покоління – рослини, модифіковані з метою поліпшення їхніх властивостей. Наприклад, насіння олійних культур зі зміненим профілем жирних кислот, високо-амілазна кукурудза, лінії рослин із підвищеним вмістом незамінних амінокислот, мінералів і вітамінів. Також відомий "золотий" рис, який містить значну кількість провітаміну А. Подібні процеси, спрямовані на збільшення кількості поживних речовин, називаються *біофортифікацією*.

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

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

2 лінії кукурудзи, а також 41 лінія кукурудзи зі зміненим метаболізмом вуглеводів та 8 ліній цієї рослини зі зміненою альфа-амілазною активністю.

За даними на 2013 р., ГМ культури вирощують 8 індустріально-розвинутих країн та 19 країн, що розвиваються. Лідером вирощування ГМ-культур залишаються США – біотехнологічні рослини в 2013 р. займали площу 70,1 млн га, що становить 40% усіх сільськогосподарських угідь, зайнятих під ГМ-культури в світі.

У 2013 р. запроваджено до комерційного вирощування 2 лінії посухостійких рослин, що має велике значення з огляду на кліматичні зміни. У США майже дві тисячі фермерів засіяли 50 тис. га новою лінією кукурудзи *Corn Belt*. Вирощування посухостійкої кукурудзи має набути масового поширення в 2017 р. у країнах Африки. А в Індонезії розроблено першу посухостійку цукрову тростину, яка набула комерційного застосування у 2014р.

Для оцінювання впливу гербіцидів на навколишнє середовище в Корнуельському університеті в 1990-ті роки запропоновано показник – коефіцієнт екологічного впливу (КЕВ) – відносна величина, яка виражає вплив пестицидів на довкілля, з урахуванням токсичності для тварин і людини, дикої природи, а також місця використання, хімічного складу ґрунту, водних і наземних ефектів. Цей коефіцієнт ширший, ніж просто дані про використану кількість активного компонента гербіцидів. Зменшення цього коефіцієнта відбулося в результаті зниження використання гербіцидів.

До переваг вирощування культур стійких до гербіцидів відносять:

- зменшення витрат на обробку ґрунту, машинне обладнання та паливе;
- впровадження технологій захисту ґрунту або вирощування без його обробки, що додатково економить кошти (людські та паливні ресурси, зайняті на обробці ґрунту), а також зменшення ерозії ґрунту, додаткове утримання волог;
- підвищення ефективності боротьби з бур'янами зменшує час збору культури, зростає рівень якості врожаю;
- зниження потенційного ризику через надлишок гербіцидів у ґрунті, які можуть зашкодити культурі в наступному сезоні, та зменшення витрат на гербіциди в подальших сезонах у результаті підвищення ефективності боротьби з ними.

ГМ-культури, стійкі до комах-шкідників (СК-культури), – відрізняються від ГМ-культур, стійких до гербіцидів. СК-культури завдяки модифікації можуть продукувати певні білки, токсичні для різних видів комах-шкідників.

Основні переваги вирощування стійких до комах культур:

- скорочення витрат палива (обробка інсектицидами відбувається з повітря);
- скорочення витрат на механізацію, збільшення вільного часу фермерів у результаті скасування процедури обприскування інсектицидами;
- поліпшення якості зерна за рахунок зменшення рівня мікотоксинів (у деяких країнах, наприклад, Іспанії та Філіппінах фермери отримують премію за продаж якісного зерна кукурудзи;

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

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

За економічними прогнозами *Ukrainian Economic Trends Forecast* на III квартал 2013 р., підготовленими аналітичною групою *Da Vinci AG*, Україна в перспективі через 5-7 років може стати ключовим виробником ГМ-продукції на європейському континенті, оскільки для цього існують значні перспективи. Британська *PG Economics* спільно з українським Інститутом харчової біотехнології та геноміки оцінила можливий економічний ефект від упровадження ГМ-технологій в українському аграрному секторі. Зокрема, впровадження ГМ-насіння на розсаду може збільшити щорічні прибутки країни на 525 млн дол. США. Сільськогосподарські біотехнології, якщо їх авторизують для використання в українських господарствах, забезпечать помітний економічний і продовольчий вигащ, піднімуть прибутковість господарств і зменшать ризики. Покращуватиметься й стан навколишнього середовища, оскільки фермери почнуть використовувати більш м'які гербіциди, а інсектициди замінять на стійкі до комах лінії культур.

Вчені пропонують застосувати ГМ-технології для вирощування чотирьох традиційних сільськогосподарських культур – сої, кукурудзи, ріпаку та цукрового буряка. Причому, пропонується брати такі ГМ-сорти рослин, які стійкі до гербіцидів, а кукурудзи – ще й до певних видів комах-шкідників. Незважаючи на повну заборону використання в Україні генно-модифікованих сортів рослин, більша частина сої в Україні вирощена із застосуванням гербіцидо-толерантної технології. Крім того, в Україні застосовують сорти кукурудзи, які стійкі до різних шкідників. Існує ще кілька економічно обґрунтованих аргументів щодо легалізації ГМ-технологій в Україні. За оцінками фахівців, їх використання має підвищити врожайність і, відповідно, збільшити валовий збір. За чотирма базовими сільськогосподарськими культурами прибуток становитиме від 1,5 до 9,5%. Використання гербіцидів при догляді за ними скоротиться на 4,4-7,8%. У результаті використання толерантних до гербіцидів ГМ-культур вплив гербіцидів на довкілля скоротиться на 15-24%. Скорочення кількості обробок пестицидами дасть змогу заощадити від 0,78 до 1,56 млн л пального; в атмосферу буде викинуто менше вуглекислого газу – від 2,73 до 5,35 млн кг.

В Україні щорічний прибуток на рівні фермерських господарств за визначеними перевагами застосування ГМ-культур може становити для ГМ-сої від 28 до 66 млн дол. США при 50%-ному рівні запровадження і від 50 до 119

млн дол. США при 90%-ному рівні, який є типовим для більшості країн. Залежно від рівня запровадження ГМ-кукурудзи (50 або 70%) щорічний додатковий прибуток фермерських господарств становитиме від 46 до 111 млн дол. США.

Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО. Питання заборони чи, як мінімум, обмеження використання ГМО зумовлено, насамперед, тим, що проблема можливого впливу ГМО на людину та і біосферу є недостатньо вивченою. Навіть захисники ГМО не дають твердої гарантії їх безпеки. Однак, з їх точки зору, ризик є виправданим.

Можна виділити декілька основних аспектів потенційної небезпеки ГМО.

З огляду впливу на агро екосистеми та природні біоценози:

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

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

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

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

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

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

Біолого-соціально-економічні наслідки використання ГМО:

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

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

3. Підвищення рівня токсичних речовин у рослинах.

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

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

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

- можливого отримання мутантів, що створюють токсичні чи алергенні для людини білки або інші небезпечні сполуки. Реальний ризик, пов'язаний з появою чужорідного гена у реципієнтній клітині, гіпотетично завжди присутній. Це, перш за все, може бути зумовлено *плейотропним* ефектом (*плейотропія* - явище множинної дії гена. Виражається в здатності одного гена впливати на кілька фенотипічних ознак. Таким чином, нова мутація в гені може вплинути на деякі або всі пов'язані з цим геном ознаки);

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

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

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

Питання для самоперевірки

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

15. ГМО в Україні. Контроль використання методів біоінженерії

Основними принципами державної політики в галузі генетичноінженерної діяльності та поводженні з генетично модифікованими організмами на сучасному етапі в Україні є:

- пріоритетність збереження здоров'я і охорони навколишнього природного середовища, порівняно з економічними перевагами від застосування ГМО;

- забезпечення заходів щодо дотримання біологічної та генетичної безпеки під час створення, дослідження та практичного використання ГМО для господарства;

- контроль за ввезенням на митну територію України ГМО і продукції, отриманої з їх використанням, їх реєстрацією та обігом; загальнодоступність

інформації про потенційні ризики від застосування ГМО, які передбачається використовувати у відкритій системі, та заходи щодо дотримання біологічної та генетичної безпеки;

- державна підтримка генетично-інженерних досліджень та наукових і практичних розробок у галузі біологічної та генетичної безпеки під час створення, дослідження та практичного використання ГМО для господарства.

Регулювання поведінки з ГМО здійснюється відповідно до законів України:

- Закон України «Про дитяче харчування» від 14.09.2006;
- Закон України «Про захист прав споживачів» в редакції від 01.12.2005;
- Закон України «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини» в ред. від 06.09.2005;
- Закон України «Про пріоритетні напрями інноваційної діяльності в Україні» в ред. від 09.02.2006;
- Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» в ред. від 07.02.2002;
- Закон України «Про основи національної безпеки України» в ред. від 15.12.2005;
- Закон України «Про захист населення від інфекційних хвороб» від 09.02.2006;
- Закон України «Про тваринний світ» 13.12.2001;
- Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р.

Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р. регулює відносини між органами виконавчої влади, виробниками, продавцями (постачальниками), розробниками, дослідниками, науковцями та споживачами генетично модифікованих організмів і продукції, виробленої за технологіями, що передбачають їх розробку, створення, випробування, дослідження, транспортування, імпорт, експорт, розміщення на ринку, вивільнення у навколишнє середовище та використання в Україні із забезпеченням біологічної та генетичної безпеки.

Водночас цей Закон не застосовується до людини, тканин та окремих клітин у складі організму людини. Закон має виконувати такі завдання:

- охорона здоров'я людини і навколишнього природного середовища у здійсненні генетично-інженерної діяльності та поведінки з ГМО;
- забезпечення права громадян на безпечне використання ГМО;
- створення умов для безпечного практичного використання ГМО для господарства; визначення прав і обов'язків суб'єктів регулювання під час поведінки з ГМО та встановлення їх відповідальності за порушення законодавства; захист громадян у разі заподіяння шкоди їхньому здоров'ю, унаслідок споживання ГМО;
- установлення правових основ міжнародного співробітництва в галузі генетично-інженерної діяльності та поведінки з ГМО.

Положення Закону застосовуються на території України до юридичних і фізичних осіб, які здійснюють діяльність, пов'язану з ГМО. Юридичні та фізичні особи України та інших держав, а також особи без громадянства рівні у своїх правах та обов'язках, визначених Законом.

Якщо міжнародним договором України встановлено інші правила, ніж передбачені цим Законом, то застосовуються правила міжнародного договору. Закон містить визначення біологічної та генетичної безпеки, зокрема:

біологічна безпека – це стан середовища життєдіяльності людини, за якого відсутній негативний вплив його чинників (біологічних, хімічних, фізичних) на біологічну структуру і функцію людської особи в сучасному і майбутніх поколіннях, а також відсутній незворотний негативний вплив на біологічні об'єкти природного середовища (біосферу) та сільськогосподарські рослини і тварини;

генетична безпека – це стан середовища життєдіяльності людини, за якого відсутній будь-який неприродний вплив на геном людини і будь-який неприродний вплив на геном об'єктів біосфери, а також відсутній неконтрольований вплив на геном сільськогосподарських рослин і тварин, промислових мікроорганізмів, який призводить до появи у них негативних та/або небажаних властивостей (ст. 1).

Регулюванню Законом підлягають такі види діяльності.

1. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у замкненій системі. Це система здійснення генетично-інженерної діяльності, *закрита система* якою генетичні модифікації вносяться в організм або ГМО, культивуються, обробляються, зберігаються, використовуються, підлягають транспортуванню, знищенню або похованню в наявних умовах систем захисту, що запобігають контакту з населенням і навколишнім середовищем.

2. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у *відкритій системі*. Це система здійснення генетично-інженерної діяльності, що передбачає контакт ГМО з населенням і навколишнім середовищем із запланованим вивільненням їх у навколишнє середовище, застосуванням у сільськогосподарській практиці, промисловості, медицині та в природоохоронних цілях, передачі технологій та інших сферах обігу ГМО.

3. Державна реєстрація ГМО та продукції, виробленої з їх використанням. Державна реєстрація ГМО – це занесення ГМО до реєстру з урахуванням оцінки їх ризику щодо впливу на здоров'я людини та стан навколишнього природного середовища для подальшого отримання дозволу на практичне використання ГМО в Україні відповідно до їх господарського призначення.

Згідно з чинним законодавством України розрізняють: державний реєстр ГМО – це спеціалізований перелік ГМО, які пройшли реєстрацію, з визначенням їх подальшого господарського призначення; державний реєстр ГМО джерел харчових продуктів і кормів – спеціалізований перелік ГМО, щодо яких на підставі міжнародних правил і критеріїв оцінювання безпечності для здоров'я людини і тварин зроблено висновок про можливість їх використання як харчових продуктів та/або кормів, та/або їх джерел.

4. Уведення в обіг ГМО та продукції, виробленої з їх використанням; експорт, імпорт і транзит ГМО. *Обіг ГМО* – це переміщення (транспортування) або зберігання та будь-які дії, пов'язані з переходом права власності чи володіння, у тому числі продаж, обмін або дарування.

Забезпечення виконання Закону «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» покладено на центральні органи виконавчої влади у межах повноважень і в порядку, передбаченому законодавством України, зокрема на Кабінет Міністрів України (ст. 7), центральний орган виконавчої влади з питань освіти і науки (ст. 8), центральний орган виконавчої влади з питань екології та природних ресурсів (ст. 9), центральний орган виконавчої влади з питань охорони здоров'я (ст. 10), центральний орган виконавчої влади з питань аграрної політики (ст. 11).

Порушення вимог зазначеного Закону і прийнятих на його підставі нормативно-правових актів тягне за собою цивільну, адміністративну, дисциплінарну або кримінальну відповідальність згідно до закону.

Законом може бути встановлена відповідальність і за інші види порушень законодавства України в галузі генетично-інженерної діяльності. У статті 2. «Законодавство України в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО» Закону України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» визначено, що законодавство України у сфері генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО складається з цього Закону, інших законодавчих актів України, які видаються відповідно до нього, а також відповідних міжнародних договорів, згоду на обов'язковість яких надано Верховною Радою України.

Правове регулювання у сфері поводження з генетично зміненими організмами виконується також згідно до постанов Кабінету Міністрів України. До них належать:

- Постанова Кабінету Міністрів України від 24 лютого 2010 р. № 279-р «Деякі питання дослідження продукції, яка містить генетично модифіковані організми або отримана з їх використанням»;

- Постанова Кабінету Міністрів України від 23 липня 2009 р. № 808 «Деякі питання проведення апробації (випробування) та реєстрації генетично модифікованих організмів сортів сільськогосподарських рослин»;

- Постанова Кабінету Міністрів України від 21 листопада 2007 р. № 1330 «Питання маркування сільськогосподарських товарів, вироблених із застосуванням генетично модифікованих організмів»;

- Постанова Кабінету Міністрів України від 1 серпня 2007 р. № 985 «Питання обігу харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми та/або мікроорганізми»;

- «Порядок видачі дозволу на проведення державної апробації (випробування) генетично модифікованих організмів у відкритій системі» затверджений Постановою Кабінету міністрів України від 2 квітня 2009 р. № 308;

- «Порядок державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням» затверджений Постановою Кабінету Міністрів України від 18 лютого 2009 р. № 114;

- Постанова Кабінету Міністрів України від 18 лютого 2009 р. № 114 «Про затвердження Порядку державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням»;

- Постанова Кабінету Міністрів України від 16 жовтня 2008 р. № 922 «Про затвердження тимчасових критеріїв безпеки поводження з генетично модифікованими організмами та провадження генетично-інженерної діяльності у замкненій системі».

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

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

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

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

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

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

Випробування генетично змінених рослин на біобезпеку здійснюють за наступними напрямками:

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

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

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

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

Питання для самоперевірки

1. У чому полягає сутність поняття «біологічна безпека»?
2. Сучасні джерела біологічної небезпеки.
3. Визначте місце біотехнології в питаннях біобезпеки.
4. Які міжнародні документи створюють нормативно-правову базу для сучасної біотехнології та біоінженерії?
5. Надайте дані щодо розширення посівних площ трансгенних культур у світі.
6. Які питання розглядає міжнародна Конвенція про біологічне різноманіття?
7. Законодавча база України з біобезпеки.
8. Назвіть основні принципи державної політики в галузі генетичноінженерної діяльності в Україні?
9. Розгляньте можливості і перспективи застосування генетично модифікованих організмів (ГМО) в Україні і у світі.
10. Чому сучасні технології створення ГМО слугують джерелом біологічних і екологічних ризиків?

16. Гібридомна технологія. Етапи процесу отримання гібридом. Отримання моноатів. Застосування моноатів. Імуноферментний аналіз

Для багатьох досліджень, що пов'язані з вивченням біологічних структур, високу цінність мають реагенти, що здатні специфічно взаємодіяти з даною структурою. Універсальним реагентом, що володіє вказаною властивістю, вважається імуноглобулін.

Імунна система вироблює специфічні антитіла на велику кількість антигенів. Основою цієї здатності є наявність різноманітних клонів лімфоцитів, кожен з яких вироблює антитіла одного типу з вузькою специфічністю.

