

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ФАКУЛЬТЕТ ТВПІТСБ

Кафедра біотехнології та біоінженерії

МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Курс лекцій

для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти ОПП
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності G21 «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти

Миколаїв

2025

УДК 577.2:60
M75

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПІТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 26.11.2025 р., протокол № 3

Укладачі:

О. І. Каратєєва – канд. с.-г. наук, доцентка, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

С. І. Луговий – д-р с.-г. наук, професор, завідувач кафедри виробництва продукції тваринництва, Миколаївський національний аграрний університет

М.І. Федорчук – д-р с.-г. наук, професор, завідувач кафедри ґрунтознавства та агрохімії, Миколаївський національний аграрний університет.

Молекулярна біотехнологія : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «магістр» спеціальності G21 “Біотехнологія та біоінженерія” денної форми навчання / уклад. : О. І. Каратєєва. – Миколаїв : МНАУ, 2025. – 167 с.

У курсі лекцій викладено зміст дисципліни «Молекулярна біотехнологія» – науки яка вивчає перенесення одиниць спадковості (генів) з одного організму в інший, здійснюваний методами генної інженерії (технологія рекомбінантних ДНК). У більшості випадків метою такого перенесення є створення нового продукту або отримання вже відомого продукту в промислових масштабах. Більш формально молекулярна біотехнологія визначається як застосування наукових і інженерних принципів для переробки матеріалів живими організмами з метою створення товарів і послуг.

УДК 577.2:60

© Миколаївський національний
аграрний університет, 2025
© Каратєєва О.І., 2025

Зміст

Тема 1. Вступ до предмету	4
Тема 2. Принципи і інструменти генетичної інженерії	12
Тема 3. Клонування генів	35
Тема 4. Створення та скринінг клонотек. Характеристика продуктів клонування	44
Тема 5. Оптимізація експресії генів, клонованих у прокаріотичних системах	59
Тема 6. Отримання рекомбінантних білків за допомогою еукаріотичних систем	66
Тема 7. Точковий мутагенез та генна інженерія білків	71
Тема 8. Клітинна інженерія рослин	81
Тема 9. Клітинна інженерія тварин	94
Тема 10. Конструювання і застосування генно-модифікованих мікроорганізмів	106
Тема 11. Створення і використання генетично-модифікованих рослин	126
Тема 12. Створення трансгенних тварин та їх використання	138
Тема 13. Контроль досліджень у галузі молекулярної біології	155
Список використаної літератури	165

Змістовий модуль 1: Молекулярна біотехнологія – сучасний стан розвитку дисципліни

Лекція 1. Вступ до предмету

- 1. Історія та напрями розвитку молекулярної біотехнології**
- 2. Перспективи застосування та методи молекулярної біотехнології та генної інженерії**
- 3. Характеристика біотехнологічних процесів**

1) Історія та напрями розвитку молекулярної біотехнології. Початок розвитку біотехнології приписують відкриттю середини 19 сторіччя: Луї Пастер розкрив мікробну природу бродіння, довів можливість життя у безкисневих умовах, експериментально спростував уявлення про самовільне зародження живих істот, створив наукові основи вакцинопрофілактики і вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації – пастеризацію.

Сам термін «біотехнологія» запропонував угорський інженер Карл Ерек (1917), коли описували виробництво свинини (кінцевий продукт) з впровадженням цукрових буряків (сировина) в якості корму для свиней (біотрансформація). Під біотехнологіями К. Ерек розумів «всі види робіт, при яких із сировинних матеріалів за допомогою живих організмів виробляються ті чи інші продукти».

Біотехнологія – наука про використання живих організмів, біологічних процесів і систем у виробництві, включаючи перетворення різних видів сировини в продукти. Основні досягнення біотехнології: мікробіологічна промисловість; клінічна та ветеринарна медицина; харчова промисловість; поліпшення екологічного стану планети; боротьба з шкідниками сільського господарства; виготовлення біопрепаратів: амінокислот, антибіотиків, білків, вітамінів, ліпідів, нуклеїнових кислот, пігментів, ферментів; утилізація відходів і т.д.

Основні віхи розвитку молекулярної біотехнології та генної інженерії представлені в таблиці 1.

Історія розвитку молекулярної біотехнології та генної інженерії

Дата	Подія
1917	Карл Ерек ввів термін «біотехнологія»
1943	Зроблено пеніцилін в промисловому масштабі
1944	Евері, Мак Леод і Мак Карті показали, що генетичний матеріал являє собою ДНК
1953	Уотсон і Крик визначили структуру молекули ДНК
1961	Засновано журнал «Biotechnology and Bioengineering»
1966	Розшифровано генетичний код
1970	Виділена перша ендонуклеаза для рестрикції
1972	Коран та ін синтезували повнорозмірний ген тРНК
1973	Бойєр і Коєн поклали початок технології рекомбінантних ДНК
1975	Колер і Мільштейн описали отримання моноклональних антитіл
1976	Розроблено методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК
1978	Фірма «Genetech» випустила людський інсулін, отриманий за допомогою <i>E.coli</i>
1980	Верховний суд США, слухаючи справу Даймонд проти Чакрабарті, виніс вердикт, що мікроорганізми, отримані генно-інженерними методами, можуть бути запатентовані
1981	Дозволений до застосування в США перший діагностичний набір моноклональних антитіл
1982	Дозволена до застосування в Європі перша вакцина для тварин, отримана за технологією рекомбінантних ДНК
1983	Для трансформації рослин застосовані гібридні Ті -плазмідні
1988	Виданий патент США на лінію мишей з підвищеною частотою виникнення пухлин, отриману генно - інженерними методами
1988	Створено метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)
1990	У США затверджено план випробувань генної терапії з використанням соматичних клітин людини
1990	Офіційно розпочато роботи над проектом «Геном людини»
1995	Опубліковані докладні генетичні та фізичні карти хромосом людини
1996	Щорічний обсяг продажів першого рекомбінантного білка (еритропоєтину) перевищив 1 млрд. доларів
1996	Визначено нуклеотидну послідовність всіх хромосом еукаріотичного мікроорганізму
1997	Клоновано ссавець з диференційованої соматичної клітини

За визначенням академіка Ю.А. Овчинникова, **біотехнологія** – комплексна, багатопрофільна область науково-технічного прогресу, що включає різноманітний мікробіологічний синтез, генетичну і клітинну інженерну ензимологію, використання знань, умов і послідовності дії білкових ферментів в організмі рослин, тварин і людини, в промислових реакторах.

Також до біотехнології відноситься трансплантація ембріонів, отримання трансгенних організмів, клонування.

У 1978 р співробітники фірми «Genetech» (США) вперше виділив послідовності ДНК, що кодують інсулін людини, і перенесли їх в клонуючі вектори, здатні реплікуватися в клітинах *Escherichia coli*. Цей препарат міг вживатися хворими на діабет, в яких спостерігалася алергічна реакція на інсулін свині.

В подальшому, у молекулярно-генетичних дослідженнях, для полегшення маніпуляцій та підвищення достовірності отриманих результатів було введено методику маркування. Для маркування використовували ген GFP, виділений з медузи. Цей ген забезпечує синтез флуоресцентного білка, що світиться в темряві.

Сучасна молекулярна біотехнологія включає кілька ключових напрямів. Генетична трансформація передбачає перенесення природних або штучних донорських генів у клітини-реципієнти рослин, тварин і мікроорганізмів для отримання трансгенних організмів із новими властивостями. Клітинна інженерія використовує технології для отримання модифікованих клітин із мутагенними властивостями. Генетична інженерія займається отриманням рекомбінантних РНК і ДНК, виділенням генів і маніпуляціями з ними для введення в інші організми. Рекомбінантна ДНК складається з ділянок різних молекул ДНК. Імунологічна біотехнологія фокусується на розпізнанні та виділенні клітин захисної системи організму та отриманні препаратів, що синтезують ці клітини. Протеїнова інженерія змінює властивості природних білків на генетичному рівні для створення нових білків. Біоелектроніка використовує біосенсиори для вимірювання та контролю

в промисловості, медицині та наукових дослідженнях. Біоенергетика досліджує перетворення енергії в живих організмах.

Промислова мікробіологія використовує мікроорганізми для синтезу кормових білків, ферментів, антибіотиків та інших біологічно активних речовин, а також для очищення стічних вод, боротьби зі шкідниками та вилучення металів. Клітинна інженерія дозволяє вирощувати клітини поза організмом в живильних середовищах, що зберігають властивості виду, та використовувати їх для клонування. Клонування отримує ідентичних нащадків шляхом нестатевого розмноження, що важливо для сільського господарства і медицини, зокрема для трансплантації органів і тканин. Ембріональна інженерія займається штучними змінами організмів під час зародкового розвитку. Генетична інженерія передає генетичний матеріал від одного організму до іншого для отримання нової генетичної інформації, управління спадковістю, клонування генів та отримання генних продуктів.

Успіхи у використанні індукованого мутагенезу та селекції для поліпшення штамів-продуцентів при виробництві антибіотиків і т.д. набули більшого значення з впровадженням методів молекулярної біотехнології.

2) Перспективи застосування та методи молекулярної біотехнології та генної інженерії. Перспективи застосування молекулярної біотехнології та генної інженерії для вдосконалення штамів мікроорганізмів сьогодні здаються практично необмеженими. Безумовно, буде розвиватися такий напрямок, як створення штамів-продуцентів білків людини, сільськогосподарських тварин і рослин. Близькі до завершення роботи по створенню мікробіологічної технології виробництва реніну (ферменту сичуга телят), використовуваного в сироварінні, солодкого білка – тау-Матина (~ в 3000 разів солодше цукру) та інших продуктів. Ведуться роботи по вдосконаленню штамів дріжджів, що використовуються в харчовій промисловості, зокрема, в пивоварінні і виноробстві. Вдосконалення організмів полягає в можливості забезпечити засвоєння пентоз, руйнування фенольних сполук, конкурентоспроможність при зростанні в нестерильних

умовах.

Розпочато роботи в напрямку розвитку процесу переробки крохмалю в етиловий спирт за допомогою бактерій, що значно прискорює і здешевлює його виробництво.

Біотехнології використовують специфічні методи, зокрема масштабне культивування біооб'єктів у періодичному, напівбезперервному або безперервному режимі та вирощування клітин рослин і тварин в особливих умовах. Біооб'єкти культивуються у ферментерах, де вирощують бактерії, гриби для отримання антибіотиків, ферментів, органічних кислот і вітамінів. У ферментерах також вирощують клітини людини (бласти) для отримання інтерферону і деякі рослинні клітини, які частіше вирощують у стаціонарних умовах на середовищах з ущільненою підкладкою.

Методи біотехнології перетинаються з методами мікробіології, біохімії, органічної хімії, особливо з методами клітинної і генетичної інженерії. Відмінністю біотехнологічних методів є необхідність виконання їх в асептичних умовах для запобігання контамінації патогенними мікроорганізмами.

Проблематика досліджень здебільшого полягає не в методології досліджень, а неповному знанні біохімічних шляхів синтезу того чи іншого з'єднання, а також недостатній рівень досліджень генетики багатьох промислових штамів. Саме тому цим методом досі не створено жоден штам-продуцент антибіотиків, дуже обмеженою є кількість штамів-продуцентів первинних і вторинних метаболітів.

Згідно заяв вчених, розвиток генної інженерії в майбутньому може принести багато благ для здоров'я людини та особистісного потенціалу. Завдяки генній інженерії та генетиці, потенційно розглядається можливість вирощувати окремі позитивні якості людей, як в дитячому, так і в дорослому віці. Людина матиме можливість посилити свої розумові здібності, імунітет і тривалість життя завдяки лише впровадження певних генів в організм. Дуже приваблива перспектива, враховуючи тезу, що дурість присутня на генетичному рівні і цілком може бути виліковною.

В перспективі, за використання генної інженерії людство може побороти більшість генетичних захворювань. У Європі вже схвалено одну процедуру, за допомогою якої можна боротися із синдромом Бюргера – Грютца, або дефіцитом ліпопротеїнліпази (зумовлює підвищення вмісту жирів у крові й усі проблеми, що звідси випливають), для використання в клінічній практиці. Фантастичним вважається те, що люди матимуть можливість позбутися старіння. Ця теорія базується на тому, що старіння викликається скороченням теломер в процесі ділення клітин. Теломери розташовуються на кінцях хромосом і здійснюють функцію захисту ДНК. В кінці 90-х років двадцятого століття вчені впровадили в клітину ген, який відновлює білок теломерази, що відповідає за відновлення теломер. Таким чином, вчені зробили клітину безсмертною.

Деякі особливості нових технологій ХХІ століття можуть призвести до великих небезпек, ніж існуючі засоби масового знищення. Перш за все, це здатність до самореплікації. Об'єкт, спеціально створений та/або той, що випадково опинився поза контролем, може стати засобом масового ураження всіх або певних груп людей. Для цього не потрібні комплекси заводів, складна організація та великі асигнування. Загрозу представлятиме саме знання: пристрої, винайдені і виготовлені в одиничних екземплярах, можуть містити в собі все, необхідне для подальшого розмноження, дії і навіть подальшої еволюції – зміни своїх властивостей в заданому напрямку. Успіх в цій галузі науки зможе радикально підняти продуктивність праці і сприяти вирішенню багатьох існуючих проблем, перш за все, підйому рівня життя кожної людини, але, в той же час, і створити нові руйнівні засоби.

3) Характеристика біотехнологічних процесів. Багато біотехнологічних процесів можуть розглядатися через 3 головних стрижневих компонента:

1. Отримання найбільш оптимальних каталізаторів специфічних процесів.

2. Забезпечення по можливості оптимальних умов для здійснення необхідного каталітичного процесу.
3. Відділення та очищення цільового продукту або продуктів з ферментаційної суміші.

У більшості випадків найбільш ефективною, стабільною і зручною формою для каталізу біотехнологічних процесів є цілісні організми, внаслідок чого в біотехнології широко використовуються мікробіологічні процеси. Проте, це не виключає використання вищих організмів (зокрема, культур рослинних і тваринних клітин), що в майбутньому будуть грати важливу роль в біотехнології. Мікроорганізми володіють величезним генетичний пулом (фондом), що дозволяє їм здійснювати практично необмежену біосинтетичну діяльність і потенціал деградації. Крім того, більшості мікроорганізмам притаманне виключно швидке зростання, швидкість якого набагато перевищує швидкість росту вищих організмів. Ця властивість дозволяє за короткий проміжок часу здійснити синтез великих кількостей необхідного продукту в суворо контрольованих умовах.

Суттєвим моментом першого компонента біотехнології є селекція та поліпшення властивостей об'єкта за допомогою генетичних методів, а останнім часом ще й з використанням високоефективних прийомів молекулярної біології, які здатні забезпечити конструювання організмів з новими біохімічними можливостями. У багатьох випадках каталізатор використовується в ізольованій формі у вигляді очищеного ферменту, для отримання якого в даний час розроблені ефективні методи виділення і очищення, а також методи стабілізації.

Другий компонент біотехнології пов'язаний з виготовленням систем, забезпечує оптимальне функціонування організмів продуцентів або чистих ферментів. Сюди відносяться спеціальні знання про біохімію процесів, а також відомості на рівні інженерного забезпечення, конструювання та виготовлення даних систем.

Третій компонент є досить складною і дорогою процедурою біотехнологічного процесу – виділення і очищення цільового продукту. Цей

компонент істотно збільшує собівартість всього процесу і може становити до 70% вартості готового комерційного препарату.

Отже, біотехнологія використовує методи дослідження, запозичені з хімії, мікробіології, біохімії, молекулярної біології, хімічної технології і комп'ютерної техніки з метою створення нових розробок, розвитку і оптимального використання процесів, в яких каталітичні реакції відіграють фундаментальну і незамінну роль. Будь-який біотехнолог повинен прагнути до досягнення тісного кооперування, співпраці з фахівцями інших суміжних (близьких) дисциплін.

Змістовий модуль 2: Основи генетичної інженерії

Лекція 2. *Принципи і інструменти генетичної інженерії*

1. Молекулярне клонування. Ферменти в генетичній інженерії
2. Методи синтезу генів
3. Застосування ПЛР в генетичній інженерії
4. Конструювання рДНК
5. Вектори в генетичній інженерії: плазмідні, фагові вектори, косміди та фазміди

1) Молекулярне клонування. Ферменти в генетичній інженерії. Основною стратегічною складовою генетичної інженерії є молекулярне клонування. **Молекулярне клонування** – це ізоляція послідовності дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з будь-якого біологічного виду та її введення у генетичний вектор. Після ізоляції молекулярні клони можуть бути використані для синтезу багатьох копій ДНК для аналізу експресії гена або накопиченого білка, а також можуть бути модифіковані *in vitro* для зміни експресійних можливостей гена та/або функції білка.

Відкриття ферментів рестрикції та лігування, яке уможливило створення рекомбінантних ДНК, стало великим тріумфом ХХ століття. До основних ензимів, які застосовуються у генній інженерії, належать специфічні ендонуклеази рестрикції, ДНКлігази, ДНК-полімерази, зворотна транскриптаза (РНК-залежна-ДНКполімераза).

Нуклеази – ферменти класу гідролаз, що каталізують розщеплення нуклеїнових кислот шляхом гідролізу фосфодієфірних зв'язків. Одні з них специфічні лише по відношенню до РНК — рибонуклеази, інші — до ДНК, — дезоксирибонуклеази. Деякі виявляють активність по відношенню до обох типів нуклеїнових кислот. Розрізняють також ендонуклеази, які розщеплюють полімерний ланцюг нуклеїнової кислоти всередині молекули та екзонуклеази, які поступово розщеплюють фосфодієфірні зв'язки з одного з кінців ланцюга. Нуклеази поділяють на 3 основні групи:

1. фосфодіестерази (полінуклеотидази), які розщеплюють нуклеїнові кислоти з утворенням моонуклеотидів;
2. фосфомоноестерази (нуклеотидази), що гідролітично розщеплюють моонуклеотиди з утворенням нуклеозидів і фосфорної кислоти;
3. нуклеозидази, які сприяють розпаду нуклеозидів на пуринову або піримідинову основу та вуглевод, а також їхньому синтезу.

За механізмом розщеплення субстратів нуклеази поділяють на екзо- і ендонуклеази. Екзонуклеази здійснюють послідовне відщеплення моно- або невеликих олігонуклеотидів з кінців молекул ДНК або РНК, у той час як ендонуклеази вносять у молекули нуклеїнових кислот внутрішні розриви. Зокрема, до ендонуклеаз належать численні рестриктази, які розглянуто вище. Деякі нуклеази мають більш широку специфічність і можуть гідролізувати як РНК, так і ДНК, а також одночасно виявляти ендо- і екзонуклеазну активності.

Ендонуклеази рестрикції (рестриктази) – бактерійні ензими, які розщеплюють молекулу ДНК у чітко визначених сайтах з утворенням тупих і липких кінців. Рестрикційна активність ендонуклеаз може бути асоційована з метилазою. Рестриктази використовують для побудови рестрикційних карт геномів та виявлення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. За відкриття рестриктаз та їх застосування у молекулярній генетиці В. Арберу, Х. Стіту і Д. Натансу у 1978 р. було присуджено Нобелівську премію.