При потраплянні в організм тварини або людини чужорідного агента – бактерій, вірусів, “чужих” клітин – лімфоцити мобілізуються для знешкодження агента, що був введений. Основна функція В-лімфоцитів полягає в створенні імунних білків (імуноглобулінів), що знешкоджують чужорідний агент шляхом зв'язування з його поверхневими ділянками (*антигенними детермінантами*), тобто В-лімфоцити вироблюють імунні білки, які є антитілами до чужорідних агентів – антигенів. Однак, розмноження клітин В-лімфоцитів в культурі не дало позитивних результатів із-за незначної продуктивності клітин та неможливості їх тривалого існування в поживних середовищах. Цю проблему можна вирішити за рахунок злиття В-лімфоцита з

пухлинною клітиною імунної системи – *мієломою*. Гібридна клітина, що створюється в результаті – *гібридома* – поєднує в собі здатність тривалого розмноження в культурі, як ракова клітина, із здатністю біосинтезу *моноклональних антитіл – моноатів*, як лімфоцитарна клітина. Моноклональні антитіла однорідні за своїми властивостями, володіють однаковою спорідненістю до антигену і зв'язуються з однією єдиною антигенною детермінантою.

Біотехнологія отримання моноклональних антитіл передбачає, з одного боку, гарантовану *елімінацію* (розчеплення, руйнування) пухлинних клітин, що не злилися, а також гібридів, що створилися в результаті злиття мієломних клітин. З іншого боку, серед отриманих гібридом ідентифікують ті клони, що синтезують антитіла певної специфічності. Культивують клон гібридомних клітин, що був відселекціонований, або у вигляді *асцитної пухлини*, коли гібридомну клітинну суспензію вводять мишам усередину очеревини, або у вигляді клітинної культури, яку постійно пересаджують на свіже поживне середовище для подовження росту і розмноженню отриманих гібридомних клітин. Титр моноклональних антитіл, що містяться в асцитній рідині, на 2-3 порядки вище їх кількості, що знаходиться у культуральному середовищі. Однак, отримання антитіл в умовах клітинної культури має суттєві переваги, що обумовлені більш простим виділенням антитіл з культурального середовища і наступним їх очищенням, а також більш сприятливими умовами для контролю процесу біосинтезу.

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

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

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

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

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

необмеженого росту і до синтезу нуклеотидів по запасних шляхах і тому накопичуються у культурі.

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

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

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

В наш час створені гібридами, в яких відбувається біосинтез моноклональних антитіл до антигенних детермінантів вірусу венесуельського енцефаломієліту коней, африканської чуми свиней, респіраторно-сінцитіального вірусу великої рогатої худоби, лейкозу, сказу, везикулярного стоматиту, грипу та до інших збудників. Ці моноати необхідні для з'ясування структури білкової поверхні вірусу (антигенної детермінанти) з метою визначення структури ділянки гену, що відповідає за синтез цієї частини оболонки. Виділення або синтез ділянки ДНК гену з подальшим внесенням її за допомогою вектору у клітини, наприклад, *E.coli*, клонуванням і вирощуванням на поживному середовищі надасть можливість отримати білки, які використовуються в якості вакцин. Оскільки ці білки – це білки оболонки вірусу, то вони не можуть викликати захворювань і більш безпечні при застосуванні, але дуже добре створюють імунну відповідь і імунітет в організмі тварини.

Імобілізовані моноклональні антитіла використовуються при очищенні таких біологічно активних речовин, як інсулін, інтерферон, соматотропін та інших, біосинтез яких заснований на використанні технології рекомбінантних ДНК. Пропонується можливість використання моноклональних антитіл для доставки ліків до клітини, що містить певну антигенну детермінанту. Цей підхід може збільшити ефективність лікарських препаратів не тільки проти інфекційних, але і проти ракових захворювань.

На основі моноатів розроблені перспективні методи діагностики: метод імуоферментного аналізу (ІФА) і метод молекулярної гібридизації (ММГ).

ІФА було розроблено в 70-х роках ХХ століття на перетині імунохімії та інженерної ензимології та являється еволюційним продовженням і альтернативою радіоімунному аналізу в послідовності серологічних методів діагностики.

ІФА – полягає в створенні кон'югата (сполуки) відомого антитіла і ферменту і наступного приєднання комплексної речовини до антигену. Обов'язковою умовою цього методу є іммобілізація антитіла або антигену на твердому носії за допомогою водневих зв'язків, гідрофобної або електростатичної взаємодії. З початку необхідно виявити існування антитіла до

певного антигену, або навпаки. Потім для визначення цього антигену в дослідному розчині (плазма або сироватка крові, травний сік та ін.) на твердий носій з іммобілізованим на ньому антитілом наносять розчин, що аналізується, через певний час носій промивають і наносять наступний розчин. В тому випадку, коли антиген, що розшукується, був присутній в дослідному розчині, він зв'язується з антитілом на носії і після промивання залишається. При обробці наступним реагентом відбувається реакція ферментативного розщеплення, яку можна спостерігати візуально, оскільки створюється кольоровий продукт реакції.

На сьогодні ІФА зайняв міцну позицію в діагностиці інфекційної патології людини, тварин та рослин, в онкології та ендокринології. Основними перевагами ІФА є:

- висока чутливість і специфічність;
- відтворюваність результатів;
- простота виконання;
- доступність та стабільність реагентів;
- гнучкість та можливість модифікації конструкцій;
- експресивність та можливість автоматизації для проведення масових аналізів.

Весь процес імуноферментного аналізу можна умовно поділити на три основні стадії:

- Формування специфічного комплексу антиген-антитіло.
- Введення в утворений комплекс мітки.
- Візуалізація мітки.

З точки зору способу виконання всі методи ІФА можна розділити на дві групи:

- системи, що не потребують розділення компонентів (гомогенні методи): якщо активність мічених молекул, які зв'язані з антитілами, суттєво відрізняється від активності вільних мічених молекул;
- системи, які потребують розділення (гетерогенні методи): отримують дві окремі фракції міченого ліганда – зв'язану з антитілами і вільну, а лише потім вимірюють активність зв'язаних мічених молекул (твердофазний імуноферментний аналіз, ТІФА).

В якості твердої фази в ТІФА використовують 96-лункові полістиролові планшети, які здатні сорбувати макромолекули. В кожній лунці планшету проводиться аналіз окремого зразку.

Основними компонентами твердофазного ІФА є: імуносорбент – адсорбовані на твердій фазі антигени або антитіла (залежно від цілей аналізу), імуноферментний кон'югат – ковалентно зшиті з ферментом специфічні антитіла або антигени та досліджуваний матеріал – біологічні рідини організму.

В якості антигенів можуть використовуватися очищені нативні антигени мікроорганізмів або їх аналоги – рекомбінантні білки та синтетичні пептиди.

В якості антитіл використовують поліклональні (пул специфічних антитіл, виділених з сироваток тварин) або моноклональні (моноспецифічні антитіла, отримані методами клітинної інженерії) антитіла.

Імуноферментні кон'югати – це ковалентно зшиті молекули антигенів або антитіл з ферментом. Одним із біологічних феноменів, на якому базується ІФА, являється висока каталітична активність ферментів, які використовуються в якості індикатора в ІФА.

Основними ферментними мітками є:

- пероксидаза хрому – фермент, що найчастіше використовується; містить вуглеводні залишки, що легко окиснюються періодатом, через які може відбуватися зв'язування ферменту з антитілами або антигеном
- лужна фосфатаза – дуже стабільний, але дорогий фермент
- β -D-галактозидаза – рідко використовується
- глюкооксидаза – рідко використовується

Питання для самоперевірки

1. Що таке гібридома? З яких клітин вона побудована?
2. В чому перевага моноклональних антитіл перед поліклональними сироватками?
3. Які клітини називають ауksотрофами? Чому мієломні клітини повинні бути ауksотрофами?
4. Що таке епітоп?
5. З яких етапів складається схема отримання гібридом?
6. Які гібридоми називають вторинними?
7. У чому полягає особливість моноатів подвійної специфічності?

17. Критерії відбору корів-донорів та реципієнтів ембріонів. Стадії розвитку ембріона. Оцінка якості ембріонів. Техніка і методи трансплантації ембріонів різних видів тварин

Нині трансплантація є ефективним методом створення високопродуктивних стад сільськогосподарських тварин. Використовуючи трансплантацію зигот від високопродуктивних корів протягом року можна одержувати понад 60 телят. У США цим методом одержують від 100 до 500 тисяч телят щорічно. Трансплантація ембріонів у тваринництві дозволяє підвищити рівень інтенсивності використання видатних маток, інтенсифікувати використання їх генетичного потенціалу, як штучне осіменіння забезпечує підвищення інтенсивності використання цінних плідників, їх генетичних ресурсів. Трансплантація ембріонів є біотехнічним методом інтенсифікації відтворення високопродуктивних тварин.