Нуклеаза Bal31 з *Alteromonas aspejiana* послідовно відщеплює окремі моно- і олігонуклеотиди з 5'- і 3'-кінців дволанцюгових ДНК, скорочуючи обидва ланцюга ДНК приблизно з рівною швидкістю. При цьому нуклеаза Bal31 гідролізує і одноланцюгові ДНК.

Екзонуклеаза III E. coli каталізує послідовне відщеплення 5'-нуклеотидів з дволанцюгової ДНК в напрямку 3'-5'. Фермент має ендонуклеазну активність по відношенню до апуринірованої ДНК, активністю РНКаз *H* (гідроліз РНК в РНК-ДНК-гібридах) і 3'-фосфатазної активністю.

Екзонуклеаза фага λ каталізує послідовне відщеплення 5'-моонуклеотидів в дволанцюгових ДНК при наявності в них 5'-кінцевих фосфатних груп. Її використовують для отримання одноланцюгових молекул

ДНК з метою їх подальшого секвенування.

Нуклеаза S1 з *Aspergillus oryzae* в присутності іонів Zn^{2+} специфічно розщеплює молекули одноланцюгових ДНК і РНК з утворенням 5'-фосфорильованих моно- і олігонуклеотидів. Фермент специфічно розпізнає і розщеплює одноланцюгові ділянки в одноланцюгових розривах, проломах і петлях дволанцюгових ДНК, але не в одиночних помилково спарених нуклеотидах. Ті ж властивості притаманні і нуклеазі золотистої квасолі (mung bean), а також нуклеазі P1 з *Penicillium citrinum*.

Панкреатична рибонуклеаза А (РНКаза А) володіє активністю ендорибонуклеази, специфічно розщеплює фосфодиефірні зв'язки, утворені піримідиновими нуклеотидами. Продуктами гідролізу є 3'-фосфорильовані піримідинові мононуклеотиди і олігонуклеотиди, що містять кінцеві піримідин- 3'-монофосфати.

Панкреатична дезоксирибонуклеаза І (ДНКаза І) являє собою ендонуклеазу, яка гідролізує як одно-, так і дволанцюгову ДНК з утворенням складної суміші моно- і олігонуклеотидів, що містять 5'-фосфатні групи. У присутності іонів Mg^{2+} ДНКаза І незалежно атакує кожен ланцюг ДНК, при цьому місця розривів розташовуються статистично уздовж молекули, а в присутності іонів Mn^{2+} розщеплює обидва ланцюги ДНК приблизно навпроти один одного.

Кінази, або фосфотрансферази, – це ферменти, які здійснюють перенесення фосфатної групи від високоенергетичної молекули-донора, такої як АТФ, на різні специфічні субстрати. Цей процес називається фосфорилуванням. Ферменти, які виконують протилежну функцію, тобто видаляють фосфатну групу з субстрату, називаються фосфатазами.

Полінуклеотидкіназа – фермент, що каталізує приєднання фосфатної групи до кінцевих ланок олігонуклеотидів і полінуклеотидів. Полінуклеотидкінази здійснюють перенесення гамма-фосфатних груп АТР на 5'-ОН групи ДНК або РНК. Полінуклеотидкіназа бактеріофага Т4 використовується для введення радіоактивної мітки в ДНК або РНК для отримання радіоактивно мічених зондів або секвенування нуклеїнових кислот.

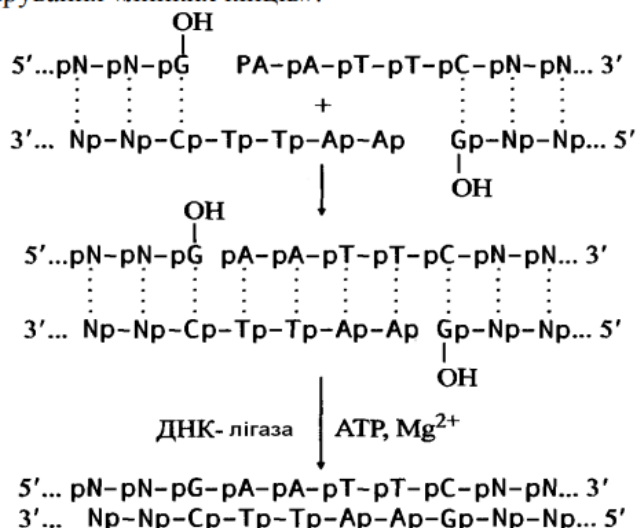
Лужні фосфатази бактерій (ВАР) і кишківника теляти (СІАР) каталізують видалення 5'-фосфатних груп ДНК або РНК, а також розщеплення макроергічних зв'язків рибо- і дезоксирибонуклеозидтрифосфатів. Їх використовують при підготовці фрагментів нуклеїнових кислот до введення 5'-кінцевого радіоактивного ^{32}P і для запобігання лігування векторних молекул ДНК самих на себе. ДНК-лігаза здатна утворювати фосфодієфірні зв'язки в одноланцюгових розривах лише при наявності в них 5'-кінцевого фосфату. Видалення 5'-кінцевих фосфатних груп молекул вектора, лінеаризованих за допомогою однієї рестриктази під час його підготовки для клонування відповідного фрагмента ДНК, запобігає утворенню кільцевих молекул вектора (без вставки), а також його олігомерів під час лігування з клонованою послідовністю.

Необхідні для лігування зі вставкою фосфатні групи містяться в самих клонованих фрагментах ДНК, а ті що лишаються в результаті неповного лігування два одноланцюгових розриви репаруються *in vivo* після введення вектора зі вставкою в бактеріальні клітини.

Лігази (синтетази) – каталізують реакції синтезу різних речовин, використовуючи енергію АТФ та інших макроергічних сполук. У 1961 р. М. Мезельсон і Дж. Вейгл на прикладі фага λ показали, що рекомбінація включає розрив і наступне відновлення молекул ДНК. Незабаром при дослідженнях фагів λ і Т4 було виявлено ферменти, що необхідні для здійснення фагових рекомбінацій. У 1967 р. було знайдено фермент, який називають ДНК-лігазою, що каталізує синтез фосфодієфірного зв'язку в дволанцюговій ДНК. Створення фосфодієфірних зв'язків у одноланцюгових розривах дволанцюгової ДНК за допомогою ДНК-лігаз є, поряд з рестрикцією, одним із найважливіших етапів одержання рекомбінантних ДНК *in vitro*. Найбільше застосування в генно-інженерних дослідженнях знаходить ДНК-лігаза бактеріофага Т4. Т4-ДНК-лігаза здійснює з'єднання фрагментів дволанцюгової ДНК, що мають комплементарні «липкі» або «тупі» кінці (рис. 1.).

З механізму реакції виходить, що необхідною умовою протікання лігирування є наявність 5'-кінцевого фосфату й 3'-кінцевого гідроксилу в точках розриву ланцюгів ДНК. При цьому ефективність з'єднання фрагментів ДНК по «тупих» кінцях Т4-ДНК-лігазою зростає за наявності Т4-РНК-лігази, що здійснює ковалентне з'єднання 5'-кінців одноланцюгових ДНК або РНК із 3'-кінцями одноланцюгових нуклеїнових кислот.

Лігирування «липких кінців»:



Лігирування «тупих кінців»:

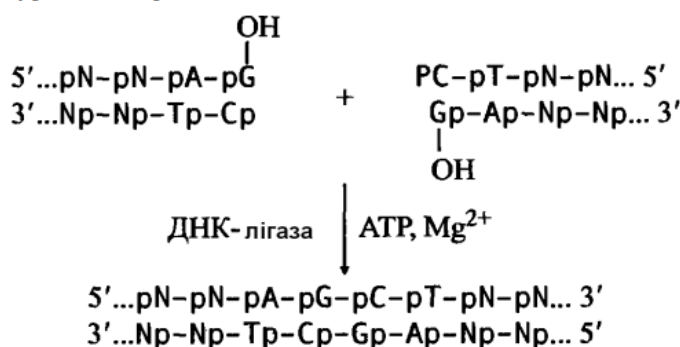


Рис. 1. Механізм реакції лігирування

В ядерних клітинах синтез лідируючого і відстаючого ланцюгів здійснюють різні ДНК-полімерази. У цілому в еукаріот виявлено чимало ДНК-полімераз. П'ять з них безпосередньо беруть участь у реплікації, а саме ДНК-полімерази α (альфа), δ (дельта), ϵ (епсілон), γ (гама) і теломераза.

ДНК-полімераза α , яка складається з двох α -субодиниць, утворює достатньо стійкий і постійний комплекс з субодиницями *PriS* і *PriL*. Останні діють як праймаза, синтезуюючи короткі РНК-праймери на обох ланцюгах ДНК. Потім ДНК-полімераза α ініціює реплікацію, подовжуючи праймери

приблизно на 20 дНМФ. Далі комплекс від'єднується, а естафету приймають ДНК-полімерази δ і ϵ .

ДНК-полімераза δ – високопроцесивний фермент, який володіє 3'→5' екзонуклеазною активністю і здійснює синтез відстаючого ланцюга. Мінімальний фермент складається з чотирьох субодиниць: *delta 1* (каталітична субодиниця), *delta 2*, *delta 3* і *delta 4* (p12). Полімераза δ розпізнає 3'-кінець подовжених полімеразою α праймерів, приєднується до них і здійснює циклічні реініціації та синтез фрагментів Оказакі. Дозрівання фрагментів Оказакі в еукаріот вимагає видалення РНК-затравок за допомогою білкового фактора *FEN-1* та РНКаз *H1*, а також ковалентного з'єднання фрагментів один з одним під дією ДНК-лігази *I*.

ДНК-полімераза ϵ – високопроцесивний фермент, який володіє 3'→5' екзонуклеазною активністю і здійснює синтез лідируючого ланцюга. Мінімальний фермент складається з субодиниць *epsilon* (каталітична субодиниця *A*), *epsilon 2* і *epsilon 3*. Також припускається, що ДНК-полімераза ϵ бере участь у регуляції клітинного циклу, а саме при переході метафази в анафазу.

Для формування холоферментів ДНК-полімераз δ і ϵ необхідні ще два компоненти: білок *PCNA* і фактор реплікації *C* (*RFC*). Вони є функціональними аналогами прокаріотичних β -білка і білків γ -комплексу.

ДНК-полімераза γ , яка кодується ядерними генами, є єдиною еукаріотичною ДНК-полімеразою, що бере участь у реплікації мітохондріальної ДНК (мтДНК). Очищена велика субодиниця полімерази γ володіє не тільки ДНК-полімеразною, а й корегувальною екзонуклеазною активністю у напрямі 3'→5'. Остання функція є вкрай важливою оскільки мтДНК постійно міститься в окислювальному середовищі матриксу мітохондрій. Через це швидкість нуклеотидних замін у мтДНК в 10 разів вища, ніж в ядерній. Підтримка цілісності мтДНК залежить від ефективності всіх систем репарації (відновлення), обов'язковим учасником яких є ДНК-полімераза γ .

Решта ДНК-полімераз еукаріот, як правило, залучені до репарації ДНК.

Особливої уваги заслуговує фермент теломераза. Це рибонуклеопротейн, який додає особливі послідовності ДНК (TTAGGG у хребетних і TTGGGG у безхребетних) на 3'-кінці лінійної хромосоми еукаріот, оскільки жодна ДНК-полімераза не здатна їх реплікувати. Такі послідовності називаються *теломерами*. Теломераза є зворотною транскриптазою (фермент, що здійснює синтез ланцюга ДНК на РНК-матриці), до її складу входить особлива молекула РНК, яка використовується в якості матриці для зворотної транскрипції під час подовження теломер. Як тільки теломераза своєю внутрішньою РНК приєдналась до 3'-кінця одноланцюгового фрагменту хромосоми, який слугує затравкою, починається подовження останнього до кінця матриці РНК. Потім відбувається транслокація (переміщення) ферменту на один теломерний повтор вперед вздовж матриці ДНК. Після чого теломераза здійснює черговий цикл подовження вже нової 3'-кінцевої послідовності хромосоми, по завершенню дії теломери другого ланцюг ДНК добудовується звичайним способом.

Термінальна трансфераза з тимусу теляти (термінальна дезоксирибонуклеотидтрансфераза (ТдТ)), що здійснює послідовне приєднання дезоксирибонуклеозидмонофосфатів з пулу дезоксирибонуклеозидтрифосфатів до 3'-ОН-груп молекул ДНК, використовується для введення радіоактивної мітки в складі мічених нуклеотидів в 3'-кінці ДНК, а також приєднання до 3'-кінців фрагментів ДНК (особливо кДНК) протяжних гомополімерних послідовностей нуклеотидів (конекторів) для подальшого їх клонування.

2) Методи синтезу генів. Розрізняють декілька методів отримання генів:

- хімічний синтез;
- рестрикційний метод;
- ферментативний синтез;
- хіміко-ферментативний синтез;
- отримання фрагментів ДНК, за допомогою полімеразної ланцюгової

реакції (ПЛР).

Хімічний синтез генів – це лабораторний метод штучного створення послідовностей ДНК із заданою нуклеотидною структурою без використання природного матричного ДНК.

Суть методу: У процесі хімічного синтезу гени будують послідовно з окремих нуклеотидів (А, Т, G, С), використовуючи хімічні реакції для з'єднання їх у потрібному порядку. Потім отримані короткі фрагменти (олігонуклеотиди) зшивають у повноцінний ген.

Етапи хімічного синтезу генів:

1. **Проектування послідовності гена.** Використовується комп'ютерний аналіз для створення оптимальної послідовності ДНК (наприклад, для максимальної експресії в певному організмі).
2. **Хімічний синтез олігонуклеотидів.** Короткі фрагменти ДНК (20–100 нуклеотидів) синтезують методом фосфорамідитної хімії на автоматичних синтезаторах.
3. **Зшивання фрагментів.** Отримані олігонуклеотиди з'єднують за допомогою ферментів (лігаз) або методів PCR, щоб утворити повний ген.
4. **Перевірка послідовності.** Готовий ген перевіряють методом секвенування на відповідність заданому дизайну.
5. **Вбудовування гена у вектор.** Синтетичний ген вставляють у плазмідну або інший носій для подальшої роботи (експресії, клонування тощо).

Переваги: Можна створювати будь-які гени, навіть ті, що не існують у природі. Висока точність і відтворюваність. Дозволяє оптимізувати кодони для різних організмів. Економія часу порівняно з традиційним клонуванням.

Рестрикційний метод отримання генів – це класичний метод молекулярної біології, який полягає у вирізанні потрібного гена з ДНК-носія за допомогою спеціальних ферментів – рестриктаз.

Суть методу: Рестриктази – це ферменти, що розрізають ДНК у певних специфічних місцях, які мають визначену нуклеотидну послідовність (рестрикційні сайти). Використовуючи їх, можна виділити потрібний ген із ДНК одного організму та вставити його у ДНК іншого (наприклад, у плазмідну

бактерії). Основні етапи рестрикційного методу наведені в таблиці 2.

Основні етапи рестрикційного методу:

Етап	Опис процесу	Мета
1. Виділення ДНК	Отримання ДНК із клітин-донорів (організму, який містить потрібний ген).	Підготовка матеріалу для подальших маніпуляцій.
2. Обробка ДНК рестриктазами	Ферменти розрізають ДНК у певних точках, утворюючи фрагменти з «липкими» або «тупими» кінцями.	Отримання фрагмента, що містить потрібний ген.
3. Вирізання гена	Із суміші фрагментів виділяють той, що містить потрібну послідовність.	Отримання цільового гена.
4. Вставка гена у вектор	За допомогою лігази фрагмент ДНК з'єднують із плазмідною або іншим вектором, який має комплементарні кінці.	Створення рекомбінантної ДНК.
5. Введення вектора у клітину	Рекомбінантну ДНК вводять у бактерію або інший організм.	Подальше розмноження та експресія гена.

Переваги рестрикційного методу:

- 1. Висока точність** Рестриктази розрізають ДНК у строго визначених ділянках, що дозволяє точно вирізати потрібний ген без пошкодження інших частин молекули.
- 2. Природність процесу** Використовуються природні ферменти бактерій, тому метод є біологічно сумісним і не потребує складних хімічних реакцій.
- 3. Можливість створення рекомбінантних молекул ДНК** Дає змогу з'єднувати фрагменти ДНК з різних організмів, утворюючи нові генетичні комбінації.
- 4. Висока ефективність** Отриманий ген легко вбудовується у вектор і може експресуватись у клітинах-господарях (наприклад, бактерій).
- 5. Універсальність** Метод застосовують для роботи з будь-якими типами ДНК – бактеріальною, рослинною, тваринною тощо.
- 6. Придатність для масштабних біотехнологічних процесів** Широко використовується у промисловій біотехнології для виробництва білків, вакцин, ферментів.
- 7. Відносна простота та доступність** Не потребує складного обладнання чи дорогих реактивів (на відміну від хімічного синтезу генів).

Ферментативний синтез генів. 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. 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 7 того білка, ген якого прагнуть здобути. Білок, який нас зацікавив, але ще прикріплений до полісом, що синтезують його на матриці мРНК (рис.2.), взаємодіючи зі специфічними антитілами, випадає в осад.

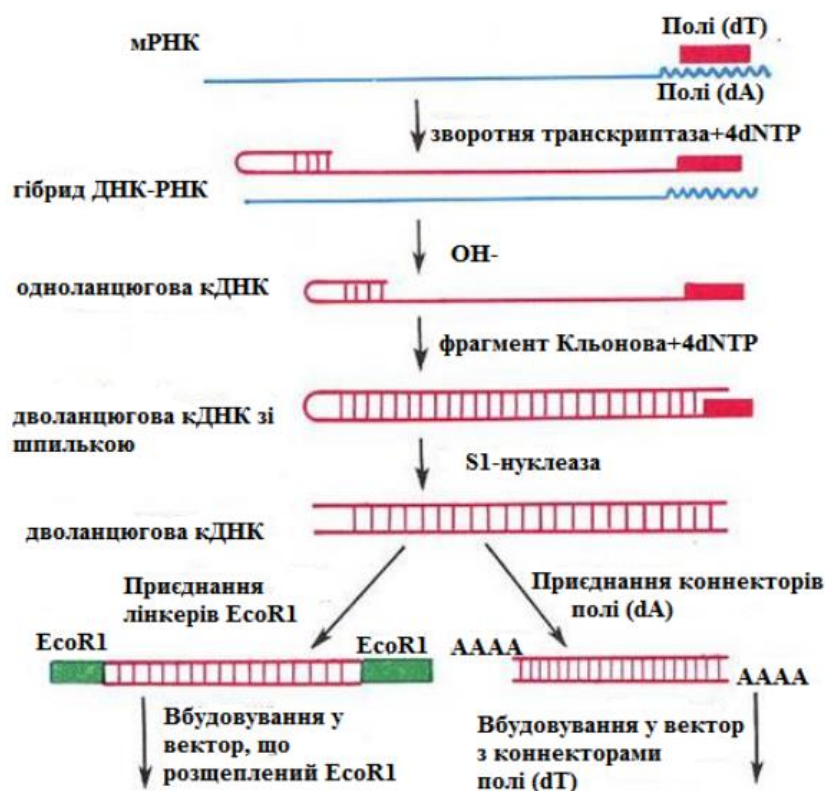


Рис. 2. Конструювання дволанцюгової кДНК на основі мРНК

Специфічні мРНК, на яких синтезувався білок, можна потім вилучити з осаду за допомогою хроматографічних методів практично в чистому вигляді, тобто без домішок інших мРНК.

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 одностанцюговій кДНК за допомогою ДНК-полімерази І добудовується другий ланцюг кДНК. У результаті утворюється дволанцюгова кДНК, яка потім з'єднується з необхідним вектором.

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

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

Лінкер – 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) – це сучасний метод молекулярної біології, який дає змогу багаторазово копіювати (ампліфікувати) певну ділянку ДНК *in vitro* (у пробірці).

Суть методу: Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) імітує природний процес реплікації ДНК, але відбувається в лабораторних умовах. За допомогою ДНК-полімерази, праймерів і циклічного нагрівання/охолодження відбувається множинне копіювання обраної ділянки ДНК – тобто створення великої кількості її копій табл. 3.

Таблиця 3

Основні етапи ПЛР:

Етап	Суть процесу	Умови
1. Денатурація	Подвійна спіраль ДНК розплітається на дві окремі нитки.	~94–96 °C
2. Відпал (анелінг) праймерів	Короткі синтетичні праймери приєднуються до комплементарних ділянок ДНК.	~50–65 °C
3. Елонгація (подовження)	ДНК-полімераза добудовує нову нитку ДНК, використовуючи вихідну як матрицю.	~72 °C

Цикл повторюється 25–40 разів, у результаті кількість копій потрібного фрагмента зростає експоненційно. Переваги методу:

- 1. Висока чутливість** – можна отримати мільйони копій навіть з однієї молекули ДНК.
- 2. Швидкість** – реакція триває лише кілька годин.
- 3. Точність і специфічність** — ампліфікується лише потрібна ділянка.

4. **Малий обсяг вихідного матеріалу** – достатньо кількох клітин або краплі крові.

5. **Можливість автоматизації** – процес проводиться в термоциклері.

3) Застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у генетичній інженерії. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – експериментальний метод молекулярної біології, який дозволяє досягти значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі). Полімеразна ланцюгова реакція дозволяє багаторазово відтворювати (ампліфікувати) вибраний фрагмент ДНК без допомоги рестриктаз, векторів або клітини-господаря.

Окрім ампліфікації ДНК (збільшення копій), ПЛР дозволяє здійснювати безліч інших маніпуляцій з нуклеїновими кислотами (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК) і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, для клонування генів, виділення нових генів, тощо.

Методика ПЛР. Спочатку синтезуються два дезоксиолігонуклеотиди довжиною 20-30 основ, що є кінцевими послідовностями фрагменту ДНК, який вивчають. Полярність обрана так, щоб після відпалу їх напрями (5'→3') були звернені один до одного. Надмірну кількість цих олігонуклеотидів змішують з ДНК геному, і суміш нагрівають для денатурації останньої. Зниження температури призводить до реасоціації олігонуклеотидів з гомологічними ділянками ДНК генома. У подальшому проводять нарощування ланцюга за участю ДНК-полімерази і дезоксирибонуклеотидтрифосфатів. Така послідовність реакцій денатурації, реасоціації і нарощування ланцюга повторюється 20-30 разів.

Вже після двох циклів серед продуктів реакції з'являються фрагменти ДНК, які точно співпадають за довжиною з початковим фрагментом, обмеженим олігонуклеотидами. Ці фрагменти слугують матрицею для наступних реакцій та ідентичні більшості кінцевих продуктів. Процес є по суті

матричним, оскільки продукти цієї реакції слугують матрицею для наступних реакцій. Кількість ДНК, яка знову утворюється, зростає в геометричній прогресії, тому за 20 циклів при 100%-ній ефективності кожного з них можна отримати 220 молекул. На практиці ефективність кожного циклу ампліфікації складає 20-50%, тобто при проведенні достатнього числа циклів можна досягти збільшення кількості специфічної послідовності до мільйону копій.

Кожен цикл ПЛР (рис. 3.) складається з трьох етапів. На першому етапі дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94-96°C (чи до 98°C, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5-2,0 хв., щоб ланцюги ДНК розійшлися. Ця стадія називається *денатурацією*, оскільки руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК. Іноді перед першим циклом (перед додаванням полімерази) проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2-5 хв. для повної денатурації матриці і праймерів. Такий прийом називається *гарячим стартом*, він дозволяє знизити кількість неспецифічних продуктів реакції.

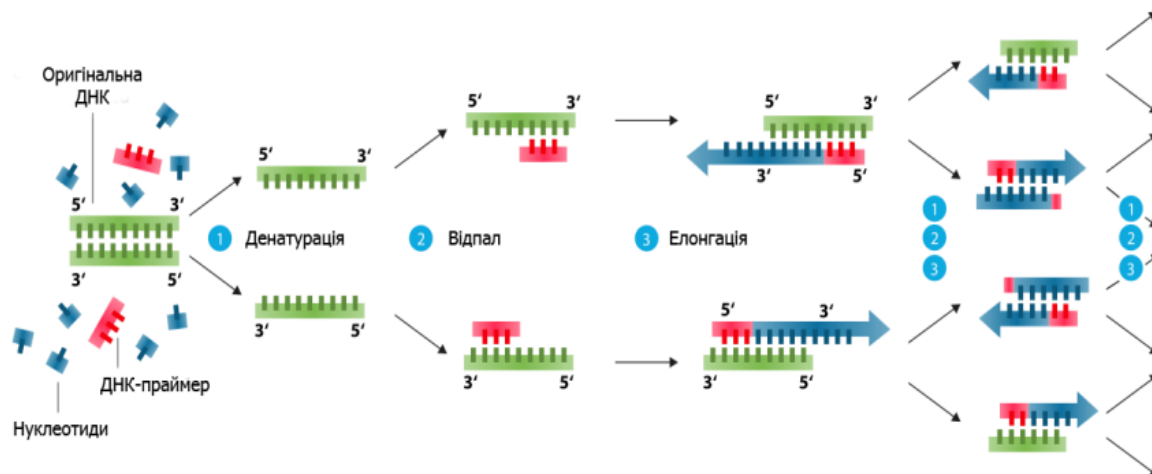


Рис. 3. Принципова схема ПЛР

Первинна високотемпературна денатурація ДНК геному проводиться протягом 3-10 хв. і залежить від типу матриці. Проте оптимальним часом денатурації вважається 4-5 хв. Вибір часових інтервалів і температурного режиму залежить значною мірою від складу реакційної суміші ПЛР, типу використовуваних пробірок і моделі ампліфікатора та у кожному конкретному випадку може значно відрізнятись від так званих «стандартних умов» – 94°C 1

хв., 55°C 1 хв., 72°C 1 хв. У присутності органічних добавок повна денатурація матриці може бути досягнута вже при температурах нижче 90°C. При використанні, наприклад, такого термостабільного ферменту, як *Vent* ДНК-полімераза, температуру денатурації можна підвищувати до 97°C.

Другий етап. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею. Ця стадія називається *відпалом*, або *ренатурацією*. Температура відпалу залежить від складу праймерів і зазвичай вибирається на 4-5°C нижче за їх температуру плавлення. Час стадії – 0,5-2,0 хв. Неправильний вибір температури відпалу призводить або до поганого зв'язування праймерів з матрицею (при завищеній температурі), або до зв'язування в невірному місці і появи неспецифічних продуктів (при зниженій температурі).

Час відпалу може складати всього декілька секунд, якщо ампліфікатор налаштований на вимір температури зразка, а не термоблоку. При використанні, наприклад, праймерів, не повністю комплементарних матриці, перші цикли ПЛР проводять за меншою температурою відпалу порівняно з наступними циклами.

З метою оптимізації виходу продукту ПЛР в умовах невизначеності з температурою відпалу праймерів використовують процедуру «скачування», коли температура відпалу зменшується поступово цикл за циклом і сумарна її різниця може складати 15-20°C. Останнім часом з'явилися моделі термоциклерів з градієнтними температурними платами, що дозволяє значно полегшити підбір температури відпалу праймерів.

Третій етап. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як затравку. Це – стадія *елонгації*, або *синтезу*. Полімераза починає синтез другого ланцюга від 3'-кінця праймера, який зв'язався з матрицею, і рухається уздовж матриці в напрямку від 3'- до 5'-кінця. Температура елонгації залежить від полімерази. Часто *Taq* і *Pfu* полімерази, які використовуються, найбільш активні при 72°C. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікованого фрагмента. Звичайний час елонгації приймають рівним одній хвилині на

кожну тисячу пар основ. Після закінчення усіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати усі одноланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 7-10 хв.

Аналіз довжини рестрикційних фрагментів. Рестриктази розщеплюють ДНК у специфічних ділянках, зазвичай в паліндромних послідовностях. Коли одна з основ у такій послідовності змінюється в результаті мутації, ця ділянка перестає розщеплюватися рестриктазами. У той же час мутації можуть призводити до утворення нових ділянок, чутливих до рестриктаз. У результаті відповідні фрагменти ДНК, отримані від двох генетично не ідентичних індивідів, часто утворюють рестрикційні фрагменти різної довжини. Це явище носить назву поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК (ПДРФ, англ. *Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP*).

ДНК-фрагмент, що містить досліджувану послідовність, ампліфікують за допомогою ПЛР. Потім ампліфікований фрагмент гідролізують відповідними рестриктазами. Фрагменти розділяють гелі-електрофорезом, фрагмент, що цікавить, виявляють за допомогою специфічного генного зонду. На рис.4. приведено результати застосування методу в криміналістиці та генодіагностиці.

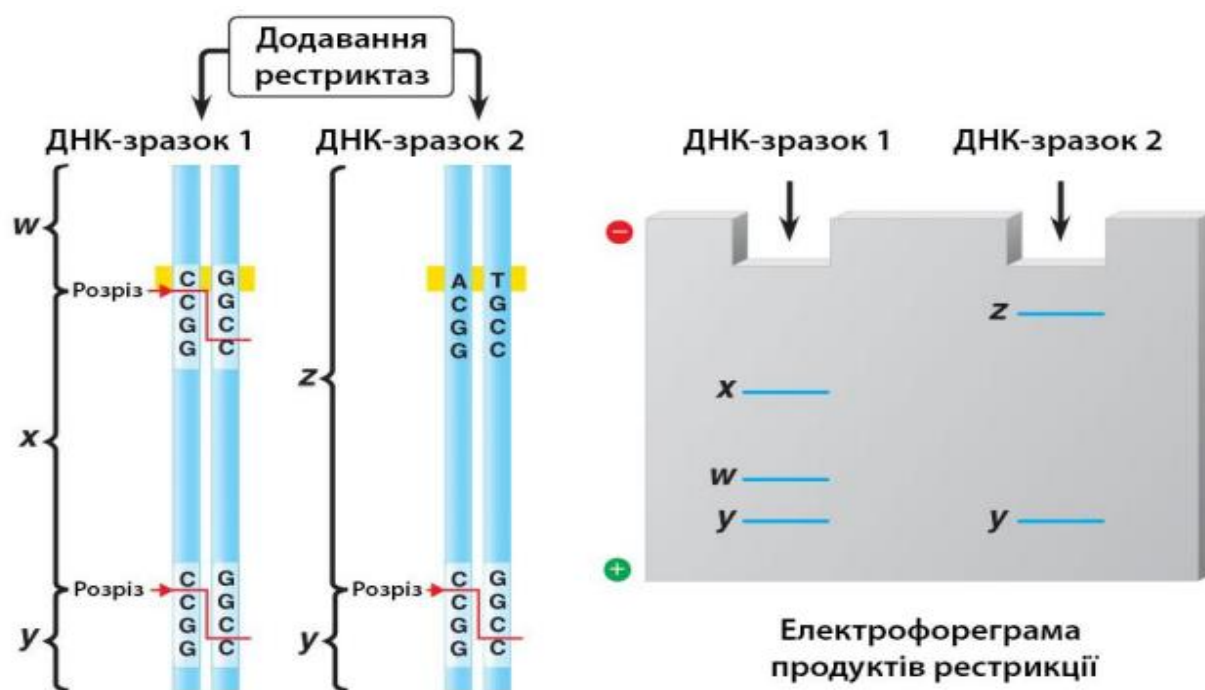


Рис.4. Принципова схема методу ПДРФ

Рестрикційна карта зразка ДНК, виділеної з тканини, знайденої на місці злочину (зразок 1), не співпадає з пробою, взятою у підозрюваного (зразок 2). Для отримання такого «генетичного відбитку» достатньо дуже малої кількості матеріалу, що містить ДНК. Другим важливим практичним додатком ПДРФ-аналізу є виявлення генетичних мутацій, що ведуть до спадкових захворювань.

4) Конструювання рекомбінантних молекул нуклеїнових кислот.

Рекомбінантні ДНК – це ДНК, що створені поєднанням *in vitro* (у пробірці) двох, або більш фрагментів ДНК, отриманих з різних біологічних джерел. Певні фрагменти ДНК, у тому числі й фрагменти, що містять гени, отримують з використанням ферментів рестрикції. Методи з'єднання фрагментів залежать від того, які кінці у фрагментів ДНК, що поєднуються.

З'єднання фрагментів з липкими кінцями. Деякі рестриктази, наприклад, *Eco R1*, розрізають дволанцюгову ДНК з утворенням "липких" кінців, де протилежні ланцюги розміщуються зі зсувом. Такі кінці мають тенденцію до асоціації через комплементарне парування основ (рис. 5.).

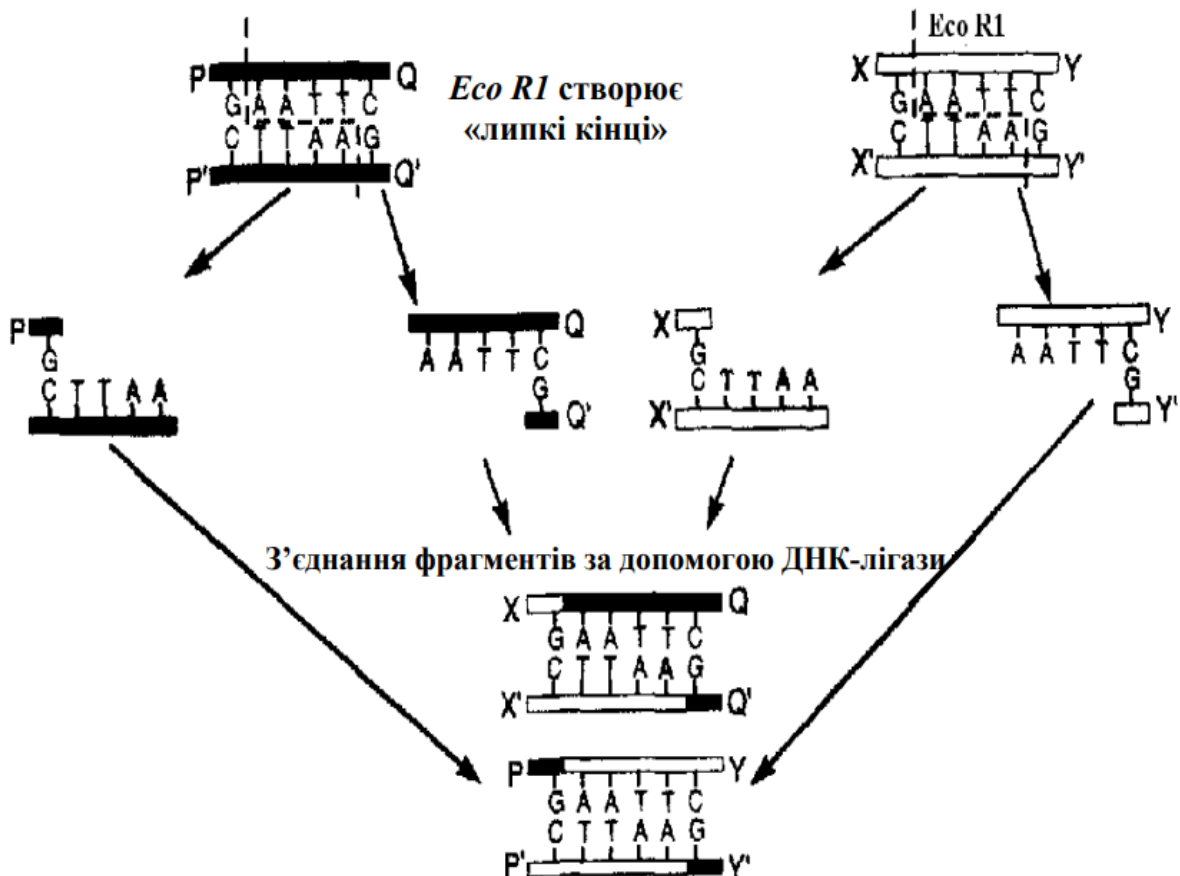


Рис. 5. З'єднання фрагментів по однойменних «липких» кінцях

Парування відбувається лише між комплементарними послідовностями, тому ААТТ-кінці, створені Eco R1, не поєднуються з AGCT-кінцями, створеними Hind III. Однак фрагменти, створені однією рестриктазою, можуть об'єднуватися завдяки водневим зв'язкам між комплементарними нуклеотидами. Після такого з'єднання залишаються розриви у фосфодієфірному остові, які відновлюються ферментом ДНК-лігазою, що завершує утворення рекомбінантної ДНК.

З'єднання фрагментів з «тупими» кінцями. У цьому разі реакція лігирування (скріплювання) має власні особливості. ДНКлігаза, що кодується фагом T4, здатна з'єднувати дволанцюгові фрагменти, але для ефективного перебігу реакції необхідна наявність високої концентрації фрагментів ДНК з «тупими» кінцями і майже в 10 разів більшої концентрації ферменту. Однак, і в цьому разі ефективність цієї реакції на порядок нижча за ефективність скріплювання 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 фермента нуклеази S1, яка руйнує лише одноланцюгову ДНК, або «липкі» кінці добудовують, тобто за допомогою ДНКполімерази на підставі одноланцюгового «липкого» кінця синтезують комплементарний до нього ланцюг, а потім проводять скріплення 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) (рис. 6). Процес приєднання ділянок полі-А і полі-Т здійснюється за допомогою ферменту – кінцевої трансферази. Фрагменти, що добудовані таким чином, потім змішують і обробляють ДНК-лігазою. При цьому між фрагментами вбудовуються ділянки $\frac{\text{AAAAA}}{\text{TTTTT}}$. Такі додаткові послідовності можуть впливати на функції молекул, що

з'єднуються, і тому завжди, якщо можливо, для отримання рекомбінантних молекул ДНК використовують «липкі» кінці, створені внаслідок дії рестриктаз.