Метод трансплантації ембріонів дозволяє отримувати більшу кількість однорідного потомства від високопродуктивних тварин та цінних генотипів, швидко і широко розповсюджувати рідкісні та зникаючі породи, прискорено створювати високопродуктивні селекційні стада, інтенсифікувати розмноження маточного поголів'я шляхом пересадки зародків відомої статі, збільшувати вихід телят шляхом пересадки двох ембріонів з метою отримання близнюків,

створювати банк ембріонів і накопичувати генетичний матеріал з метою наступного транспортування і трансплантації у заплановані стада тощо.

Основні етапи проведення трансплантації ембріонів з метою одержання якнайбільше нащадків під однієї тварини такі: підбір донорів статевих клітин; суперовуляція; запліднення, виймання і оцінка ембріонів; культивування та зберігання ембріонів; пересадка ембріонів реципієнтам.

З погляду селекціонера *відбір донорів* – це цілеспрямований вибір корів, які характеризуються високими показниками молочної продуктивності. Але для біотехнолога такі особини повинні позитивно реагувати на гормональну обробку й давати біологічно повноцінні ембріони. Найважливішим критерієм при доборі є висока племінна цінність тварини. Критерій для корів молочних порід – 7-12 тис. кг молока в рік жирністю 3,6-4,3%.

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

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

Щодо *вибору реципієнтів*, яким трансплантують ембріони, одержані від донорів, використовують гінекологічно здорових корів після двох-трьох нормальних статевих циклів. При цьому їх племінні й породні якості вирішального значення не мають. Як правило, це телиці 16-18-місячного віку живою масою 360-380 кг.

Стимуляція суперовуляції. Самки ссавців народжуються з великою (кілька десятків і навіть сотень тисяч) кількістю статевих клітин. Більшість з них поступово гинуть. Однак, практично всі фолікули, що ростуть, реагують на гонадотропну стимуляцію, яка створює умови для їх дозрівання. Обробка самок гонадотропінами у фолікулярній фазі статевого циклу або в лютеїновій фазі циклу в сполученні з індукуванням регресії жовтого тіла простагландином Φ_2 (ПГ Φ_2) або його аналогами викликає численну овуляцію або так звану *суперовуляцію*.

Для стимуляції поліовуляції у корів поряд з сироваткою жеребних кобил (СЖК), тривалість впливу якої складає до 100 год., застосовують гіпофізарні гонадотропіни. З цією метою використовують очищений фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) окремо або разом з лютеїнізуючим гормоном (ЛГ). На відміну від СЖК препарати ФСГ і ЛГ вводять двічі на день протягом 4-5 діб.

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

У зв'язку з тим, що терміни овуляції гормонально оброблених тварин збільшуються, змінюється і технологія їх запліднення. Спочатку рекомендувалося багаторазове запліднення корів з використанням декількох доз сперми. Звичайно вводять 50 млн живих сперматозоїдів з початку охоти і через 12-20 годин осіменіння повторюють.

Можливі три способи *вилучення ембріонів* – після забою корови-донора, хірургічним і нехірургічним шляхом.

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

Вилучення ембріонів нехірургічним шляхом – найбільш поширений у практиці спосіб. Основна його перевага – це простота виконання. Ембріони вилучають переважно на 7-8-у добу після осіменіння донора.

В овець і свиней нехірургічне вилучення ембріонів неможливе внаслідок труднощів при проходженні катетера через шийку в роги матки. Однак, хірургічна операція для цих видів тварин відносно проста і нетривала.

Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для трансплантації. Тому їх необхідно *оцінити* за деякими морфологічними ознаками.

Морфологічну якість ембріонів визначають під мікроскопом при 100-160-кратному збільшенні. Встановлюють стадії їхнього розвитку (ранні та пізні морули і бластоцисти), а також оцінюють якість (відмінну, добру, задовільну). Розрізняють умовно придатні та непридатні до трансплантації ембріони. В промивальній рідині можуть виявитися і яйцеклітини, що свідчить про відсутність запліднення (табл. 1).

Морула – це скупчення бластомерів, які не завжди однакові за розмірами через асинхронність дроблення. Цитоплазма бластоцитів гомогенна, вони мають полігональний зв'язок. Перивітеліновий простір вільний від гранул і включень. Товщина прозорої оболонки 15 мк.

У ранньої бластоцисти (6,5-7 діб) добре видно бластопорожнину, реєструється диференціювання клітин на трофобластичні та ембріобластичні. Перивітеліновий простір вузький, а прозора оболонка має товщину 15 мк.

Пізня бластоциста (8 діб) відрізняється від ранньої тим, що вона має суцільні клітини трофобласта і велику порожнину, яка займає майже всю площу перивітелінового простору. Прозора оболонка витончена і розтягнута. З 9-го дня у бластоцист прозора оболонка відсутня і добре виражена порожнина.

Ембріони з частковою дегенерацією характеризуються несиметричним розміщенням і різними розмірами бластомерів. У бластомерів може виявитися частковий розпад, порушення зв'язку, відсутність ділення у двох або трьох.

Таблиця 1

Шкала оцінки якості морул і бластоцист

Стадія розвитку	Морфологічна характеристика	Оцінка	Бали
Морула рання (Мо I), Морула пізня (Мо II)	Округла форма, прозора оболонка ціла, перивітеліновий простір прозорий, бластомери чіткі, однакових розмірів з полігональним зв'язком, цитоплазма має дрібнозернистий вигляд, рівномірно заповнює цитоплазматичну оболонку.	Відмінно	5
	У перивітеліновому просторі є гранули, включення, бластомери неоднакових розмірів, розміщені не симетрично, дещо стиснуті.	Добре	4
	У перивітеліновому просторі – гранули, включення, незначне стискання бластомерів, руйнування окремих бластомерів, “частковий зародок.”	Задовільно	3
	Деформація прозорої оболонки, часткове руйнування бластомерів, порушення зв'язків між ними, фрагментація цитоплазми, стискування бластомерів.	Умовне придатні	2
	Невідповідність стадії розвитку, віку ембріона, дефекти прозорої оболонки (тріщини, відколки), розпад бластомерів, сильне їхнє стискування.	Не придатні	1
Бластоциста рання (Бл I), Пізня (Бл II)	Округла форма, прозора оболонка має однакову товщину на всьому протязі, перивітеліновий простір вузький, прозорий, чітко диференційовані клітини трофобласта і ембріобласта, з добре вираженою бластопорожниною.	Відмінно	5
	Зона пелюцида сплюснена, перивітеліновий простір відсутній, порожнина бластоцисти велика, має гладеньку поверхню, чітку диференціацію клітин.	Добре	4
	Порожнина бластоцисти не виражена, в перивітеліновому просторі – гранули, включення, клітини трофобласта дещо стиснуті. Перивітеліновий простір – збільшений, має включення, гранули; бластопорожнина не виражена, немає диференціації між клітинами трофобласта і ембріобласта.	Задовільно	3
	Дефект прозорої оболонки (тріщини), гранули, клітинні ферменти в перивітеліновому просторі, часткове руйнування клітин, стиснуті бластомери.	Умовно придатні	2
	Значний дефект прозорої оболонки, руйнування бластомерів.	Непридатні	1

У бластоцист часто реєструється збільшення об'єму перивітелінового простору, стискування бластопорожнини, частковий розпад клітин трофобласта. Прозора оболонка має невеликі тріщини. Такі ембріони умовно придатні до трансплантації.

Дегенеровані ембріони на 3-4 ділення дроблення відстають від нормального розвитку. Вони характеризуються розпадом бластомерів, зміщенням і фрагментацією цитоплазми, яка виявляється у перивітеліновому просторі. Прозора оболонка має значні дефекти: тріщини, розшарування, розриви. Такі ембріони вибраковують.

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

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

Уведення ембріонів в обидва роги матки забезпечує високу ефективність пересадження.

Нехірургічне пересадження ембріонів розроблене також для кобил. Висока ефективність нехірургічного пересадження ембріонів у коней була досягнута між 6-м і 8-м днями після овуляції.

У овець і свиней пересадження ембріонів проводять тільки хірургічним способом. У реципієнтів використовується аналогічний хірургічний підхід, як і в донорів. Ембріони пересаджують у яйцепровід або матку, залежно від стадії розвитку.