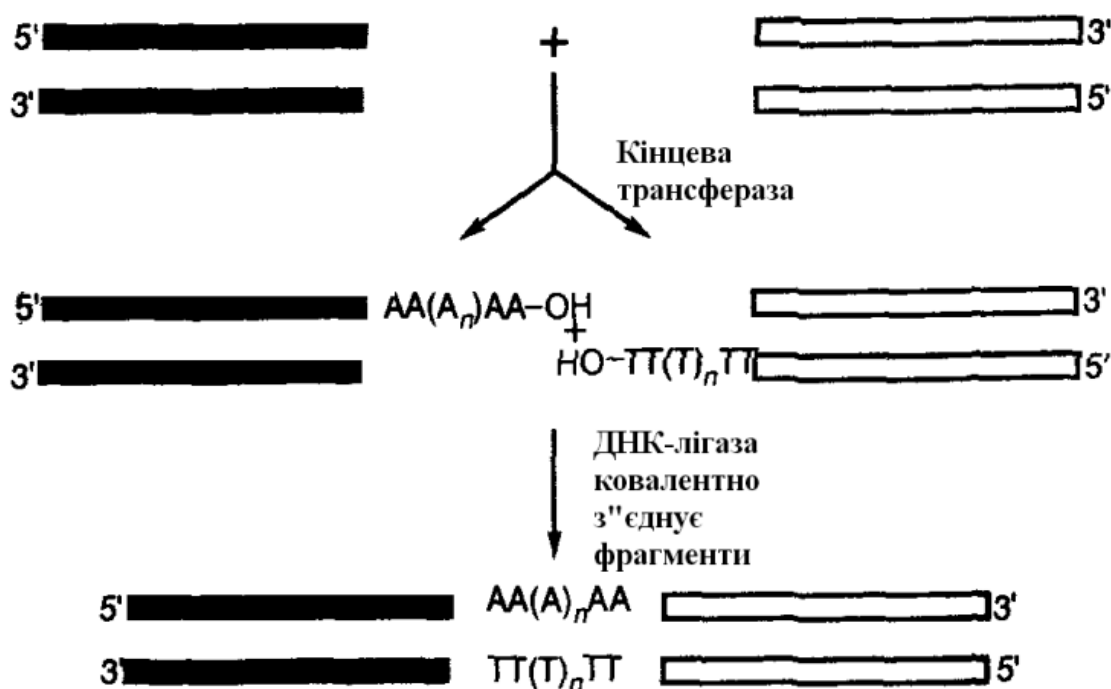


Рис. 6. Коннекторний метод з'єднання фрагментів ДНК

Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК. У разі, коли необхідно скріпити фрагменти, що створені різними рестриктазами, які мають різні, тобто не комплементарні один до одного кінці, використовують так звані лінкери (або перехідники). Лінкери – хімічно синтезовані олігонуклеотиди, що являють собою сайти рестрикції або їх комбінацію. За використання лінкерів потрібно враховувати необхідність дотримання правил експресії генетичної інформації. Часто всередину лінкера розташовують будь-який регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку пов'язану із рибосомою. В цьому випадку лінкери не лише забезпечують поєднання генів, але й обумовлюють їх експресію. Також є лінкери «тупий кінець – липкий кінець». Розроблений підхід передбачає такі операції (рис. 7):

- по тупих або липких кінцях фрагменту ДНК, який необхідно рекомбінувати, за допомогою лігази фага T4 приєднують короткі синтетичні дволанцюгові сегменти, що містять сайти розпізнавання для певної рестриктази;

- отриманий фрагмент обробляють зворотною рестриктазою, внаслідок чого створюються липкі кінці;
- отриманий фрагмент рекомбінують *in vitro* з іншими молекулами ДНК звичайним методом.

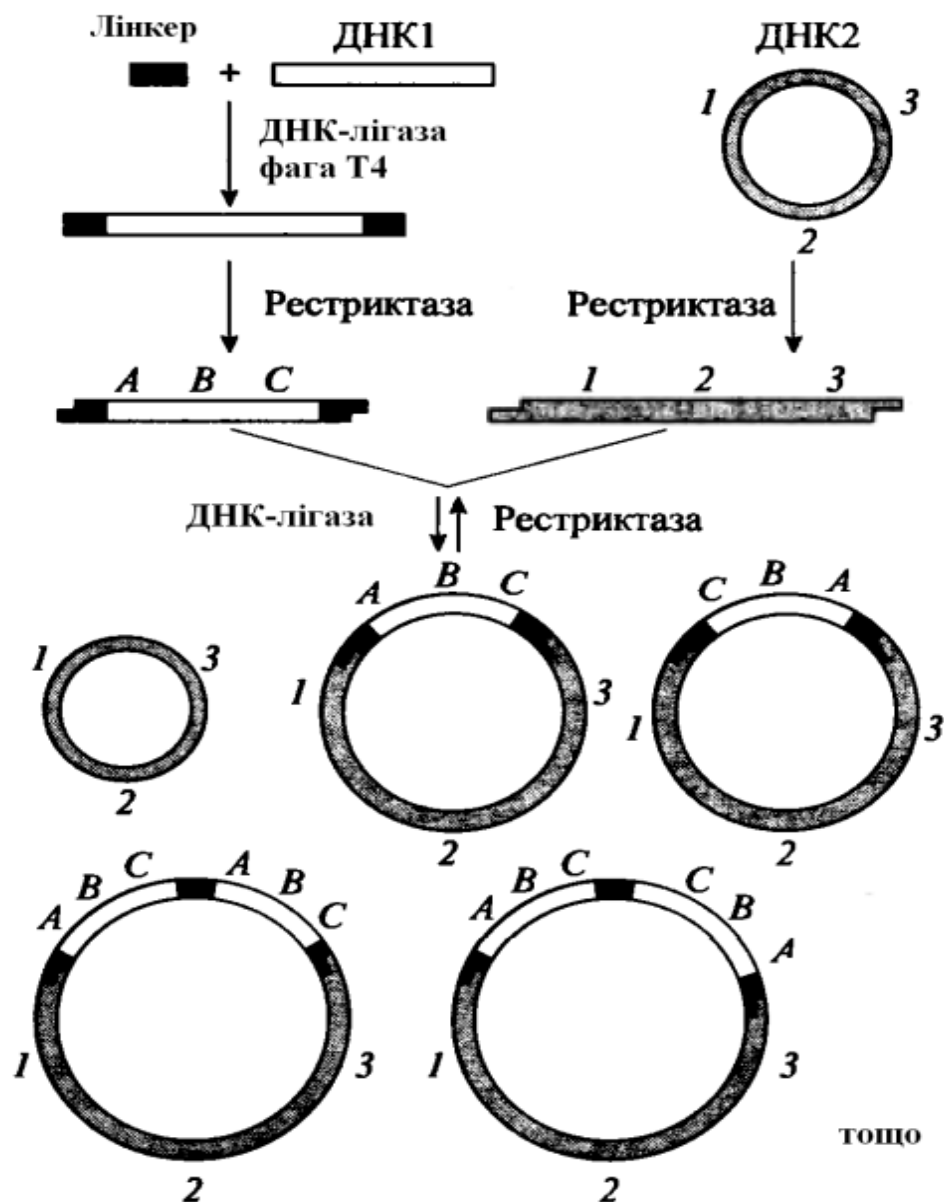


Рис. 7. Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК

Використання лінкерів робить цей метод рекомбінації фрагментів ДНК *in vitro* універсальним, оскільки початкові фрагменти можна отримувати різними способами.

5) Вектори в генетичній інженерії: плазмідні, фагові вектори, косміди та фазміди. Уведення у клітину і стабільна підтримка генетичної інформації, що міститься у рекомбінантних молекулах ДНК,

досягається за допомогою векторних молекул або векторів. **Векторами** називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і (або) трансформацію (перенесення у інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткової генетичної інформації. Необхідність використання вектора зумовлена тим, що при звичайному введенні ДНК у клітини вона піддається дії нуклеаз, які розщеплюють її до нуклеотидів. Щоб ДНК стала складовою частиною генетичного апарату клітини, вона повинна або вбудуватися в її геном, або бути здатною до автономної реплікації.

На сьогодні створено значну кількість векторів, що розрізняються за профілем їхнього використання на декілька типів:

1. Вектори для клонування використовують для ампліфікації (збільшення кількості) ДНК шляхом реплікації фрагменту, вбудованого у вектор. Найчастіше використовують бактеріальні плазміди та фаги. Для клонування великих фрагментів геному використовують штучні бактеріальні та дріжджові хромосоми (BAC і YAC).

2. Вектори експресії застосовують для аналізу генних послідовностей і білкових продуктів, а також для виробництва певних білків. Існує багато систем експресії, особливо для прокаріотів. Є також вектори для експресії генів у дріжджах, рослинах і тваринах. Вектори для еукаріотів завжди містять промотор, здатний функціонувати в даному типі організму, і поліаденілювання (poly(A)-хвіст) для відокремлення мРНК від рРНК і тРНК, а також для ініціації синтезу комплементарної ДНК (кДНК).

3. Вектори для трансформації. Використовують для введення чужорідного фрагменту ДНК у геном реципієнта. Як правило, такі вектори містять специфічні послідовності, що сприяють інтеграцію у геном.

Для конструювання векторів у генній інженерії використовують хромосоми вірусів, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин, а також невеликі молекули нуклеїнових кислот, здатних до автономної реплікації в бактеріальних і еукаріотичних клітинах – плазміди. Велика серія векторних плазмід, позначених символом pBR, створена на основі реплікона природної

плазміді ColEI, що надає клітинам *E. coli* стійкість до колхіцину шляхом його об'єднання з генами стійкості до антибіотиків. Таким чином, бактеріальні клітини, що несуть подібні комбіновані плазміді, набували стійкість до відповідних антибіотиків і їх було легко відрізнити від безплазмідних клітин шляхом простого посіву на поживне середовище із антибіотиками.

Фагові вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК а б 97 завдовжки 15...25 т.п.н. Однак, цього явно недостатньо, щоб клонувати багато генів тварин і рослин, довжина яких найчастіше перевищує 35...40 т.п.н. Необхідною місткістю володіють векторні молекули, названі космідами.

Косміди являють собою невеликі плазміді, 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, що розділяють мономери фагової ДНК. У процесі пакування *cos*-сайти розпізнаються ферментативною системою, що забезпечує послідовне відділення упакованої у фагову частинку λ -ДНК від іншої неупакованої ДНК. Наявність *cos*-сайтів у ДНК є єдиною необхідною умовою для упаковки ДНК у фагові частинки. Це означає, що послідовність нуклеотидів λ -ДНК між двома *cos*-сайтами, яка містить весь фаговий геном (35...45 т.п.н.), може бути заміщена *in vitro* на аналогічний за довжиною (38...52 т.п.н.) фрагмент чужорідної ДНК і ефективно упакована у фагові частинки. Така штучна фагова частинка є нежиттєздатною, але після адсорбції на поверхні бактеріальної клітини ДНК проникає в бактерію і починає автономно реплікуватися як плазмід розміром 30...40 т.п.н. Оскільки така плазмід (космід) містить селективні маркери, її підтримують у бактеріальних клітинах шляхом вирощування на середовищі з відповідними антибіотиками. Стадія пакування ДНК космід у фагові частинки полегшує введення рекомбінантних ДНК великого розміру в бактеріальні клітини, імітуючи проникнення фагової хромосоми під час фагової інфекції. Однак, подібність між проникненням космід у бактеріальні клітини та фаговою інфекцією на цьому завершується.

Фазміди – це векторні молекули ДНК, що містять у собі генетичні елементи плазмід і хромосом бактеріофагів. Вони можуть мати місткість у

відношенні до ДНК, що клонується, характерну для λ -векторів, та існувати за певних умов у бактеріальних клітинах у вигляді плазміди або ж упаковуватися у фагові часточки *in vivo* за зміни цих умов.

Лекція 3. Клонування генів

1. Введення молекул ДНК у клітини
2. Методи введення молекул ДНК у клітини тварин
3. Методи введення молекул ДНК у клітини рослин

1) Введення молекул ДНК у клітини. Термін «клон» походить від давньогрецького слова *klōn*, що означає генетичну копію молекули, клітини, рослини, тварини або людина. Клонування перестало бути предметом з області віддаленого майбутнього. **Клонування генів** – це процес, при якому створюються однакові копії гена за допомогою інструментів та методів молекулярної біології.

Необхідний етап генно-інженерного експерименту – введення отриманих *in vitro* гібридних молекул ДНК у клітини, що забезпечують реплікацію цих молекул, з метою розмноження, селекції і виділення клонів гібридів. Процес, внаслідок якого чужорідна ДНК проникає у клітинуреципієнт і викликає у ній зміни, що успадковуються, має назву **трансформація**. Трансформацію клітин можуть здійснювати як молекули ДНК, що реплікуються у клітинах позахромосомно (плазмідні), так і молекули ДНК, що інтегруються у геном клітини (лінійні та кільцеві молекули ДНК). Генетично трансформовані клітини називаються **трансформантами**.

В процесі розмноження фагів у бактеріях інколи створюються часточки, що поряд з фаговою ДНК або замість неї містять фрагменти бактеріальної ДНК. Такі часточки мають назву **трансдукуючі**. За своїми властивостями вони не відрізняються від звичайних фагових віріонів (фагові часточки, складаються з ДНК, або РНК, і білка), але під час зараження ними нових клітин вони передають їм генетичні детермінанти попередніх господарів. Таким чином відбувається процес **трансдукції** – це перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта за допомогою фага.

Фаговий вектор вводить рекомбінантну ДНК за зараження клітини,

тобто методом інфекції, що значно ефективніше, ніж шляхом трансформації або трансдукції. Введення у клітину нуклеїнової кислоти вірусу з наступним утворенням вірусних нащадків, називається **трансфекцією**. Вірусні клони, що отримані після трансфекції, мають назву трансфектанти. Поряд з хромосомною ДНК в бактеріальній клітині може існувати і додатковий генетичний матеріал у вигляді плазмідної ДНК. Плазміди є репліконами і стабільно успадковуються, мають форму кільця, побудованого з двох ланцюгів ДНК.

2) Методи введення молекул ДНК у клітини тварин. Кон'югація – це процес генетичного обміну за якого здійснюється перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта за безпосереднім контактом клітин між собою (рис. 8).

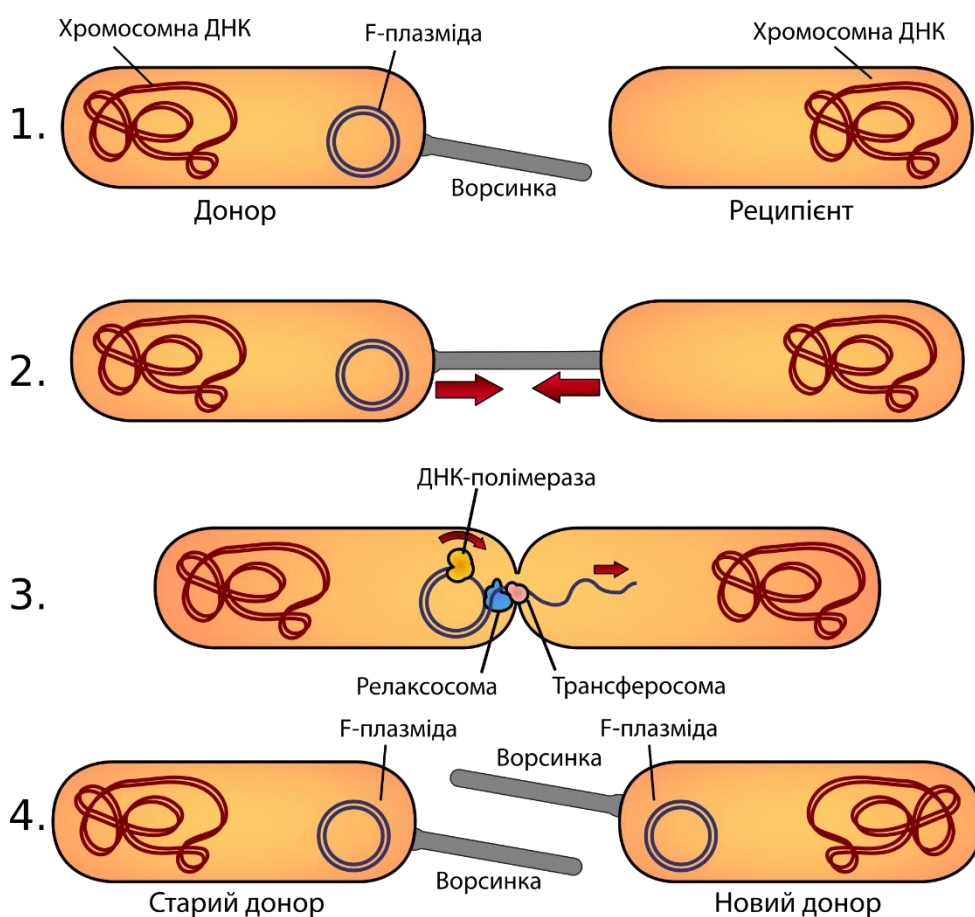


Рис. 8. Принципова схема бактеріальної кон'югації

За здатністю до перенесення плазміди поділяються на кон'югативні і некон'югативні. Кон'югативні плазміди містять так званий фактор

фертильності F.

Клітини, що містять цей фактор, почали називати клітинами F^+ , а клітини, які не містять цього фактора – клітинами F^- . Клітини з фактором F завжди є донорами генетичного матеріалу, а клітини, в яких цей фактор відсутній – реципієнти.

З клітини-донора в клітину-реципієнт переноситься лише одна нитка плазмідної ДНК, починаючи зі специфічного сайту $oriT$, де створюється одноланцюговий розрив. У наступному відбувається розподілення ланцюгів ДНК, яке необхідне для ініціації перенесення і комплементарного синтезу ДНК як у клітині-донора, так і у клітині-реципієнта. Етап завершення пов'язаний з утворенням кільцевих структур плазмідних ДНК. F-плазмід, також, сприяють перенесенню в клітини-реципієнти інших, некон'югативних плазмід, цей процес має назву – мобілізація. Таким чином, перенесення некон'югативних плазмід за рахунок кон'югативних – це процес **мобілізації**.

Клітини не завжди здатні до трансформації. Трансформуються лише компетентні клітини, що здатні адсорбувати і поглинати ДНК. У багатьох бактерій компетентність виникає лише на певному етапі росту культури – в стадії компетентності. Один з найважливіших етапів генетичної трансформації – це перенесення молекул ДНК через оболонку клітини. На стан компетентності клітин впливають різні фактори зовнішнього середовища. До них належать температура, рН, йони важких металів, осмотичний тиск та ін.

Компетентні клітини відрізняються від некомпетентних зміною властивостей клітинної оболонки. В них знижено поверхневий заряд, підвищено чутливість до осмотичного шоку. Мікроорганізми, в яких відсутня природна компетентність, також можуть бути трансформовані. Для цього клітини обробляють тим чи іншим способом для ініціації в них здатності до поглинання ДНК.

Найбільш поширений метод індукції компетентності у клітин *E. coli* – це обробка крижаним розчином $CaCl_2$. Використовують також спосіб глибокого заморожування з наступним відтаюванням клітин, що забезпечує збільшення проникненості для фагової, плазмідної і хромосомної ДНК. Метод

має назву **кріотрансформація**.

Метод електропорації. Електропорація (Electroporation) – утворення пор у мембранах клітин під дією електричного струму (рис. 9). Через ці пори до клітин проникає чужерідна ДНК.

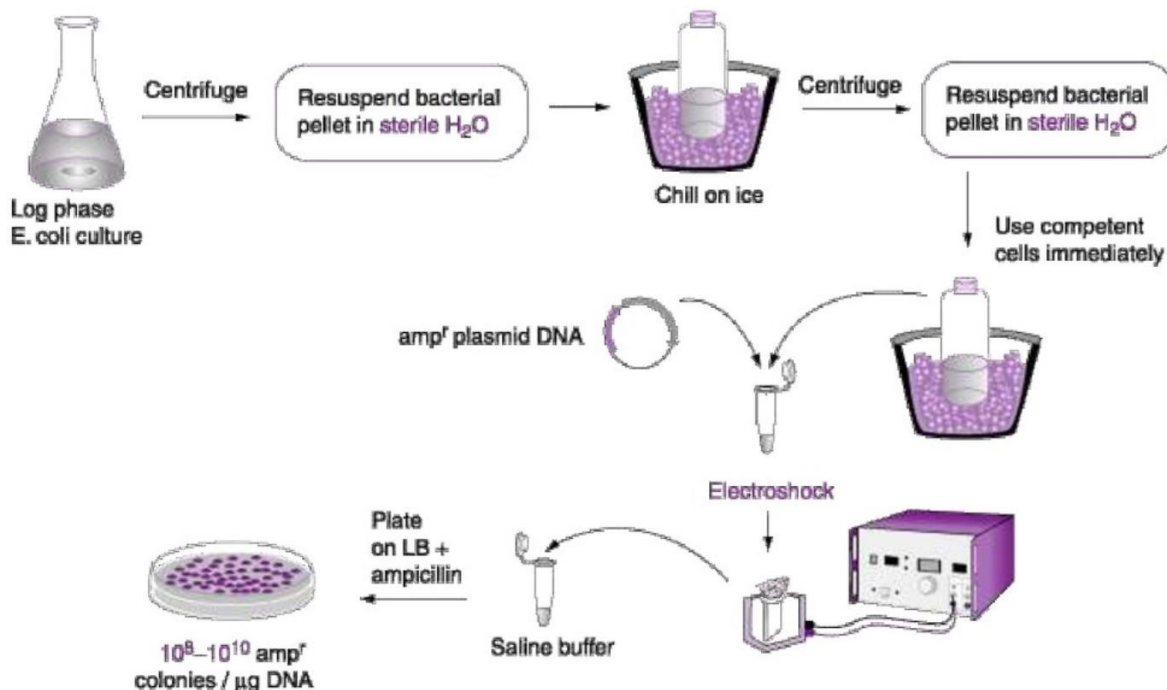


Рис. 9. Принципова схема проведення електропорації

Умови проведення електропорації різні для різних видів бактерій. За роботи з *E. coli* клітинну суспензію і ДНК розміщують у посудині з зануреними електродами і подають одиничний імпульс струму. Після цього ефективність трансформації збільшується до 10^9 для коротких плазмід (приблизно 3 т.п.н.) і до 10^6 для великих (приблизно 135 т.п.н.).

Метод мікроін'єкцій ДНК полягає у введенні чужорідної ДНК безпосередньо в ядро або цитоплазму клітини за допомогою мікроскопічної голки. Цей метод використовується для створення трансгенних організмів і дослідження функцій генів. Мікроін'єкції дозволяють точно контролювати кількість і місце введення ДНК, що забезпечує високу ефективність інтеграції гена в геном реципієнта.

Сьогодні для створення трансгенних тварин, зокрема, мишей найчастіше використовують метод мікроін'єкцій ДНК (рис. 10).



Рис. 10. Метод пронуклеарної мікроін'єкції

Він потребує таких дій:

1. Збільшення числа яйцеклітин, в які буде ін'єктована чужорідна ДНК шляхом стимуляції гіперовуляції у самок-донорів. Спочатку самкам вводять сироватку жеребної кобили (СЖК), а приблизно через 48 год. – хоріонічний гонадотропін людини. Внаслідок гіперовуляції утворюється приблизно 35 яйцеклітин замість звичайних 5...10.
2. Схрещування із самцями самок з гіперовуляцією і їхнє умертвіння. Вимивання з яйцепроводів запліднених яйцеклітин.
3. Мікроін'єкції ДНК у яйцеклітини, що запліднені – як правило, відразу після виділення. Часто трансгенна конструкція, що вводиться, перебуває в лінійній формі й не містить прокаріотичних векторних послідовностей.

Метод рекомбінації ембріональних стовбурових клітин, що

збирають з внутрішньої клітинної маси бластоцист та змішуються з рДНК (рис. 11).

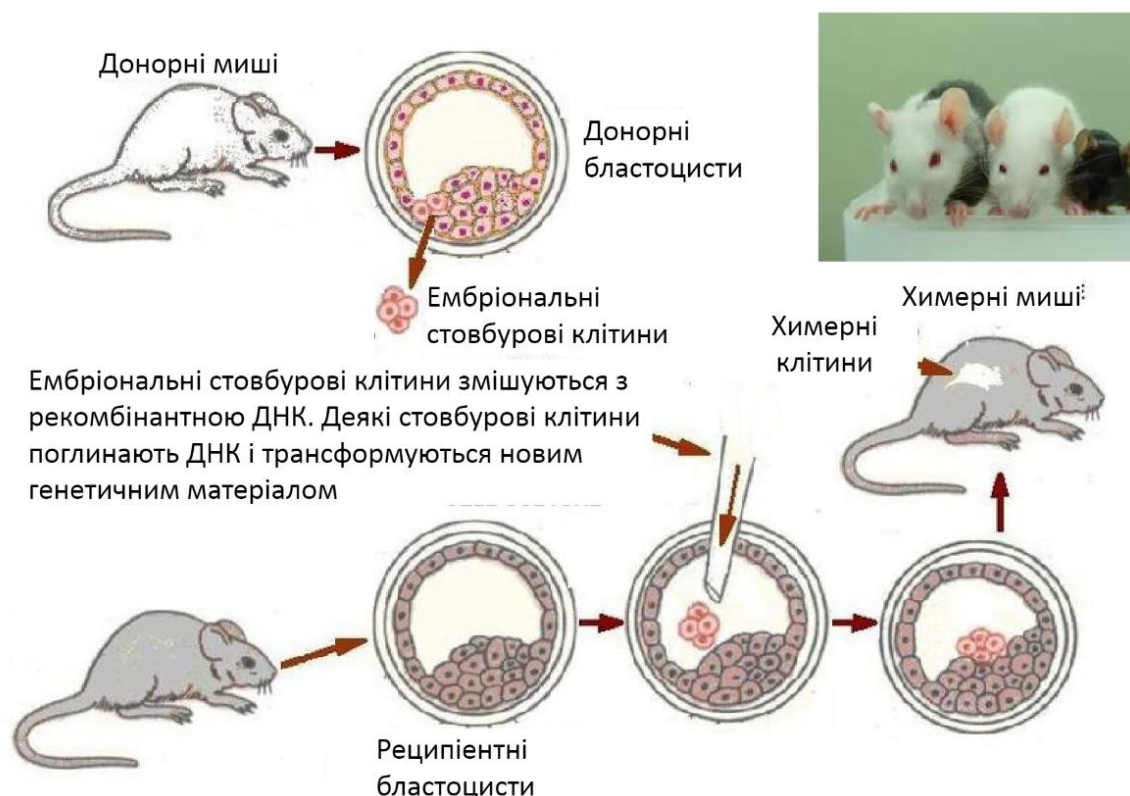


Рис. 11. Метод рекомбінації ембріональних стовбурових клітин

Деякі стовбурові клітини поглинають ДНК і трансформуються новим генетичним матеріалом. Потім ці трансформовані ембріональні стовбурові клітини вводять у внутрішню клітинну масу бластоцисти-господаря.

3) Методи введення молекул ДНК у клітини рослин.

Сучасні методи перенесення нових генів можна розділити на дві групи. До першої групи відносять методи введення генів за допомогою природних векторів (на основі Ti-, Ri-плазмід, вірусів і віроїдів), а до другої – прямі методи введення чужорідної ДНК у геном вищих рослин (пряма трансформація ізолюваних протопластів, мікроін'єкції, електропорація, упакування в ліпосоми, біолістика та інші). Для забезпечення експресії чужорідних генів і введення в рослинні клітини використовують різні промотори. Розроблені також методи вбудовування чужорідних генів безпосередньо в хлоропластну та мітохондріальну ДНК так, що кодований білок синтезується прямо в цих органелах.

Для прямого перенесення генів в рослинні клітини використовують трансформацію рослинних протопластів. Як маркерний ген використовують ген неоміцин фосфотрансфери, який визначає стійкість до канаміцину та деяким іншим аміно глікозидним антибіотикам. Перевагою даного гену є здатність тільки трансформованих клітин до росту та позеленінню на певних концентраціях антибіотиків.

Метод мікроін'єкції ДНК у рослинну клітину (рис. 12) застосовують для трансформації ізольованих протопластів, багатоклітинних структур (ембріодів, меристем, інтактного насіння) і генеративних клітин рослин.



Рис. 12. Мікроін'єкція ДНК у рослинну клітину

Для мікроін'єкцій використовують мікроголку з зовнішнім діаметром 2 мкм і внутрішнім 1-1,25 мкм. Об'єм ін'єкцій у кожний протопласт становить $(1-10) \cdot 10^{-4}$ мл, при концентрації ДНК – 0,1-1,0 мкг/мкл.

Метод агробактеріальної трансформації. Метод базується на трансформації рослинних експлантів агробактеріями, що несуть векторну конструкцію, яка містить чужерідний ген, вбудований в область рДНК. Агробактерії є природними переносниками генів в клітини рослин. Використання цих векторів дозволяє переносити чужерідні гени в клітини

рослин і потім регенерувати нормальні фертильні рослини, в більшості випадків через стадію калусоутворення або соматичних зародків при подальшій регенерації з них рослин (рис. 13). Ці стадії являються в значному ступені генотипово залежними.



Рис. 13. Принципова схема агробактеріальної трансформації

Як вихідний матеріал необхідно мати штам агробактерії з векторною конструкцією. Вектор повинен мати послідовність гену, який необхідно ввести в геном рослини. При цьому походження гену (прокаріотичний чи еукаріотичний) не важливо для трансформації проте він повинен знаходитись під контролем промотору, здатного експресуватись в рослинну клітину. Крім функціонального гену вектор повинен мати селективний маркер трансформації. Як маркер зазвичай використовують гени стійкості до канаміцину (ген *npt*), гігromіцину (ген *hpt*). Як експлант для трансформації використовують стерильні листкові диски, іноді використовують молоді корінці (арабідопсис), гіпокотилі (томати), сім'ядолі (томати, баклажани), міжвузля (картопля).

При використанні для агробактеріальної трансформації сформованих меристем є можливість отримувати трансгенні рослини незалежно від генотипу, так як регенерація рослин із меристем є найбільш простим прийомом в порівнянні з їх регенерацією із калусу або соматичних зародків.

Укорінення трансформованих пагонів, яке важке для деяких сортів, можна подолати шляхом їх прививання на укорінені підвої. Проволять інокуляцію експлантів в рідкому середовищі, яке містить агро бактерію з векторною конструкцією, час інокуляції підбирається для кожного виду

рослини індивідуально. При цьому проходить зараження тільки пораненої поверхні експланту. Після 1-2 діб кокультивування експланти переносять на середовище з антибіотиком, що призводить до загибелі не трансформованих клітин. Через 2-5 тижнів на трансформованому експланті розвиваються пагони, які молекулярно тестують, а потім переносять на середовище для укорінення.

Важливою проблемою при трансформації рослин є отримання частини трансгенних рослин, які є химерами, тобто їх тканини містять як трансформовані так і не трансформовані клітини. В даному випадку використовують один штам, який несе певний ген, яким інокують різні типи експлантів. Протягом довгого періоду часу вважали, що агробактерії здатні трансформувати тільки клітини голонасінних та дводольних рослин.

Однією із причин, що обмежують агробактеріальну трансформацію злаків є нездатність їх клітин до синтезу сполук, які індують процесинг та перенесення рДНК. Проте на сучасному етапі вже розроблена трансформація для пшениці, кукурудзи та рису. Порівняна простота отримання трансгенних рослин при агробактеріальній трансформації, можливість використання уже сформованих меристем та приємливість даної методики для трансформації злаків дають прогнозувати зростання кількості трансгенних рослин для теоретичних досліджень та практичного використання даного методу трансформації.

Лекція 4. Створення та скринінг клонотек. Характеристика продуктів клонування

- 1. Бібліотека ДНК та їх створення. Типи клонотек**
- 2. Ідентифікація та скринінг клонотек**
- 3. Визначення розміру гібридної ДНК. Картування сайтів для ендонуклеаз**
- 4. Секвенування ДНК**

1) Бібліотека ДНК та їх створення. Типи клонотек.

Бібліотека ДНК – сукупність фрагментів ДНК певного біологічного об'єкту (хромосоми, типу клітин, тканини, пухлини, організму тощо), які вставлені у генетичні вектори і розмножені до великої кількості.

Клонотека генів являє собою набір різних послідовностей нуклеотидів ДНК, клонованих у складі векторних молекул, які разом складають весь геном досліджуваного організму або якусь його частину. Репрезентативна клонотека повинна з високою ймовірністю містити будь-яку послідовність нуклеотидів вивчаємого генома.

Для більшості генів еукаріот характерна наявність інтронів і екзонів, причому інтрони, присутні в первинних транскриптах таких генів, вирізаються під час сплайсингу з утворенням зрілих молекул мРНК. Для експресії еукаріотичних генів у клітинах прокаріот, а також для вивчення тканеспецифічної експресії генів, необхідно отримати кодувальні послідовності еукаріотичних генів без інтронів. Це завдання вирішується шляхом створення репрезентативних клонотек кДНК, які з високою ймовірністю містять послідовності нуклеотидів мРНК, що синтезуються в тканинах, культурах тканин або окремих соматичних клітинах.

Існують два основних типи клонотек: геномні бібліотеки та бібліотеки кДНК:

- **Геномні бібліотеки** містять фрагменти всієї геномної ДНК

організму. Ці фрагменти включають як кодувальні, так і некодувальні ділянки ДНК. Геномні бібліотеки використовуються для вивчення повного генетичного складу організму, виявлення нових генів і аналізу структурних особливостей генома.

- **Бібліотеки кДНК** складаються з копій комплементарної ДНК (кДНК), синтезованої на основі зрілої матричної РНК (мРНК). Вони відображають лише кодувальні ділянки генів, активних в момент збору мРНК. Бібліотеки кДНК використовуються для дослідження експресії генів, вивчення функцій білків та створення рекомбінантних білків.

Мета біотехнологічних експериментів часто полягає в ідентифікації генів, які кодують певні білки (структурних генів). Оскільки у прокаріот кодуючі ділянки структурних генів безперервні, а в еукаріот кодуючі частини (екзони) розділені не кодуючими (інтронами), то за їх клонування використовуються різні методи.

У прокаріот сумарну ДНК гідролізують рестриктазою і кожен з отриманих фрагментів вбудовують у вектор. Потім необхідно виявити специфічну лінію клітин (клон), що містить необхідну послідовність, відділити її і охарактеризувати. Процес розподілення геномної ДНК на елементи для клонування, введення цих елементів до клітин-господарів має назву створення геномної бібліотеки. Повна бібліотека 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 випадково, 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 у підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом за

температури -70°C . Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років. Ампліфікацію бібліотеки (розмноження) геномних клонів, що отримано, а також розшук необхідного клону проводять при зараженні фагової бібліотекою бактеріальні клітини, які у подальшому висівають на чашках Петрі з агаризованим середовищем. За ємністю вектора 15 т.п.н. бібліотека може містити до 1 млн. фагових часточок. Перевірка мільйона фагових бляшок дозволяє перевірити весь геном на наявність необхідного гена. Так можна ідентифікувати напевно ті фагові часточки, що містять послідовність дослідженого гена, розмножити ДНК цієї послідовності й проводити з нею подальші маніпуляції.

2) Ідентифікація та скринінг клонотек. Наступний після створення бібліотеки етап – це розшук клонів, що містять необхідну послідовність ДНК. Для цього використовують три методи: гібридизацію з міченим ДНК-зондом з наступним радіоавтографічним аналізом; імунологічний скринінг (ідентифікація одиничного об'єкта шляхом перевірки чисельних об'єктів); скринінг за ефектом активності білка, що кодується геном – мішенню.

Імунологічний скринінг. За 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 за імунологічними методами. Всі клітинні лінії (клони) бібліотеки висівають на чашки з поживним середовищем. Колонії, що вирости, переносять на фільтр, клітини лізують (руйнують), а білки, що звільнилися, фіксують на фільтрі. Далі 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 інших антитіл з ферментом, під впливом якого відбувається гідроліз субстрату з утворенням забарвленої речовини в тому місці, де здійснюється реакція.

Скринінг за допомогою гібридизації. Необхідну нуклеотидну

послідовність у зразку ДНК можна виявити за допомогою ДНК-зонду, який з'єднується тільки з цільовою послідовністю. Метод ДНК-гібридизації (рис. 14) включає денатурацію ДНК-мішені для роз'єднання ланцюгів за допомогою тепла або лугів, після чого одноланцюгові молекули фіксують на твердій підложці (нітроцелюлозному або нейлоновому фільтрі).

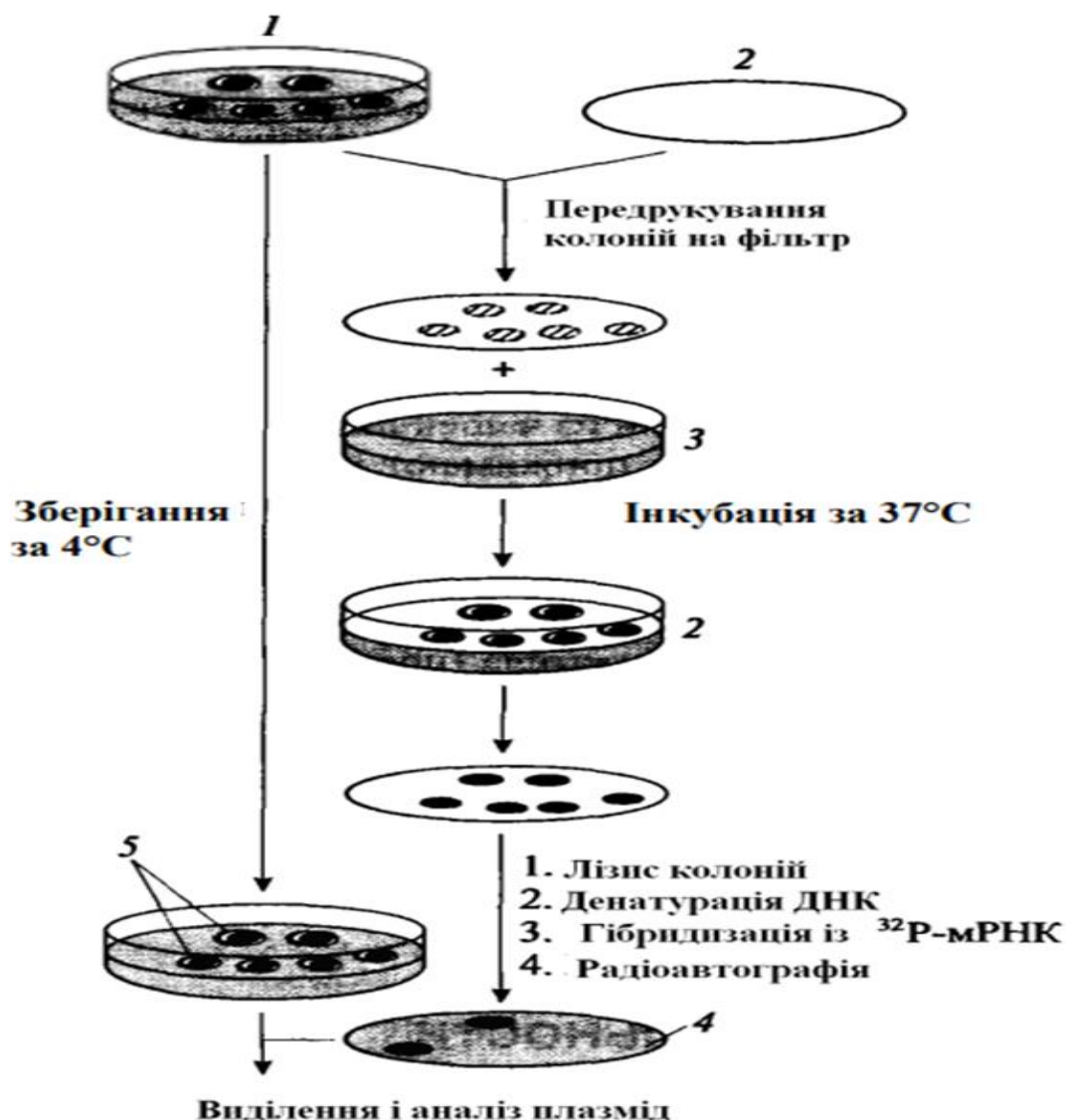


Рис.14. Принципова схема скринінгу за допомогою гібридизації

Потім фільтр інкубують з міченим одноланцюговим ДНК-зондом. Якщо зонд і ДНК-мішень комплементарні, вони спаровуються (гібридизуються), і гібридні молекули можна виявити радіографічним або іншими методами. Для гібридизації необхідно, щоб на ділянці завдовжки 50 нуклеотидів збігалось понад 80% з них. Мічені ДНК-зонди для скринінгу бібліотеки можна отримати або з клонованої ДНК близькоспорідненого організму (гетерологічний зонд), або методом хімічного синтезу, заснованого

на відомій амінокислотній послідовності білка цільового гена.