На 60-ту добу після пересадки ембріонів реципієнтів досліджують на тільність ректально. При правильному використанні метод нехірургічної пересадки забезпечує тільність у 50-60% реципієнтів. Деякі спеціалісти досягають 50-70% тільності при пересадці свіжоотриманих ембріонів.

Питання для самоперевірки

1. Перерахуйте основні етапи трансплантації ембріонів.
2. Які основні вимоги висуваються до корів-донорів ембріонів?
3. Які основні вимоги висуваються до корів-реципієнтів ембріонів?
4. Вкажіть препарати, за допомогою яких викликають суперовуляцію у корів. У чому полягає різниця їх застосування?
5. Які існують способи вилучення ембріонів?
6. Вкажіть показники, за якими здійснюють оцінку життєздатності вилучених ембріонів,
7. Які існують методи пересадки ембріонів?

18. Особливості заморожування-розморожування гамет і ембріонів. Оцінка життєздатності деконсервованих гамет і ембріонів

Для подовження життя спермійів, треба підвищити їхню життєздатність і сповільнити або загальмувати обмін речовин – перевести спермії в стан анабіозу.

Існує кілька способів зберігання сперми поза організмом:

- короткочасне зберігання сперми бугая, барана та жеребця при температурі 2-4°C;
- зберігання сперми бугая, барана і кнура за допомогою інактивації спермійів кислотами;
- зберігання сперми кнура в середовищах, що містять хелатон; тривале зберігання сперми бугая, барана і жеребця в рідкому азоті.

Тривалість зберігання сперми при температурі, близькій до 0°C, дуже обмежена. Запліднювальна здатність спермійів уже через 3, рідше через 4-5 діб різко зменшується. Короткий строк зберігання сперми зумовлює великі труднощі в роботі підприємств і пунктів.

Строк зберігання сперми і можна збільшити способом подальшого зниження температури. Для того, щоб уникнути негативних явищ, які призводять до загибелі спермійів, застосовують спеціальні способи обробки й охолодження сперми:

- розбавлення сперми спеціальними середовищами;
- короткочасне зберігання сперми перед заморожуванням;
- оптимальні режими заморожування;
- зберігання замороженої сперми при постійній низькій температурі;
- використання оптимального режиму розморожування сперми тощо.

Усі методи глибокого заморожування сперми передбачають попереднє повільне охолодження і зберігання її при температурі 2-4°C протягом 2-4 год. Цей технологічний прийом називається адаптацією спермійів (пристосування їх до низьких температур). При заморожуванні сперми велике значення має режим її охолодження. Нині застосовують два методи: швидкий і більш повільний. Перевагу надають першому. Знання основ заморожування сперми і зберігання її при дуже низьких температурах дає змогу уникнути помилок на всіх етапах її обробки й використання.

Нині широко застосовують метод тривалого зберігання сперми, замороженої в рідкому азоті (-196°C). Він є основним способом зберігання сперми бугаїв. Розроблені також технології заморожування сперми баранів і жеребців. Сперму бугаїв заморожують у формі необлицьованих гранул на фторопластовій пластині, у формі облицьованих гранул, у полімерних капілярах (соломинах, пайєтах) і в поліетиленових або скляних ампулах. Перші три способи широко поширені у виробничих умовах.

Глибоке заморожування або *кріоконсервація ембріонів* у рідкому азоті має велике практичне значення. При цьому немає необхідності утримувати велику кількість телиць-реципієнтів та синхронізувати у них охоту. Спрощується транспортування ембріонів на будь-які відстані та торгівля

цінним генетичним матеріалом, зникає необхідність у здійсненні карантинних заходів на кордоні, оскільки інфекційні хвороби не передаються через ембріони, не витрачається часу для адаптації тварини, яка була перевезена з іншої країни, тому що „адаптаційні процеси” відбуваються протягом розвитку трансплантованого ембріону під час вагітності тварини-реципієнту. Виникають умови для створення банків ембріонів в тому числі і для зберігання генофонду зникаючих видів тварин.

Для тривалого збереження ембріонів необхідно не тільки загальмувати їх розвиток, але і значно знизити або цілком зупинити обмінні процеси. Такий стан ембріонів досягається при температурі -195°C або нижче.

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

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

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

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

- зовнішні кріопротектори нездатні потрапляти у середину ембріону, але вони запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє у середину клітини, а внутрішній кріопротектор виходить назовні повільно, що викликає набухання і пошкодження ембріону. В якості зовнішніх кріопротекторів використовують поливінілпирролідон (ПВП), а в основному розчин сахарози.

Вітрифікація. Значним спрощенням процедури кріоконсервації ембріонів ссавців є метод вітрифікації, який є легким у застосуванні, швидким у виконанні, не потребує контролю зміни температур. Головною властивістю вітрифікаційної суміші є висока концентрація проникаючих (внутрішніх) кріопротекторів, які при низьких температурах стають желеподібними і в результаті застигають у склоподібній формі.

При цьому не утворюються кристали льоду, які є однією із головних проблем руйнування клітин в процесі кріоконсервації. Хоча одержані поза організмом ембріони великої рогатої худоби мають підвищену чутливість до заморожування-відтаювання, вітрифікація може забезпечити кращу виживаність, ніж програмне заморожування. Недоліком цього методу є токсичність кріопротекторів, що входять до вітрифікаційного розчину, внаслідок їх високих концентрацій під час еквілібрації, яка необхідна для проникнення кріопротектору в клітини і запобігання формування внутрішньоклітинного льоду. Порівнюючи токсичність різних внутрішніх кріопротекторів при дії на морули мишей, доведено, що етиленгліколь є

найменш токсичним (98% виживаності *in vitro*), більша токсичність спостерігалась для гліцерину -88%, для ДМСО – 68%, для пропіленгліколю – 16%.

Життєздатність деконсервованих гамет і ембріонів можна оцінити в період їх культивування у спеціальних середовищах (199, Хема-10, Дюльбекко) при температурі 37°C.

Ретельна морфологічна оцінка ембріонів перед заморожуванням має суттєвий вплив на їх життєздатність після розморожування. У ембріонів високої якості після розморожування відмічався вищий їх рівень приживлення. Так, у морул відмінної якості одержано 75,0 % тільності реципієнтів, доброї – 55,5 % і задовільної – лише 29,6%. Ембріони з морфологічною оцінкою «задовільні» недоцільно кріоконсервувати, оскільки після розморожування більша половина з них виявляються непридатними для пересадки. Такі ембріони економічно вигідно відразу після вимивання пересаджувати реципієнтам.

Питання для самоперевірки

1. Вкажіть показники, за якими здійснюють оцінку життєздатності деконсервованих ембріонів,
2. Які існують способи зберігання сперми поза організмом?
3. У чому полягає значення кріоконсервації ембріонів?
4. Для вирішення яких проблем при кріоконсервації ембріонів застосовують внутрішні та зовнішні кріопротектори?
5. У чому полягає особливість процесу вітрифікації при кріоконсервації ембріонів?
6. Які застосовують способи обробки й охолодження сперми?
7. Які можуть виникати пошкодження при заморожуванні ембріонів нижче 0°C?

19. Етапи процесу отримання ембріонів *in vitro*. Методи попереднього відбору гамет за статтю. Відбір ембріонів за статтю

Альтернативою суперовуляції у корів-донорів є методи культивування *in vitro*, що дозволяють отримувати значну кількість дешевих ембріонів. Методи дозрівання ооцитів і запліднення яйцеклітин сільськогосподарських тварин *in vitro* дають змогу отримувати зиготи та ембріони на різних стадіях їх розвитку (від 2-х клітинних до бластоцисти).

В Україні перші телята-трансплантанти з ембріонів, вирощених *in vitro* були одержані в результаті спільних досліджень науковців Інституту тваринництва НААН та Інституту розведення та генетики тварин НААН.

Технологія культивування ембріонів *in vitro* включає збір яєчників від вибракуваних корів при забої, їх перевезення в лабораторію, відбирання ооцитів, дозрівання, запліднення, забезпечення раннього розвитку в

спеціальних культурних середовищах, заморожування й створення банків цінних генотипів.

Однією із перспективних методик у скотарстві щодо ефективнішого використання величезного запасу гамет самок, закладеного в яєчниках, є багаторазова нехірургічна трансвагінальна аспірація незрілих ооцитів (OPU – ovum pick-up). Цей біотехнологічний метод має низку переваг, а саме дає можливість одержання ооцитів від нестатевозрілих телиць, починаючи з 5-6-місячного віку, що істотно скорочує генераційний інтервал, від так званих «проблемних донорів» – генетично цінних тварин, які з різних причин не можуть бути використані для відтворення та від тільних тварин без загрози втрати плода; він дешевший і має вищу повторюваність порівняно з суперовуляцією, дає можливість від однієї тварини-донора одержати в 4 рази більше придатних ембріонів для нехірургічної трансплантації.