Скринінг за активністю білка. У разі, коли ген, що розшукується, кодує фермент, який не синтезується клітиною власником, використовують метод ідентифікації на чашках. Для виявлення клонів, які містять цей ген, клони *E. coli*, що складають геномну бібліотеку даного організму (клітини-власника), висівають на середовищі із специфічним субстратом. Клітини, що здатні утилізувати цей субстрат, після фарбування набувають певного забарвлення. Якщо ген, що розшукується, кодує продукт, без якого клітинавласник не здатна рости на мінімальному середовищі, то бібліотеку можна створювати методом трансформації мутантних клітин. Клони, що не містять цей ген, будуть гинути, а на мінімальному поживному середовищі залишаться лише клітини, до складу яких увійшов необхідний ген.

Блоттінг ДНК за Саузерном (блот-гібридизація). За створення клонотек генів хромосомну ДНК розрізають на фрагменти за допомогою рестриктаз. При цьому невідомо, чи містить ген, що розшукується, сайт або сайти розщеплення певної рестриктази. Якщо такі сайти є, то виділити цілий ген не вдається, і тому треба використовувати іншу рестриктазу. Однак, ще попередньо, без клонування у бактеріях, можна досліджувати структуру індивідуальних генів, визначити в них наявність тих чи інших сайтів рестрикції, встановити число копій даного гена у геномі. Метод блот-гібридизації (рис. 15), що використовується для цього, потребує наявності відповідної мРНК або кДНК.

Високомолекулярну хромосомну ДНК розщеплюють рестриктазою або їх набором, фрагменти розподіляють за довжиною електрофорезом в агарозному гелі, і гель поміщають на нітроцелюлозний лист. Далі змінюють напрям електрофорезу перпендикулярно, щоб ДНК перейшла на нітроцелюлозу, створюючи репліку з гелю. Потім на фільтрі проводять гібридизацію фрагментів хромосомної ДНК із зондом, який гібридизується лише з відповідними фрагментами. Смуги, де зонд зв'язався, виявляють радіографією. Одна смуга на автографі вказує на нерозщеплений ген, а інтенсивність смуги показує кількість копій гена.

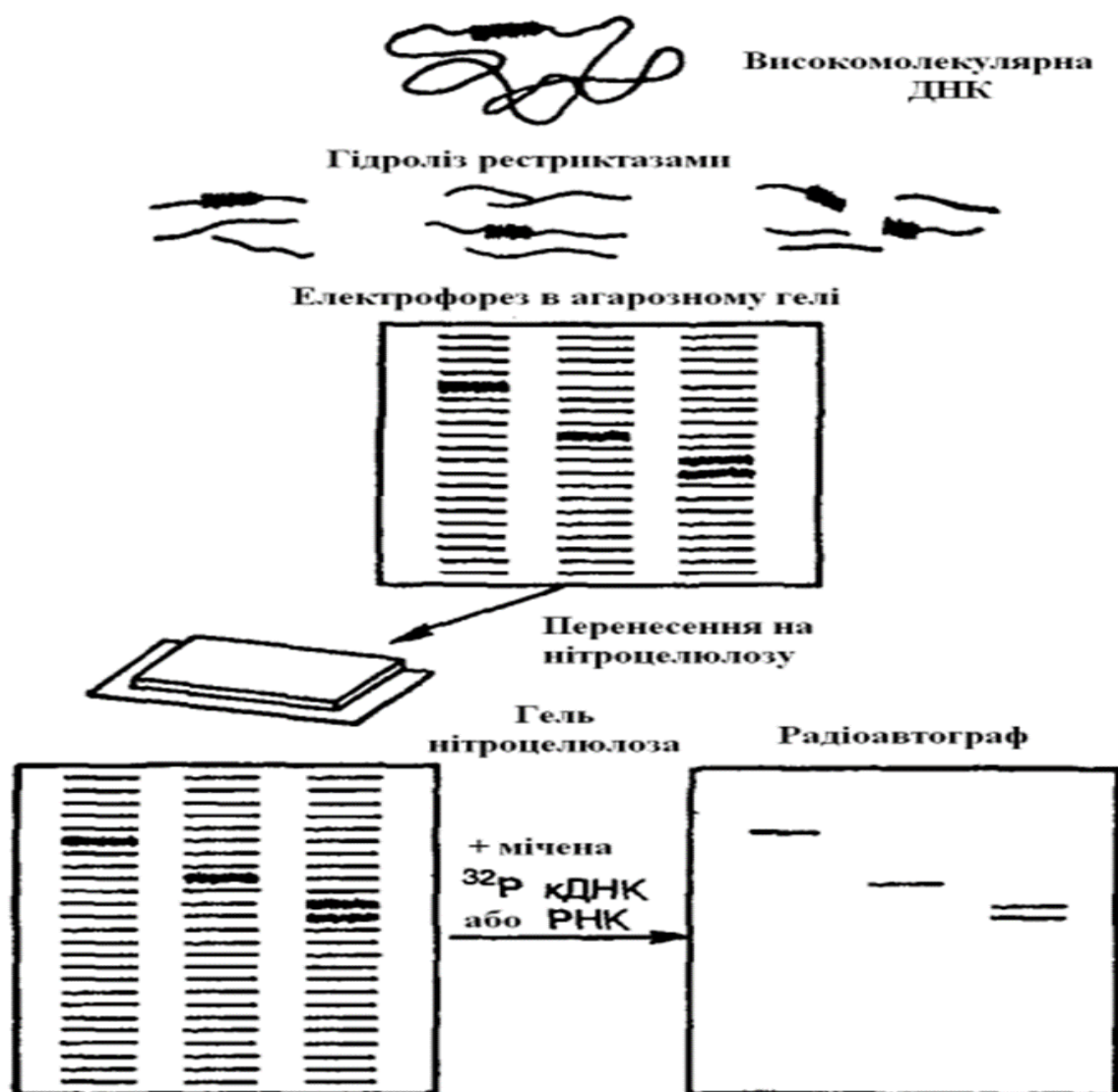


Рис.15. Принципова схема блоттінгу ДНК за Саузерном

Подібний метод використовується для аналізу клітинних мРНК, визначення їх відповідності зонду та кількості. Це доповнює техніку клонування ДНК, визначаючи ступінь відповідності ДНК зонду. Прокаріоти не можуть видаляти інтрони з первинних РНК-транскриптів, тому для правильного функціонування еукаріотичних генів у бактеріях потрібні прокаріотичні сигнальні послідовності.

Еукаріотичні мРНК мають модифіковані кінці: кепірований 5'-кінець і поліаденільований 3'-кінець, що дозволяє відокремити мРНК від рРНК і тРНК. Для цього сумарну РНК пропускають через колонку з тимідиновими олігонуклеотидами oligo(dT), до яких полі(А)-хвости мРНК спаровуються. Після промивання колонки мРНК вивільняється. Для вмонтування мРНК у

ДНК-вектор на ній синтезують дволанцюгову ДНК за допомогою зворотної транскриптази і фрагментів Кленова ДНК-полімерази I. Спочатку додають oligo(dT), зворотню транскриптазу і dNTP для синтезу комплементарного ланцюга. Зворотня транскриптаза каталізує синтез, утворюючи шпильку. Далі додають фрагмент Кленова для добудови другого ланцюга, а потім обробляють РНКазою H і нуклеазою SI для руйнування мРНК і відщеплення одноланцюгових кінців ДНК.

Отримана суміш містить комплементарні ДНК-копії (кДНК) мРНК. Різні кДНК можна вбудовувати у плазмідний вектор для створення кДНК-бібліотеки. Для скринінгу таких бібліотек використовують гібридизацію або імунологічні методи. Позитивні клони піддають подальшій перевірці для ідентифікації повнорозмірних послідовностей, що кодують цільовий білок.

3) Визначення розміру гібридної ДНК. Картування сайтів для ендонуклеаз. Визначення розміру гібридної ДНК здійснюється такими методами, як: гель-електрофорез, електронна мікроскопія, вирізання вставки за допомогою рестриктаз.

Гель-електрофорез. Розрізняють два різновиди електрофорезу: **катафорез** – випадок електрофорезу, при якому частинки дисперсної фази рухаються в напрямку катоду і **анафорез**, коли дисперсійні часточки рухаються до аноду. Сили електричного поля, що прикладаються до зразків, змушують фрагменти ДНК мігрувати крізь гель.

Для електрофоретичного аналізу ДНК зазвичай використовують агарозний (для відносно довгих молекул ДНК) і поліакриламідний (для високоточного розділення коротких молекул ДНК, наприклад, у випадку секвенування) гелі. Цукрофосфатні основи молекул ДНК заряджені негативно і тому ланцюги ДНК рухаються від катода, зарядженого негативно, до позитивного анода. Більш довгі молекули мігрують повільніше, оскільки затримуються в гелі, більш короткі молекули рухаються швидше. У рідкому розчині здійснити процедуру відокремлення фрагментів ДНК не можливо, тому в якості носія використовують гель-концентрований розчин полімеру.

Перед початком електрофорезу до зразків додають барвники з кислим значенням рН, такі як ксиленовий блакитний і бромфеноловий синій, для візуалізації ходу процесу та визначення його завершення. Електрофорез проводять у камері з буферним розчином, що містить ЕДТА, трис і борну або оцтову кислоти. Буфери TBE (tris-borate-EDTA) і TAE (tris-acetate-EDTA) використовують у робочих концентраціях 1х, при цьому їх маточні розчини мають концентрації 6х і 50х відповідно. Буфер підвищує іонну силу розчину для ефективного розділення ДНК під дією електричного поля.

Після розподілу фрагментів ДНК у гелі їх візуалізують флуоресцентними барвниками, такими як бромистий етидій, який інтеркалює між азотистими основами і флуоресціює в УФ-променях. Візуалізація створює набір смуг, кожна з яких відповідає певному фрагменту ДНК. Розміри фрагментів визначають шляхом порівняння зі стандартними фрагментами ДНК (DNA ladder). Рестрикційні ферменти перетворюють великі молекули ДНК у фрагменти довжиною від кількох сотень до кількох тисяч основ, які можна розділити методом електрофорезу і досліджувати окремо.

Електронна мікроскопія. Першим етапом є підготовка зразків. Для цього молекули ДНК наносять на спеціальні сітки, вкриті вугільною або іншою підходящою плівкою. Ця плівка забезпечує рівномірний розподіл зразків і покращує контрастність зображення. Для покращення видимості зразки можуть бути контрастовані важкими металами, такими як ураніл або свинець, які взаємодіють з ДНК і підвищують її видимість під мікроскопом.

Після нанесення зразків на сітки їх висушують і фіксують. Фіксація допомагає стабілізувати структуру ДНК і запобігає її пошкодженню під час аналізу. Висушування та фіксація також сприяють збереженню природної конформації молекул ДНК, що є важливим для точного вимірювання їх розмірів.

Наступним етапом є візуалізація зразків за допомогою електронного мікроскопа. Електронний мікроскоп використовує пучок електронів замість світла для створення зображення. Електрони, проходячи через зразок або розсіюючись на ньому, створюють контрастне зображення, яке можна

аналізувати. Завдяки високій роздільній здатності електронного мікроскопа, можна отримати детальні зображення молекул ДНК, що дозволяє точно виміряти їх довжину.

Після отримання зображень зразків наступас етап аналізу зображень. Отримані зображення аналізують для вимірювання довжини молекул ДНК. Це можна робити вручну, використовуючи спеціальні масштаби, нанесені на зображення, або за допомогою спеціального програмного забезпечення, яке автоматично вимірює довжину молекул ДНК. Важливо, щоб вимірювання проводилися з високою точністю, оскільки навіть невеликі похибки можуть вплинути на кінцевий результат.

Заключним етапом є порівняння виміряної довжини гібридної ДНК з еталонними значеннями. Що дозволяє точно оцінити розмір фрагментів ДНК, навіть якщо вони містять вставки або інші модифікації. Для цього використовуються стандартні зразки ДНК відомої довжини, які служать еталоном для порівняння. Завдяки цьому методу можна визначити точний розмір гібридної ДНК і отримати чітке уявлення про її структуру.

Вирізання вставки за допомогою рестриктаз. Спершу необхідно підготувати зразки ДНК і вибрати відповідні рестрикційні ферменти (рестриктази), які розрізають ДНК у специфічних нуклеотидних послідовностях. Рестриктази є ферментами, які розрізають ДНК в певних точках, що дозволяє отримати фрагменти ДНК різної довжини. Наприклад, рестриктаза EcoRI розрізає ДНК в місцях з послідовністю GAATTC.

Після вибору рестриктаз, зразки ДНК інкубують з цими ферментами у відповідних буферних розчинах при оптимальних для ферментів температурах. Ферменти розрізають ДНК в специфічних місцях, утворюючи фрагменти різної довжини. Цей процес дозволяє виділити гібридну ДНК з векторної молекули або інших фрагментів ДНК.

Наступним етапом є розділення отриманих фрагментів ДНК за допомогою гель-електрофорезу. Зразки ДНК завантажують у гель (зазвичай агарозний) і проводять електрофорез, де фрагменти ДНК мігрують через гель під дією електричного поля. Швидкість міграції залежить від розміру

фрагментів: менші фрагменти рухаються швидше, а більші – повільніше.

Після завершення електрофорезу гель забарвлюють для візуалізації фрагментів ДНК. Найчастіше використовують бромистий етидій, який флуоресцює під ультрафіолетовим світлом, що дозволяє побачити смуги ДНК у гелі. Отримані смуги відповідають фрагментам ДНК різної довжини.

Для визначення розміру фрагментів ДНК використовують стандартні маркери молекулярної маси (DNA ladder), які містять фрагменти ДНК відомої довжини. Порівнюючи міграцію досліджуваних зразків з маркерами, можна точно визначити розміри фрагментів гібридної ДНК. Цей процес дозволяє виявити вставки у гібридній ДНК та точно оцінити їх розмір.

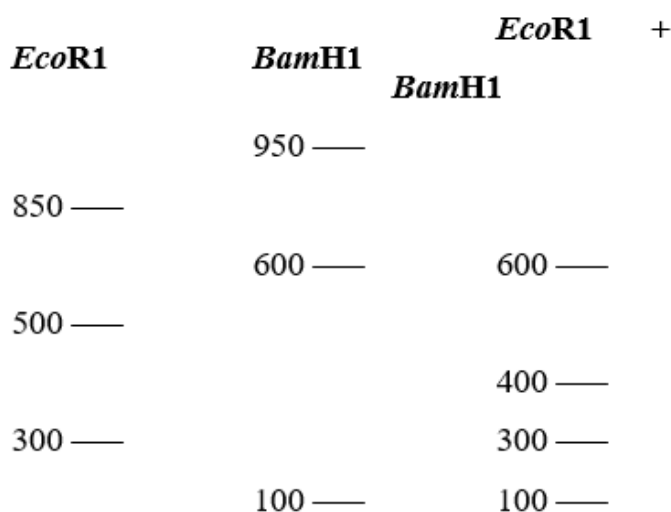
Картування сайтів рестрикції. Перша карта була отримана для вірусу SW 40 (вірус мавпи, який викликає злоякісну трансформацію), що містив 5423 пари основ. Використовували рестриктазу *Hind II*, яка розрізає кільцеву ДНК вірусу на 11 фрагментів. Проведення аналогічних маніпуляцій при використанні іншої рестриктази та подальше зіставлення отриманих результатів дозволили створити рестрикційну карту, в якій вказаний порядок розташування сайтів рестрикції.

Обробка зразка ДНК певною рестриктазою II класу завжди дає один той самий набір фрагментів – за умовою, що розщеплення відбувається по всіх сайтах розпізнавання. Якщо використовувати декілька ферментів рестрикції і спочатку обробляти ДНК кожною з рестриктаз окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК. Тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції уздовж молекули. Визначивши розмір отриманих фрагментів за допомогою гель-електрофезу можна знайти положення сайтів рестрикції (здійснити *картування*).

Для побудови рестрикційних карт, необхідно порівняти розміри фрагментів, отриманих при роздільній рестрикції, тобто рестрикції, що відбулася під впливом кожної з рестриктаз окремо, і при рестрикції сумішню ферментів. На рис.16. вказані розміри фрагментів, отриманих в результаті розщеплення ДНК даними рестриктазами та їх сумішню. З отриманих даних випливає, що вказана ділянка ДНК має по два сайти для *EcoR1* і *BamH1*.

4) Секвенування ДНК Секвенування методом термінації ланцюга за допомогою капілярного електрофорезу. Цей метод, відомий також як «дидезокси метод», був розроблений F. Sanger у 1970-х роках. У 1985 році метод був удосконалений, коли радіоактивні мітки замінили на флуоресцентні (рис. 16).

А



Б

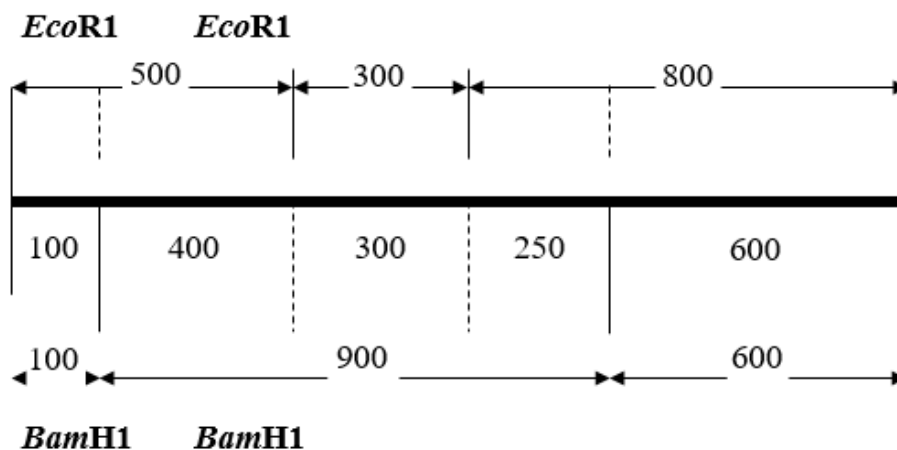


Рис.16. Картування сайтів рестрикції:

А – електрофореграма рестриктів;

Б – рестрикційна карта, побудована на основі результатів електрофорезу

Особливість методу полягає у використанні модифікованих дезоксирибонуклеотидів, кожен з яких має свою флуоресцентну мітку. Під час синтезу комплементарної ДНК, включення такого нуклеотиду зупиняє подальше подовження ланцюга. Ці модифіковані нуклеотиди присутні у реакційній суміші в менших кількостях, ніж звичайні, що дозволяє отримати

фрагменти ДНК, які починаються в одному місці, але закінчуються в різних положеннях уздовж матриці ДНК.