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

У зв'язку з тим, що стероїдні гормони й інші фактори, що продукуються фолікулярними клітинами, впливають на дозрівання ооцитів, було зроблено припущення, що культивування ооцитів з фолікулярними клітинами може підвищити їх здатність до нормального запліднення і наступного ембріонального розвитку. Багато явищ усередині фолікула, включаючи біосинтез стероїдів і синтез білків, регулюють гонадотропні гормони. Тому при культивуванні ооцитів усередині фолікулів або з фолікулярними клітинами вони повинні бути обов'язковою складовою частиною середовища.

Важливим етапом у розробці методу запліднення *in vitro* в ссавців було відкриття явища капацитації спермійів. Термін *капацитация* означає, що в спермії повинні відбутися деякі фізіологічні зміни до того, як сперматозоїд набуде здатність до запліднення.

Капацитация включає початкову зміну мембрани спермія, що дозволяє йому пройти другу фазу (акросомну реакцію).

Розроблено кілька методів капацитації еякуйованих спермійів домашніх тварин. Для видалення білків з поверхні спермійів, які, очевидно, гальмують їх капацитацію, було використано:

- середовище з високою іонною силою;
- центрифугування,
- метод *swim-up*, що полягає у спливанні спермійів з активним поступальним рухом із дна пробірки у поверхневий шар чистого середовища і дозволяє відбирати найбільш життєздатні гамети,
- Іонофор A23187 є ефективним індуктором капацитації й акросомної реакції сперматозоїдів ссавців,
- фолікулярна рідина корів,
- розчин гепарину.

При проведенні досвідів по заплідненню *in vitro* велике значення має:

- концентрація сперматозоїдів під час запліднення, найбільша кількість пенетрованих ооцитів спостерігалось при концентрації $1 \cdot 10^6$ Сп/мол.

- тривалість спільної інкубації зі сперматозоїдами. Найвищий відсоток дроблення був отриманий після 24-годинного запліднення.

Пенетрація (проникнення через оболонку) яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них сперматозоїдів за допомогою заточеної мікропіпетки. Цей спосіб запліднення жіночих гамет, при якому капацитація й акросомна реакція сперматозоїдів не є необхідними, має ту перевагу, що дозволяє використовувати для запліднення не тільки нормальні, але і нерухомі, мертві, дефектні сперматозоїди або їх голівки.

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

Метод часткового розсічення прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів може бути використаний для подолання незапліднюваності яйцеклітин. Недоліком цього методу є явище поліспермії.

Культивування ембріонів in vitro. Для культивування зародків великої рогатої худоби застосовують різні середовища: Ham F-10, 199, Тирода та ін., до складу яких повинні входити енергетичні компоненти – піруват натрію, лактат натрію і глюкоза.

Однак численні експерименти показали, що культивування ембріонів великої рогатої худоби в культуральних середовищах, як правило, приводить до зупинки дроблення ембріонів на 8-16-клітинній стадії їх розвитку. Спроби удосконалення середовищ і методики культивування ранніх ембріонів, починаючи з одноклітинної стадії, не привели до рішення цієї проблеми.

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

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

Встановлено, що система моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів добре підходить для культивування розділених ембріонів великої рогатої худоби.

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

Диморфізм спермій самців, що містять різні статеві хромосоми, полягає в тому, що спермії з У-хромосомами мають меншу масу і величину. У ссавців розміри Х-хромосоми звичайно більші порівняно з розмірами У-хромосоми. Так, середній розмір Х-хромосоми великої рогатої худоби складає 6,17 мкм, а У-хромосоми – 2,22 мкм. На підставі цього були розроблені різні методи: центрифугування, седиментації (осадження), електрофорезу, фільтрації, цитофлуорометрії, імунологічні та ін.

Суперечливість результатів експериментів стосовно регулювання співвідношення статі у нащадків, заснованих на розділенні спермій по їх масі, пояснюється тим, що маса спермій характеризується значною варіабельністю і не має достатнього вірогідного зв'язку з Х- і У-хромосомами. В більшості випадків спермії з У-хромосомою були легшими за спермії з Х-хромосомою всього на 2-4%.

Використання лазера. Встановлено, що спермії з Х-хромосомами містять більше ДНК, ніж спермії з У-хромосомами, ця різниця для сперми кнурів складає 3,4%, бугаїв – 3,8%, баранів – 4,2%, а позитивні або негативні заряди клітин залежать від кількості ДНК. При використанні лазера спермії спочатку проходили флуоресцентну обробку, після чого їх пропускали через лазерний промінь і під впливом негативно і позитивно заряджених пластин вони відхилялися у відповідний бік.

З розвитком методів трансплантації і клонування ембріонів все більшого значення набуває *попередній відбір ембріонів за статтю* і особливостями каріотипу.

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

У наш час статі ембріонів великої рогатої худоби, які знаходяться на стадії доімплантаційного розвитку, визначають за допомогою цитогенетичного і імунологічного методів.

Імунологічні методи. Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією НУ-антигена за допомогою антитіл до НУ. Використовують наступні методи:

- культивування клітин ембріонів у середовищі з комплементом, що приводить до лізису клітин ембріонів чоловічої статі;
- одержання і використання вторинних флуоресцентних антитіл до антигена НУ;

- створення специфічного для ДНК Y-хромосоми молекулярного зонда;
- культивування *in vitro* 2-5 клітин компактизованих ембріонів. Цей метод заснований на тому, що у спеціальному середовищі клітини ембріонів чоловічої статі, на відміну від ембріонів жіночої статі, добре розмножуються, що дозволяє вже через 3 години після початку аналізу зробити висновок про стать ембріона. Ефективність цього методу складає 90-95%;
- застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що забезпечує ампліфікацію специфічних повторюваних послідовностей ДНК Y-хромосоми. ПЛР дозволяє по єдиному бластомеру, взятому шляхом біопсії, встановити стать доімплантаційного ембріона з дуже високою точністю (95,4%).

Питання для самоперевірки

1. Які методи капацитації еякулованих сперміїв існують?
2. Якими методами може бути полегшена пенетрація яйцеклітин?
3. Що таке поліспермія, коли вона виникає?
4. Які існують методи культивування ембріонів *in vitro*?
5. Які існують методи попереднього відбору гамет за статтю?
6. На чому засновані імунологічні методи визначення статі?

20. Ембріональне клонування тварин. Клітини-донори ядер для ембріонального клонування. Особливості соматичного клонування тварин

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

Клонування ембріонів шляхом пересадження ядра включає три основних етапи: отримання клітин-реципієнтів, виділення інтактного ядра донора, пересадження ядра в енукейовану яйцеклітину. На відміну від амфібій, пересадження ядра в ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібний четвертий етап – активація ооциту і злиття мембран ядра й ооциту. Під дією електричного імпульсу відбувається активація ооциту і злиття мембран між ядром клітини донора і енукейованим ооцитом-реципієнтом.

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для

отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

Технологія *отримання клітин-реципієнтів* полягає у наступному: після розрізу скляною голкою прозорої оболонки дозрілих до метафази II незапліднених яйцеклітин в ділянці полярного тільця, ооцити поміщали в розчин з цитохалазином. Приблизно через годину експозиції в середовищі з цитохалазином В полярне тільце з прилягаючою ділянкою ооплазми видаляли всмоктуванням за допомогою піпетки для мікроманіпуляцій.

Для полегшення *введення бластомерів* у перивітеліновий простір ооцитів жіночі гамети можна попередньо поміщати в гіпертонічне середовище.

Уведення ядра або пронуклеусу під прозору оболонку в перивітеліновий простір, як правило, не приводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму.

Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можна здійснювати серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко змінні залежно від бажання експериментатора параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

Додатковим джерелом ядер можуть стати ембріональні стовбурові клітини (ЕС-клітини). Модифіковані ембріональні стовбурові клітини виділені з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферуватися (проліферація – ріст і розмноження) в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь-які типи клітин, в тому числі і в клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти. Такі клітини називаються плюрипотентними ембріональними стовбуровими клітинами. У ЕС-клітини в культурі можна ввести цільові трансгени різними методами (трансфекція, електропорація, ретровірусна інфекція і т.і.) без порушення їх плюрипотентності.

ЕС-клітини мають нормальний каріотип, лінії цих клітин можна зберігати в недиференційованому стані в культурі від 3-х місяців до року, заморожувати і відтаювати кілька разів без істотного зниження їх здатності до розвитку. Оскільки ЕС-клітини можна генетично трансформувати, з їх допомогою можливе створення трансгенних тварин.