Автоматичні секвенатори розділяють ці фрагменти за розміром, пропускаючи їх через капіляри, наповнені гелем, у електричному полі. Кожен фрагмент освітлюється лазером, що викликає свічення флуоресцентної мітки на його кінці, і таким чином визначаються послідовності всіх фрагментів. Відносно невисока вартість, точність і простота автоматизації роблять цей метод популярним у лабораторіях. Він дозволяє за один цикл визначити послідовність ДНК довжиною до 1000 пар нуклеотидів з точністю до 98 %. На початку ХХІ століття капілярні секвенатори досягли максимальної продуктивності, і моделі «MegaBACE 4500» та «3730xl DNA Analyzer» здатні секвенувати тисячі фрагментів ДНК за добу з точністю 95–98 %. Хоча метод термінації ланцюга використовувався для секвенування першого геному людини, він виявився дуже дорогим і повільним для таких масштабів.

Піросеквенування ДНК. Метод піросеквенування заснований на визначенні пірофосфату, що утворюється під час синтезу комплементарного ланцюга ДНК. У 1988 році Е. Нуман запропонував використовувати цей метод для секвенування, а в 1996 році Р. Nygård і М. Ronaghi завершили його детальну розробку.

У процесі піросеквенування до розчину по черзі додають чотири типи нуклеотидів, які змивають після кожної реакції. При включенні чергового нуклеотиду в комплементарний ланцюг ДНК відбувається детекція пірофосфату шляхом зв'язування його з білком люциферазою, що призводить до отримання світлового сигналу. Послідовність нуклеотидів визначається за світловими сигналами у вигляді піків на пірограмі, інтенсивність яких пропорційна кількості вбудованих нуклеотидів одного типу.

Прості хімічні реакції та надійна система детекції виключають потребу в гелях, електрофорезі та флуоресцентних мітках. Корпорація «Biotage AB» розробила систему «PyroMark Q96 ID», яка може визначити послідовність ДНК з точністю до 99 % за 1 годину для 96 зразків. Реагенти вводяться за допомогою струйного принтера в лунки планшета з зразками і розщеплюються

ферментом апіразою.

Однак метод не дозволяє якісно визначити довжину фрагментів ДНК більше 200 пар нуклеотидів і точно визначити кількість однакових нуклеотидів більше шести підряд. Цей метод ефективний для швидкого визначення коротких послідовностей ДНК і РНК, виявлення одиничних мутацій, повторного секвенування тощо, що знижує час і вартість дослідження порівняно з капілярним електрофорезом.

Секвенування на молекулярних кластерах з використанням флуоресцентно мічених попередників. У 2005 році компанія «Illumina» запропонувала метод секвенування ДНК на молекулярних кластерах з використанням флуоресцентно мічених попередників, реалізований у платформі «Solexa». У цьому методі фрагменти ДНК-матриці фіксують на підкладці разом із праймерами і проводять їх ампліфікацію, в результаті чого утворюється близько 1000 копій навколо кожного вихідного фрагмента ДНК. Загалом на підкладці утворюється до мільярда таких скупчень – кластерів (рис. 17).

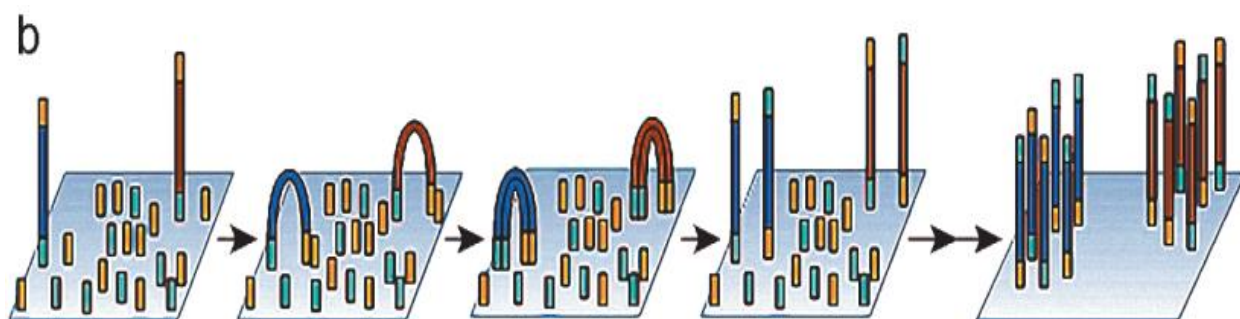


Рис. 17. Технологія Solexa використовує кластерну ПЛР на підложці, поверхню вкривають праймери двох типів, з'єднані з нею лінкерами

Далі ДНК денатурують і секвенують її одониткові фрагменти. Для цього додають вільні праймери та термінуючі нуклеотиди всіх чотирьох типів, мічені флуоресцентними барвниками різних кольорів, щоб до кожного одониткового фрагмента ДНК приєднався праймер і лише один нуклеотид, колір якого визначають за допомогою лазера. Потім приєднаний нуклеотид хімічно модифікують, щоб до нього міг приєднатися наступний термінуючий нуклеотид, і так продовжують синтез комплементарного ланцюга, одночасно

детектуючи флуоресценцію з багатьох сотень мільйонів точок-кластерів.

Довжина одного фрагмента ДНК, секвенованого цим методом, досягає 300 пар нуклеотидів із точністю 99 %. Остання система секвенування від компанії «Illumina» – «HiSeq X» – здатна за один цикл секвенувати до 16 повних геномів людини з 30-кратним покриттям (1600 мільярдів пар нуклеотидів) із консенсусною точністю до 99,999 %.

Технологія секвенування однієї молекули. У 2008 році компанія «Helicos BioSciences» вперше продемонструвала метод секвенування нуклеотидної послідовності одиничних фрагментів ДНК без їх попередньої ампліфікації на своєму приладі. Ця технологія «tSMS» (true Single Molecule Sequencing) має дуже високу чутливість завдяки низькому фоновому світінню поверхні підкладки, спеціальним реагентам і способу візуалізації.

За новим методом ДНК розділяється на невеликі фрагменти, до одного з кінців кожного фрагмента прикріплюють довгу послідовність з молекул аденіну зі світною міткою. На спеціальну підкладку прикріплюють послідовності з молекул тиміну на такій відстані, щоб можна було аналізувати кожен фрагмент окремо. Коли зразки розподіляють на підкладці, відбувається комплементарне зв'язування тиміну з аденіновими послідовностями, що зв'язані з фрагментами ДНК. Далі підкладку сканують, і за світінням міток визначають положення кожного фрагмента молекули ДНК. Потім мітку видаляють і по черзі додають кожен з чотирьох типів мічених нуклеотидів, детектуючи світіння в місцях зв'язування. Після цього мітки видаляють і вводять наступний тип мічених нуклеотидів. Таким чином, нуклеотид за нуклеотидом, послідовність добудовується по комплементарному ланцюгу ДНК, що дозволяє секвенувати фрагменти довжиною до 55 пар нуклеотидів. Комп'ютер записує положення мільйонів спалахів після кожної реакції. Така система забезпечує прочитання мільярдів нуклеотидів на добу з точністю до 99,999 % при 20-кратному перекритті.

Проте прилад, заснований на цій технології («Heli Score»), виявився занадто дорогим, витрата реагентів високою, а довжина прочитання нуклеотидних послідовностей малою. У листопаді 2012 року компанія

«Helicos Bioscience» була визнана банкрутом і припинила своє існування.

Напівпровідне секвенування. У 2010 році компанія «Ion Torrent» (тепер частина корпорації «Life Technologies») представила метод секвенування ДНК на напівпровідниковому чіпі (Semiconductor sequencing). Цей метод не потребує модифікації нуклеотидних основ або використання хемілюмінесцентних чи флуоресцентних міток. Коли нуклеотид включається у комплементарний ланцюг ДНК полімеразою, виділяється іон водню, що змінює рН реакційної суміші. Визначення цієї зміни рН є основою детекції послідовності нуклеотидів.

Підготовка проб ДНК для цього методу майже не відрізняється від підготовки для лігазного секвенування. Попередня емульсійна ПЛР необхідна для підсилення сигналу про зміну рН. Це зміна рН у кожній лунці чіпа відображає близько мільйона копій одного з вихідних ДНК-фрагментів, прикріплених до поверхні мікросфери. Підготовлену таким чином бібліотеку ДНК денатурують і розподіляють на мікроелектронний чіп, який має мільйони мікролунок (одна лунка – одна мікросфера) з іончутливою поверхнею, пов'язаною з датчиками. Потім послідовно додають реакційні суміші, які містять лише один із чотирьох типів нуклеотидів, і детектують зміну рН у лунках, де відбулося вбудовування цих нуклеотидів у комплементарні ланцюги ДНК.

Секвенатор «Personal Genome Machine» (PGM), заснований на цій технології, здатний за один цикл визначити до 2 мільярдів пар нуклеотидів, при цьому довжина одного прочитання перевищує 400 пар нуклеотидів із точністю 99,5 %. Метод напівпровідникового секвенування швидко вдосконалюється і за останні два роки збільшив свою продуктивність у 100 разів.

Лекція 5. Оптимізація експресії генів, клонованих у прокаріотичних системах

1. Експресія генів та шляхи її підвищення
2. Досягнення високого рівня трансляції генів
3. Стабілізація мРНК та білкового продукту. Химерні білки

1) Експресія генів та шляхи її підвищення. Гени тих продуктів, які необхідні клітині постійно, такі як гени ферментів основних метаболічних шляхів, експресуються на більш-менш постійному рівні в кожній клітині організму. Такі гени називають генами «домашнього господарства». Постійна експресія гена називається **конститутивною експресією**. Концентрація продуктів інших генів збільшується і зменшується у відповідь на молекулярні сигнали; це регульована експресія гена. Гени, концентрація продуктів яких збільшується при особливих обставинах, відносяться до індукцибельних; збільшення експресії називається **індукцією**.

Контроль експресії генів здійснюється на наступних рівнях (рис. 18):

- на рівні транскрипції (контролюється час і характер транскрипції гена);
- на рівні процесингу первинного транскрипту;
- при відборі зрілих мРНК для їх транспорту в цитоплазму;
- на рівні трансляції - відбір в цитоплазмі мРНК для трансляції на рибосомах;
- на рівні активності білка - селективна активація, інактивація або компартментація молекул білка після їх синтезу.



Рис. 18. Схема процесу експресії генів

Експресія генів як у прокаріот, так і у еукаріот регулюється за допомогою цілого ряду механізмів. Деякі з механізмів такого роду, що діють в бактерійних системах, вивчені досить добре, і два з них будуть розглянуті нижче, але про те, як діє регуляторні механізми в клітках еукаріот, відомо небагато.

Біотехнологічні процеси вимагають оптимізації процесу експресії. Окрім більш менш постійного статусу експресії, активність багатьох генів може швидко мінятися під дією спеціальних регуляторів. Шляхи підвищення експресії генів передбачають застосування різноманітних актуалізованих методів. Наприклад, використання векторів з потужними промоторами, такими як T7, CMV, SV40 або EF1 α , може значно підвищити рівень транскрипції гена. Зміна послідовності нуклеотидів гена без зміни амінокислотної послідовності білка може підвищити ефективність трансляції. Це включає використання оптимальних кодонів для конкретного організму-хазяїна.

Використання різних систем експресії, таких як бактеріальні (*E. coli*), дріжджові (*Saccharomyces cerevisiae*), рослинні або тваринні клітини, може впливати на рівень експресії. Кожна система має свої переваги і недоліки. Використання потужних рибосомних зв'язуючих сайтів (RBS) або оптимізація 5'-UTR і 3'-UTR може підвищити ефективність трансляції мРНК. Використання стабільних мРНК або впровадження стабілізуючих елементів, таких як внутрішньоклітинні стабілізаційні послідовності, може зменшити деградацію мРНК і підвищити рівень білка. В деяких випадках необхідно забезпечити правильне згортання та модифікацію білків.

Використання шаперонів або коекспресія модифікуючих ферментів може допомогти в цьому. Використання векторів з можливістю реплікації або інтеграції у геном хазяїна може підвищити кількість копій гена у клітині. Оптимізація умов культивування, таких як температура, рН, наявність індукторів та інших факторів, може сприяти підвищенню експресії.

Використання індукцибельних систем експресії дозволяє контролювати

час і рівень експресії гена. Наприклад, системи на основі лак-оперона або тет-оперона. Ідентифікація і видалення або інгібування елементів, що знижують експресію гена, таких як сайти зв'язування репресорів. Ці методи можуть бути застосовані окремо або в комбінації для досягнення оптимального рівня експресії клонованого гена.

2) Досягнення високого рівня трансляції генів. У прокаріотичних клітинах ефективність трансляції різних мРНК неоднакова. Сильна керована транскрипція необхідна, але недостатня умова високого рівня експресії трансгена. Другою умовою є розташування перед трансгеном оптимального сайту ініціації трансляції, або сайту зв'язування рибосоми RBS (ribosome binding site).

У прокаріотів RBS має у своєму складі старт-кодон (AUG, рідше GUG, UUG) і розташовану на відстані 4-8 нуклетидів від нього послідовність Шайна-Далгарно (SD) (6-9 нуклеотидів), комплементарну 3-кінцю малої 16S субодиниці рРНК. Ядром SD-послідовності є AGGA- Збільшення відстані між SD-послідовністю та старт-кодомом навіть на один нуклеотид може різко вплинути на ефективність експресії

Ефективність активації трансляції також залежить від локальної вторинної структури 5-кінця мРНК RBS і декілька перших триплетів трансгена не повинні мати таку послідовність, при якій може проходити спарювання всередині ланцюга (див. рис. 19).

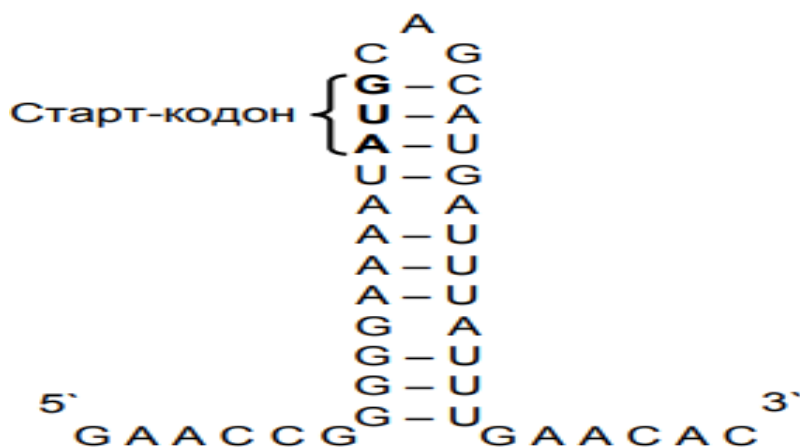


Рис. 19. Внутрішньоланцюгове спарювання в молекулі мРНК, у результаті якого відбувається екранування кодона AUG

При цьому відбувається екранування старт-кодона. Тому сайт зв'язування з рибосомою для кожного трансгена добирається індивідуально, з урахуванням нуклеотидної послідовності його №-кінцевої ділянки. Не менш важливе є відстань SD-послідовності до 5'-кінця мРНК, що має перевищувати 15 нуклеотидів.

Для ефективної трансляції транскрипт повинен бути стабільним і містити такі (оптимальні) кодони, які відповідають антикодонам клітинних тРНК. Затримка рибосоми на якомусь з кодонів, які рідко використовуються в клітині, через брак тРНК може призвести до включення у поліпептид помилкової амінокислоти, зсуву рамки зчитування чи термінації трансляції. Оптимальними мають бути стоп-кодони. Оптимізацію кодонів можна проводити хімічним синтезом такого варіанту клонованого гена або його частини, який складається з кодонів, що зазвичай використовуються клітиною-хазяїном. Проте ефект заміни синонімічних триплетів непередбачуваний. При цьому потрібно враховувати структуру прилеглої ділянки, ймовірність утворення «шпильок» і SD-сайтів у кодуючій послідовності тощо. Загальна стратегія інтеграції трансгена представлена на рис. 20:

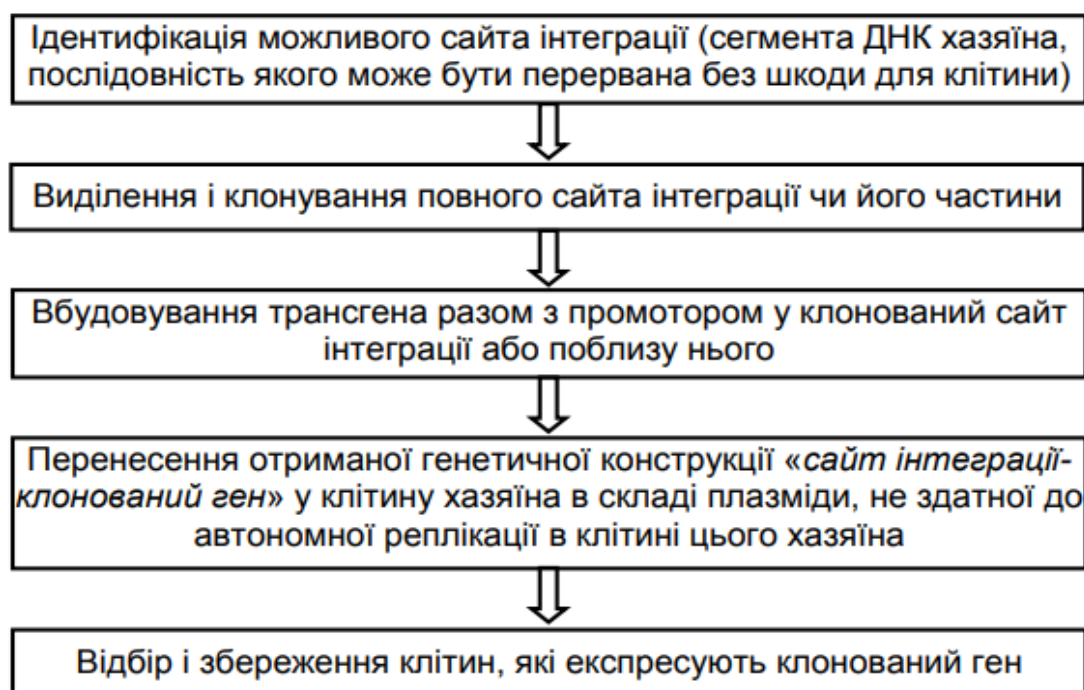


Рис. 20. Блок-схема інтеграції клонованого гена в геном хазяїна

При інтеграції клонованого гена в геном хазяїна мають бути виконані такі умови:

1. сайт інтеграції клонованого гена не повинен знаходитися всередині гена, що кодує якусь важливу клітинну функцію;
2. для забезпечення експресії клонований ген має знаходитися під контролем сильного (керованого) промотора;
3. для інтеграції у відповідний сайт клонований ген має містити нуклеотидну послідовність понад 50 нуклеотидів, подібну до такої в геномній ДНК, у межах якої відбудеться рекомбінація;
4. інтеграція клонованого гена не повинна відбуватися у високоваріабельних ділянках генома клітини-хазяїна.