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

пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріона (2-4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо.

Виникає проблема активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому випадку, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто, певною мірою, схожа на ембріональну клітину.

Питання для самоперевірки

1. Які розрізняють сфери застосування клонування?
2. Які існують типи клонування тварин?
3. Вкажіть основні етапи клонування ембріонів шляхом пересадження ядра.
4. Які клітини використовують в якості клітин-реципієнтів ядер?
5. Чому для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи?
6. Які фузогени використовують для злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи?
7. У чому полягають переваги використання ЕС-клітин в якості донорів ядер?
8. Проблеми, що виникають при соматичному клонуванні.

21. Методи отримання монозиготних близнюків. Оцінка якості половинок і чвертей ембріонів

Одним із перспективних прийомів клітинної інженерії у тваринництві є отримання генетично ідентичних близнюків. Ідентичні або монозиготні, близнюки, отримані з однієї заплідненої яйцеклітини – зиготи, мають однаковий генотип.

Одержання однойцевих близнюків має велике значення для тваринництва:

- збільшується вихід телят від одного донора,
- з'являються генетично ідентичні двійні,
- полегшується оцінка бугаїв за якістю нащадків,
- зменшується вартість спермопродукції,
- генетично ідентичні копії ембріонів і телят можна успішно застосовувати у дослідженнях з вивчення взаємодії «генотип-середовище»,
- використання монозиготних близнюків для оцінки м'ясних якостей шляхом забою одного близнюка і переносу отриманих даних на іншого,
- після розподілу ембріона одну половинку можна кріоконсервувати, а іншу – пересадити реципієнтові. При позитивних результатах оцінки отриманих

нащадків половинку, що залишилася, можна буде використовувати у селекційному процесі.

У практиці використовують два способи розділення ембріонів – перев'язуванням і розрізанням. У першому випадку зародки відбирають за допомогою мікроманіпулятора, не порушуючи прозорої оболонки, потім перев'язують їх синтетичною ниткою діаметром 15 мкм посередині. Розподілені половини окремо дробляться, утворюючи зародки.

Ембріони також розрізають скляною мікроголкою діаметром 10-15 мкм навпіл або на більшу кількість частин.

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

Після розподілу ембріона на дві частини одержані половинки переносять у термостат і культивують протягом 3-х год. Якщо за цей час половинки зародків *компактизувалися* (набули кулькоподібну форму), їх пересаджують реципієнтам без попереднього внесення у *зону пелюціда* (прозора оболонка, що вкриває ооцит, на поверхні якої розташовані рецептори для розпізнавання сперміями; після запліднення сприяє процесу прикріплення ембріона у статевих шляхах самки).

Нещодавно розроблено новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що розширюється, (поблизу від внутрішньоклітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася.

Дослідженнями встановлено, що для розподілу ембріонів найбільш придатні пізні морули і ранні бластоцисти або бластоцисти, що розширюються. Ембріони даних стадій розвитку вимивають із рогів матки на 6-8-у добу після запліднення донорів.

При визначенні якості половинок враховують їх розміри, ступінь компактизації і формування бластоцілі.

1. До відмінних половинок відносять рівні за розмірами частини ($1/2 + 1/2$) і половинки, що мають великі розміри ($2/3$, $3/4$), що цілком компактизувалися протягом 30-хвилинного культивування. Через 3 години культивування такі половинки мали виражену бластоціль.

2. У гарних половинок також є бластоціль, але вони незначно відрізняються своїми розмірами ($<1/2$) і мають ще не цілком округлу форму.

3. Задовільні половинки значно відрізняються за своїми розмірами ($1/3$, $1/4$), характеризуються слабо вираженою компактизацією і відсутністю бластоцілі.

4. Дегенеровані половинки не компактизуються, мають багато зруйнованих клітин і виглядають пухкими через руйнування міжклітинних зв'язків між бластомерами.

Отримані дані свідчать, що у порівнянні з пересадженням цілих ембріонів, трансплантація свіжоотриманих половинок сприяє збільшенню кількості народжених телят на 40-60%.

Для одержання четвертинок ембріонів компактизовані половинки поділяють ще раз на дві частини.

Після оцінки стану четвертинки ембріонів, які визнані придатними для подальшого розвитку, пересаджують до порожніх зон пелюціда.

Як показали дослідження, наявність прозорої оболонки не є необхідною для подальшого розвитку половинок пізньої морули або бластоцисти. Значення прозорої оболонки для подальшого розвитку розділеного ембріона зростає при трансплантації чверті ембріона.

Важлива роль прозорої оболонки відзначена в дослідях, що продемонстрували можливість кріоконсервування половинок 7-денних ембріонів великої рогатої худоби. Половинки пізніх морул або бластоцист великої рогатої худоби, кріоконсервованих без оболонки, були непридатні для пересадження. Пересадження заморожено-відтаяних половинок відмінної і гарної якості, що знаходилися в одній оболонці, індукувало тільність у 25,0% реципієнтів, поміщення ж половинок у додаткову прозору оболонку бластоцист, що вилупилися, призвело до тільності 46,2% реципієнтів. Таким чином, поміщення напівембріонів у додаткову оболонку є ефективним методом збереження їхньої життєздатності при кріоконсервуванні.

Питання для самоперевірки

1. У чому полягає значення для тваринництва одержання однойцевих близнюків?
2. Які способи розділення ембріонів використовують?
3. Які показники враховують при визначенні якості половинок ембріонів?
4. У чому полягає роль прозорої оболонки?
5. У чому полягає перевага технології нехірургічної трансвагінальної аспірації незрілих ооцитів (OPU – ovum pick-up)?
6. Які методи капацитації еякуйованих спермій існують?
7. Якими методами може бути полегшена penetрація яйцеклітин?
8. Що таке поліспермія, коли вона виникає?

22. Методи створення партеногенетичних організмів. Методи створення експериментальних химер

Партеногенез (Parthenogenesis – від грец. Parthenos – дівчина, незаймана + genesis-зародження) – форма статевого розмноження, при якому розвиток організму відбувається з жіночої статевої клітини (яйцеклітини) без запліднення її чоловічою (сперматозоїд).

Партеногенез слід відрізнити від безстатевого розмноження, коли розвиток відбувається не зі статевих клітин, а із соматичних клітин або органів поділом, брунькуванням.

Це статеве, але одностатеве розмноження, яке виникло у процесі еволюції організмів у роздільностатевих форм. У тих випадках, коли партеногенетичні види представлені лише самками, одна з головних біологічних переваг партеногенезу полягає у прискоренні темпу розмноження виду, оскільки всі особини подібних видів здатні залишити потомство. У разі якщо із запліднених яйцеклітин розвивається самка, а з незапліднених – самець, партеногенез сприяє регуляції чисельності і співвідношення статей (наприклад, у бджіл партеногенетично розвиваються самці – трутні, а з запліднених – самки – матки і робочі бджоли).

Партеногенез – природний нормальний спосіб розмноження деяких видів тварин і рослин. Повний природний партеногенез зустрічається у безхребетних тварин усіх типів, але найчастіше – членистоногих. З хребетних це – риби деяких видів, амфібії, рептилії, окремі види птахів (індички) розмножуються партеногенетично. У ссавців відомі тільки випадки зародкового партеногенезу.

У біології розмноження тварин розмежовують два різновиди партеногенезу – гіногенез і андрогенез. При *гіногенезі* спермій проникає в яйцеклітину, але функція його полягає лише в її активації, ембріон же розвивається без участі хромосом спермія.

При *андрогенезі*, на відміну від справжнього партеногенезу, після активації жіночої гаметі спермієм весь генетичний матеріал заплідненої яйцеклітини елімінується, і тому ембріон містить лише батьківський набір хромосом. У цьому випадку зигота, а потім і ембріон розвиваються тільки за участю набору хромосом чоловічого ядра.

У сучасній науковій літературі тварин, отриманих за рахунок партеногенезу, називають *партеногенами*.

На базі сучасної біотехнології можуть бути розроблені ефективні методи, що викликають штучний партеногенез шляхом стимуляції партеногенетичного розвитку яйцеклітини. Як стимулятори використовують механічні, фізичні, хімічні й біологічні фактори.

У теперішній час випробувано багато агентів, здатних активувати яйцеклітини ссавців до партеногенетичного розвитку. Використовують механічні впливи, тепловий, електричний або осмотичний шок, ферменти (гіалуронідаза, трипсин, проназа), двовалентні катіони, антисептики (етанол, дибукаїн, тетракаїн, лигнокаїн, прокаїн), фенотіазинові транквілізатори, інгібітори синтезу білків.

Шляхом аналізу динаміки розвитку партеногенетичних зародків було виявлено, що вже на самих ранніх стадіях ембріогенезу партеногени розвиваються слабкіше, ніж запліднені яйцеклітини. Ця різниця зростає й далі аж до імплантації. Причому така закономірність характерна для всіх типів партеногенетичних зародків.

Класичні досліди М. Сурані зі співавторами, проведені на мишах, показали, що ні подвійна доза материнських генів (гіногенетичні ембріони), ні подвійна доза батьківських генів (андрогенетичні ембріони), ні наявність у ембріоні диплоїдних одноматеринських і одnobатьківських клітин не достатні

для нормального ембріонального розвитку, що для завершення ембріогенезу клітина повинна мати і материнські, і батьківські хромосоми.

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

Поняття *химера* (гречок. *Chimaira*) означає складена тварина. У сучасному розумінні термін химера використовується головним чином при одержанні складених організмів, у яких генетично різні клітинні популяції походять більше, ніж від однієї зиготи або зародка.

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

В останні роки велика увага приділяється одержанню міжвидових і міжпородних химер ссавців. Це особливо важливо в селекції сільськогосподарських тварин, тому що міжвидові або міжпородні химери в одному організмі можуть поєднувати різні господарсько важливі ознаки.

Всі дотепер відомі в науці експериментальні химери ссавців створені методами агрегації двох (або більше) генотипове різнорідних зародків або шляхом мікроін'єкції клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоціль ембріона-реципієнта. Перший метод отримав назву агрегаційний, другий – ін'єкційний.

Агрегаційний метод. Сутність методу полягає в наступному. Два ембріони, що розрізняються генотипами, на стадії 8-12 бластомерів оброблюють протеолітичним ферментом проназою, звільняють від зони пелюціда й зближають один з одним у культуральному середовищі. З'єднані ембріони культивують протягом 24-48 год. до завершення агрегації, тобто до утворення бластоцисти. Отримані таким чином химерні ембріони трансплантують реципієнтній самці. Агрегаційні химери можна одержувати не тільки між двома ембріонами, але й між різним числом ізольованих бластомерів

або окремими частинами ембріонів. Перевага агрегаційного методу полягає в тому, що він не вимагає втручання мікрохірургічної техніки, що дозволяє широко застосовувати його в ембріогенетиці.

Ін'єкційний метод вимагає застосування мікроманіпуляційної техніки й мікрохірургічного втручання. При ін'єкційному методі використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Бластоцисту утримують всмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікроманіпулятори, у трофобласті шляхом проколів голками зони пелюціда роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Цим методом можна ін'єктувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, але й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують самці-реципієнтови. Ін'єкційний метод знайшов застосування при одержанні міжвидових химер.

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

Метод одержання експериментальних химер становить великий інтерес для створення ліній (клонів) тварин шляхом партеногенезу. Ембріони ссавців, що розвиваються з партеногенетично активованих яйцеклітин, як показано, гинуть. Однак, при агрегації з біологічно повноцінними ембріонами, клітини ранніх партеногенетичних зародків впливають на побудову тканин химерної тварини. Якщо з партеногенетичних клонів клітин будуть формуватися гамети химерної особини, то її генотип можна закріпити в наступному поколінні. Гаплоїдний набір не достатній для проліферації клітин, тому виживають тільки диплоїдизовані клітини. Становить інтерес вивчення можливості клонування тварин-донорів ооцитів шляхом трансплантації реципієнтам химерних зародків, що складаються з клітин звичайних і партеногенетичних ембріонів. Такий химерний ембріон може бути отриманий методами мікроманіпуляцій шляхом заміни клітин ВКМ звичайної бластоцисти на ВКМ бластоцисти партеногенетичного походження, тобто химерна бластоциста буде складатися з клітин ТЕ звичайної бластоцисти і ВКМ бластоцисти-партеногенона. Присутність батьківських хромосом у трофектодермі химерної бластоцисти, імовірно, забезпечить імплантацію і формування позазародкових тканин, що дозволяє здійснити розвиток ембріона з генотипом партеногенона.

Важливою особливістю химерних ембріонів є їх здатність підтримувати життєздатність клітин зародків летальних генотипів. Наприклад, химери, отримані від нормальних і нежиттєздатних зародків-трисомиків по хромосомах 17, 15 і 12, нормально розвивалися і давали нащадків, що не мають трисомиків.

Нові можливості в селекції тварин відкриваються з використанням у дослідках по одержанню трансгенних тварин бластоцист, у порожнину яких ін'єктовані генетично трансформовані ембріональні стовбурові клітини. Пересадження таких химерних бластоцист може привести до народження химерних тварин, у яких частина клітин різних органів, у тому числі гонад, буде походити від ембріональних стовбурових клітин. В останньому випадку частина нащадків може виявитися трансгенною. Вважається, що такий метод одержання трансгенних тварин є більш ефективним, ніж ін'єкція чДНК (чужорідної ДНК) у чоловічий пронуклеус, тому що дозволяє оцінити трансформацію генома ЕС-клітин до їх уведення в ембріон.

Питання для самоперевірки

1. Чим відрізняється андрогенез від справжнього партеногенезу?
2. Яким тваринам властивий природний партеногенез?
3. Які агенти здатні активувати яйцеклітини ссавців до партеногенетичного розвитку?
4. Чому гинуть партеногенетичні ембріони ссавців?
5. Які існують способи створення химер?
6. У чому полягає особливість трансплантації химерних ембріонів, отриманих ін'єкційним шляхом?
7. Яким чином створення химерних ембріонів може покращити процес отримання трансгенних тварин?

Список використаної літератури

1. Аппель Б., Бенекс Б.-И., Бененсон Я. Нуклеиновые кислоты: от А до Я. М. : Бином, 2013.
2. Біотехнологія: підруч. [Герасименко В. Г. та ін.] – К. : Фірма «ІНКООС», 2006. – 647 с.
3. Генетика з основами розведення та відтворення сільськогосподарських тварин / навчально-методичний посібник // С. Л. Войтенко, О.О. Васильєва, Л.В.Вишневський, Б.С.Шаферівський – Полтава : ПП Астроя., 2018 – 213 с.
4. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М. : Мир, 2002.

5. Грегірчак Н. М., Антонюк М. М. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології : Конспект лекцій для студ. спец. «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. 59 с.
6. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А.. Биотехнология: теория и практика. М.: ОНИКС, 2009.
7. Зиновьева Н. А., Волкова Н. А., Багиров В. А. Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы. Экологическая генетика. – 2015. т. XIII, № 2. – С. 58-76.
8. Ковтун С.І. Методичні рекомендації з кріоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro* / Ковтун С.І. [та ін.]. – Чубинське, 2015. – 17 с.
9. Лукашов В. В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М. : Бином, 2009.
10. Льюин Б. Гены // М.: Бином, 2011.
11. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Том 1-3. М. : Бином. 2012-2015.
12. Оценка качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота : учеб.-метод. пособие. [Голубец Л. В. и др.] – Гродно : ГГАУ, 2011 – 68 с.
13. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник – 2-е вид., доп. і перероб. – К. : НУХТ, 2010. – 632 с.
14. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
15. Пономарьов П. Х., Донцова І. В. Генетично модифікована продовольча сировина і харчові продукти, вироблені з її використанням. – К. : Центр учбової літератури, 2009. – 124,с.
16. Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів : Закон України від 31 травня 2007 р. // Відомості Верховної Ради України. – 2007. № 35. – Ст.484.
17. Тиного И., Зауэр К., Вэнг Дж., Пачлиси Дж. Физическая химия. Принципы и применение в биотехнологических науках. М. : Техносфера, 2005.
18. Товарознавство. Харчові продукти з генетично модифікованої сировини : навч. посібник / А. А. Дубініна [та ін.]. – Х. : ХДУХТ, 2015. –267 с.
19. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. М.: Бином, 2013.
20. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. // М.: Бином. 2011.
21. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология. – М. : Высш. шк., 2003. – 470 с.
22. Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. (пер. с нем.). – М. : БИНОМ. Лаб. знаний, 2014. – 324 с.
23. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособ. – 2-е изд. испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. унив., 2004. – 496 с.
24. Эрнст Л. К., Зиновьева Н. А., Брем Г. Современное состояние и перспективы использования трансгенных технологий в животноводстве – М. :

РАСХН, 2002. – 341 с.

25. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладачі:

Горбатенко Ігор Юрійович

Юлевич Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.6,75

Тираж 30 прим. Зам.№ _____

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

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

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