3) Стабілізація мРНК та білкового продукту. Химерні білки. Проблема стабілізації генно-інженерних білків виникає при використанні будь-яких векторів, включаючи й вірусні. Навіть за умови високого рівня транскрипції і трансляції клонованого гена концентрація білкового продукту може бути мінімальною. На стабільність синтезованого рекомбінантного білка в клітині впливають різноманітні чинники, основним з яких є діяльність протеаз.

Протеази не можуть бути вилучені з експресійної системи, оскільки вони виконують низку важливих для клітини функцій, зокрема здійснюють процесинг білків, перетворюють білки-попередники у функціонально активні білки, відщеплюють №-кінцевий фермілметіонін гідролізують нефункціональні чи денатуровані молекули тощо. Клітинні протеази також здатні гідролізувати надлишок функціонально активних субодиниць олігомерних білків і більшість чужорідних рекомбінантних поліпептидів.

Подовжити термін існування поліпептиду можна шляхом його **олігомеризації**. Так, час напіврозпаду рекомбінантного проінсуліну в клітинах *E. coli* становить 2 хв., а його тетрамера 120 хв. Також для збільшення часу існування білка до його складу генно-інженерними методами можна включити відповідні амінокислоти. Інколи достатньо приєднати до -кінця

один амінокислотний залишок.

Стабільність білків у клітині також залежить від амінокислотних послідовностей у внутрішній частині поліпептида. PEST-послідовність послідовність у внутрішній частині білкової молекули, збагачена залишками проліну (P), глутамінової кислоти (E), серину (S) та треоніну (T), яка робить білок більш чутливим до протеолітичного розщеплення. Часто PEST-послідовності фланковані кластерами позитивно заряджених амінокислотних залишків і, можливо, є маркерами для протеаз. Збільшити час існування білків, які містять PEST- послідовності, можна вносячи зміни у відповідні гени. Проте при цьому необхідно переконатися, що такі зміни не вплинуть на функціональну активність білка.

Химерний білок – це штучна конструкція, в якій продукт клонованого гена ковалентно приєднаний до якого-небудь стабільного білка клітини-хазяїна. У складі химерного білка продукт трансгена виявляється захищеним від розщеплення клітинними протеазами. Стабілізований таким чином рекомбінантний білок може використовуватися або в складі химерного білка, або, переважно, окремо. Якщо передбачається використовувати продукт трансгена в складі химерного білка, потрібно враховувати такі **особливості**:

- продукт клонованого гена може виявитися неактивним;
- для химерних білків передбачено складнішу процедуру тестування, яку вони мають пройти перш ніж буде отримано дозвіл на використання такого продукту.

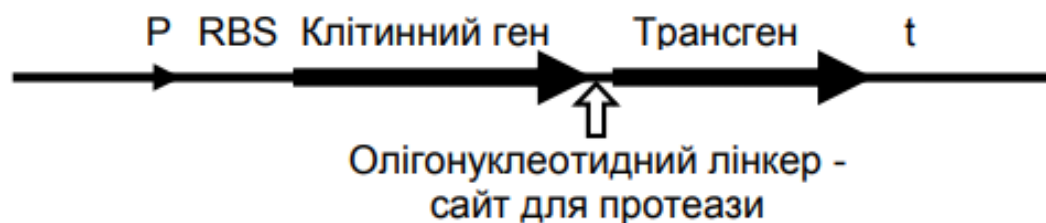


Рис. 21. Принципова схематична карта ділянки вектора, що кодує химерний білок

При використанні рекомбінантного білка окремо постає необхідність видалення зайвих амінокислотних послідовностей із молекули отриманого продукту. Об'єднання білків програмується на рівні ДНК (рис. 21).

До клонованого гена приєднують олігонуклеотидний лінкер, в якому міститься сайт для протеази, Як правило, небактеріального походження, після чого лігують нуклеотидні послідовності обох білків. Обидві послідовності знаходяться під контролем спільних регуляторів транскрипції промотора (P), сайта зв'язування рибосоми (RBS) і термінатора. Тому важливо, щоб у такій конструкції не відбувалося зсуву рамки зчитування. Для цього необхідно знати точну нуклеотидну послідовність фрагментів ДНК, що лігуються.

Для **очистки химерних білків** зручно застосовувати імуноафінну хроматографію з використанням моноклональних антитіл до клітинного поліпептиду. Після накопичення й очистки химерного білка, для роз'єднання пептидів їх обробляють відповідною протеазою.

Лекція 6. Отримання рекомбінантних білків за допомогою еукаріотичних систем

- 1. Системи експресії *Saccharomyces cerevisiae***
- 2. Системи експресії з використанням культур клітин комах**
- 3. Системи експресії з використанням культур клітин ссавців**

1) Системи експресії *Saccharomyces cerevisiae*. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* – це непатогенні одноклітинні мікроорганізми з діаметром клітини приблизно 5 мкм, які в багатьох відносинах являють собою еукаріотичний аналог *E. coli*. Їх генетика, молекулярна біологія і метаболізм детально вивчені. *S. cerevisiae* розмножуються брунькуванням і добре ростуть на таких же простих середовищі, як і *E. coli*. Сьогодні, з використанням дріжджових клітин отримані інтерферони, а також компоненти вакцин.

Для отримання функціонально активних еукаріотичних білків потрібні спеціальні ензиматичні системи, які відсутні у прокаріот. Еукаріотичні білки зазнають специфічних посттрансляційних модифікацій – глікозилювання, фосфорилювання чи ацетилювання та інших для набуття біологічно активної форми. Тому було розроблено нову стратегію у клонуванні генів за допомогою спеціально сконструйованих еукаріотичних експресибельних векторів.

Для цього було використано дріжджі *S. cerevisiae*, геном яких добре вивчений, і, до того ж, є розроблена промислова технологія їх культивування у біореакторах. Щоб спростити очистку білків, були сконструйовані вектори, що забезпечують їхню секрецію клітинами *S. cerevisiae*, у результаті чого було отримано багато різноманітних аутентичних білків. Однак чимало рекомбінантних білків у цій системі не зазнавали посттрансляційних модифікацій, і до того ж їх вихід був невисокий.

Saccharomyces cerevisiae є популярною моделлю для експресії білків завдяки своїй здатності до глікозилювання, що дозволяє отримувати більш функціональні білки, схожі на ті, що синтезуються у вищих організмах. Вектори для експресії в *S. cerevisiae* можуть бути плазмідними або

інтеграційними. Плазмідні вектори (рис. 22.) легко маніпулюються та можуть містити різні селективні маркери, такі як гени стійкості до антибіотиків або гени, що дозволяють вирощувати клітини на спеціальних поживних середовищах. Інтеграційні вектори вбудовуються в геном дріжджів і забезпечують стабільну експресію гена.

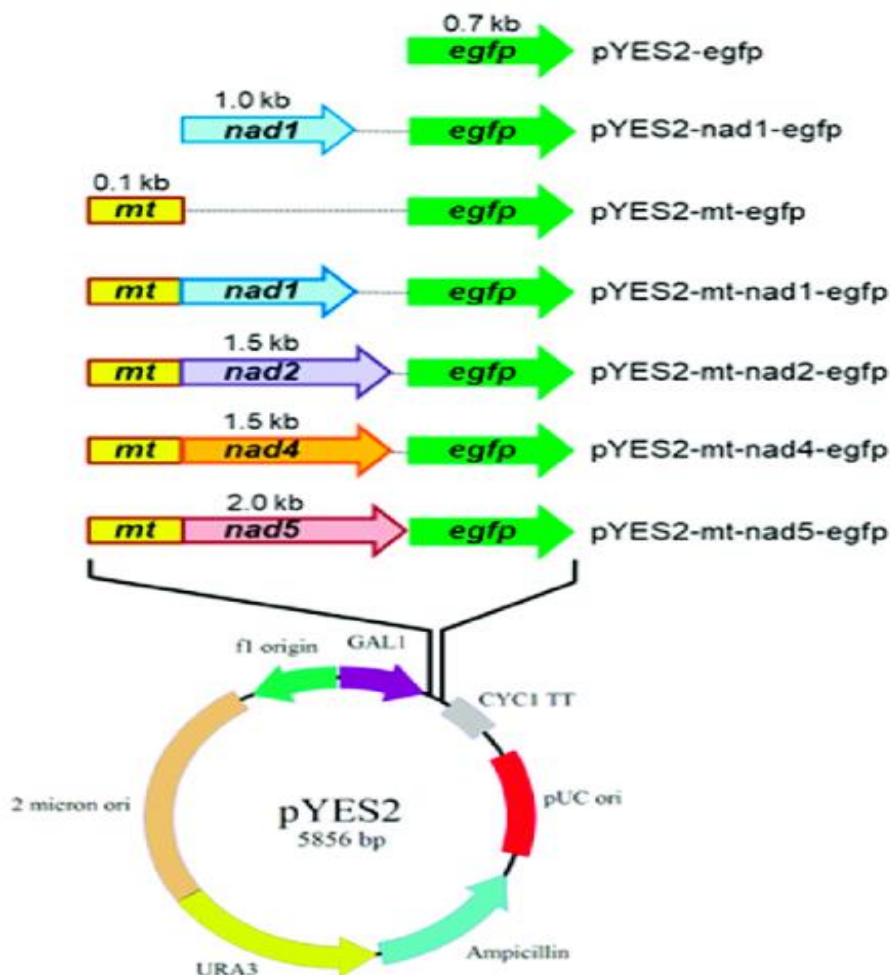


Рис. 22. Схематична діаграма плазмідних векторів, трансформованих у *S. Cerevisiae*.

мтДНК-кодовані cDNA nad1, nad2, nad4 і nad5 були вставлені у плазмиду pYES2-mt-egfp. mt: ген, що націлює на мітохондрії; egfp: ген підсиленого зеленого флуоресцентного білка; GAL1: промотор гена дріжджів GAL1; CYC1 TT: термінатор транскрипції; pUC ori: основа для реплікації в *E. coli*; ампіцилін: ген стійкості до ампіциліну; URA3: ген оротидин-5-фосфатдекарбоксилази; 2 мікрон ori: основа для підтримки та висококопійної реплікації у дріжджів; f1 origin: основа для фага F1.

Молекули тРНК дріжджів *S. cerevisiae* дозрівають (зазнають сплайсингу) у цитоплазмі з подальшим експортом у ядро і поверненням до цитоплазми, тому в такому випадку коректним є термін «посттранскрипційна

модифікація». Але у фаховій літературі частіше використовують термін «процесинг тРНК».

Промотори є ключовими елементами, які визначають рівень експресії гена. У *S. cerevisiae* використовуються як конститутивні, так і індукцибельні промотори. Конститутивні промотори, такі як промотор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH), забезпечують постійний високий рівень експресії. Індукцибельні промотори, такі як промотор гена GAL1, активуються у присутності специфічних індукторів, таких як галактоза, що дозволяє контролювати час і рівень експресії гена. Також, системи експресії в *S. cerevisiae* містять сигнальні пептиди для секреції білків у середовище, що спрощує їх виділення та очищення. Прикладом є сигнальний пептид α -амілази з дріжджів, який ефективно спрямовує білки на секрецію.

Крім *S. cerevisiae* поширеними дріжджевими господарями є *Pichia pastoris* та *Hansenula polymorpha*. Клітини дріжджів не містять ендотоксинів та пірогенних речовин клітинної стінки, синтезовані білки не накопичуються у вигляді тілець-включень.

2) Системи експресії з використанням культур клітин комах. Було розроблено інші дріжджові системи для синтезу рекомбінантних білків, зокрема на основі бакуловіруса AcMNPV, який інфікує клітини багатьох комах. У результаті трансфекції клітин комах транспозибельним вектором з клонованим геном, який є фланкований AcMNPV-специфічними послідовностями, відбувається подвійний кросинговер між вектором і геном AcMNPV. Результатом інтеграції клонованого гена є його вбудовування в ген AcMNPV і потрапляння під контроль сильного промотора, що функціонує на останніх стадіях літичного циклу. Клітини комах, інфіковані рекомбінантним бакуловірусом, синтезують гетерологічний білок.

На основі бакуловірусів розроблена більш досконала система експресії – бакміда – човниковий вектор *E. coli* / клітини-комахи, який уможливорює виконання усіх генно-інженерних маніпуляцій у клітинах *E. coli*. Для цього клітини комах трансфікують рекомбінантною бакмідою тільки для отримання

гетерологічного білка. За використання експресибельної системи отримують приблизно 95 % гетерологічних білків із відповідними посттрансляційними модифікаціями.

Отже, для інфікованих бакуловірусом клітин комах характерний високий вихід функціонального білка, такі культури клітин не потребують наявності сироватки в поживному середовищі, що спрощує очистку цільового продукту. Розміри геному бакуловірусів варіюються в межах 80 – 180 т. п. н., що дозволяє вміщати великі вставки. Однак отримання білка з використанням цієї системи дороговартісне та займає багато часу, одним із обмежень є неможливість здійснювати посттрансляційні модифікації великих об'ємів білків.

3) Системи експресії з використанням культур клітин ссавців. Позахромосомні експресибельні вектори ссавців здебільшого використовують для синтезу гетерологічних білків, які використовуються для науково-дослідницьких потреб, біомедицині, діагностиці. Вони є човниковими векторами із сайтами ініціації реплікації вірусу тварин і *E. coli*-плазміді. Регуляторні елементи транскрипції здебільшого походять від геному вірусу тварин чи ссавців. Для відбору трансфікованих клітин використовують домінантні селективні маркерні гени. Наприклад, деякі системи добору базуються на введенні у середовище зростаючої кількості цитотоксичної сполуки. Остання забезпечує добір клітин із великою кількістю копій вектора, що сприяє збільшенню синтезу гетерологічного білка.

Розроблено системи експресії генів ссавців, що дають можливість отримувати гетеродимерні білки. Для цього клітини трансфікують одразу двома векторами, кожен з яких містить ген однієї субодиниці. Альтернативний підхід полягає у використанні одного вектора, який містив ці два гени у вигляді окремих одиниць транскрипції, чи у вигляді одного транскриптона з обома генами.

З еукаріотичних клітин тваринного походження як системи експресії найчастіше використовують лінії клітин яєчника китайського хом'яка (СНО),

клітини нирки хом'ячати (ВНК) та клітини мієломи миші (NS0). Також застосовують лінії людського походження: клітини ембріональної нирки людини (HEK-293) та клітини отримані з сітківки ока (PER-C6). Причиною популярності клітин ссавців є їхня здатність правильно здійснювати посттрансляційні модифікації, що включають протеолітичну обробку, утворення дисульфідних зв'язків, глікозилювання, с-карбоксилування, b-гідроксилування, O-сульфатування та амідування. Однак, у цих ліній є низка вагомих недоліків: клітини не досягають високої щільності, присутній високий ризик контамінації, та необхідні дорогі поживні середовища зі специфічними факторами росту.

Лекція 7. Точковий мутагенез та генна інженерія білків

- 1. Точковий мутагенез: ДНК фага M13, плазмідна ДНК**
- 2. Нуклеотид-направлений мутагенез з використанням ПЛР-ампліфікації**
- 3. Випадковий мутагенез: «вироджені» олігонуклеотидні праймери, аналоги нуклеотидів**
- 4. Генна інженерія білків**

Мутації – це успадковані зміни структури генома. Процес виникнення мутацій, заснований на різних механізмах, називають **мутагенезом**. Внесення специфічних змін у кодуючі послідовності ДНК, що ведуть до певних змін в амінокислотних послідовностях, називається **спрямованим мутагенезом**. Для спрямованого мутагенезу клонованих генів використовують різні експериментальні підходи:

1. вносять зміни у специфічні сайти клонованого гена (сайт-специфічний мутагенез);
2. випадково змінюють короткий фрагмент клонованого гена (випадковий мутагенез).

1) Точковий мутагенез: ДНК фага M13, плазмідна ДНК.

Одним із найпростіших методів внесення точкових мутацій в клонований ген є сайт-специфічний (олігонуклеотид-спрямований) мутагенез. Для його проведення необхідно знати: 1) точну нуклеотидну послідовність тієї ділянки ДНК, яку потрібно змінити і 2) характер амінокислотних замін.

Традиційна схема сайт-специфічного мутагенезу:

- фрагмент ДНК, у якому необхідно отримати мутацію, переводять в одониткову форму на будь-якому фаговому векторі;
- синтезують олігонуклеотид розміром 7–21 п.н. (синтез олігонуклеотидів – лінкерів, адаптерів, праймерів, промоторів – здійснюють хімічним способом, нарощуючи їх ланцюги шляхом приєднання певних ланок

до заданої послідовності). Синтезований олігонуклеотид має бути комплементарний сайту ДНК, у якому передбачається ввести мутацію. При цьому дослідник може внести різні точкові мутації – делеції, вставки, транзиції і трансверсії, які мають бути в центральній частині олігонуклеотиду;

- олігонуклеотид гібридизують з одноланцюговою фаговою ДНК і використовують для синтезу *in vitro* другого ланцюга ДНК. Ці маніпуляції здійснюють за допомогою *Klenow*-фрагмента ДНК;

- за допомогою лігази отримують ковалентно замкнуте кільце фагової ДНК, нуклеази *S1* усувають незавершені продукти синтезу;

- кільцевою ДНК трансформують сферопласти *E. coli*. Після трансформації та подальшого акту реплікації потомство аналізують на наявність клітин дикого типу і мутантів (їх співвідношення має бути рівним 1:1). Вихід мутантів можна збільшити, якщо сумарну ДНК, виділену з фагів, повторно використовувати для синтезу *in vitro* за допомогою тих самих синтетичних праймерів.

Існує кілька типів олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу з використанням: ДНК фага M13, плазмідної ДНК, ПЛР-ампліфікації. Конструювання *in vitro* має на меті створення клітинних клонів, які містять рекомбінантні молекули ДНК із заданими властивостями.

Для конструювання таких організмів розроблені спеціальні методи маніпулювання генами *in vitro*. Основними інструментами генно-інженерних маніпуляцій є:

1. ензими, що діють на ДНК;
2. вектори на основі плазмід і фагів;
3. штучні олігонуклеотиди (лінкери, адаптери, праймери, промотори, зонди тощо), за допомогою яких об'єднують, синтезують, виявляють і аналізують гени.

Точковий мутагенез за використання ДНК фага M13. Стандартний метод ДНК-фінгерпринту з використанням ДНК фага M13 дозволяє прослідкувати до 9 алельних варіантів геному свині, що поступається іншим

зондам.

Нитковидні бактеріофаги M13 та споріднені з ним fd і f1 придатні для клонування одноланцюгових ДНК, які можуть бути безпосередньо використані для визначення нуклеотидної послідовності. Генوم фага M13 складається з 6407 нуклеотидів і містить 10 генів, 7 з яких залучені до морфогенезу капсиду (рис. 23).

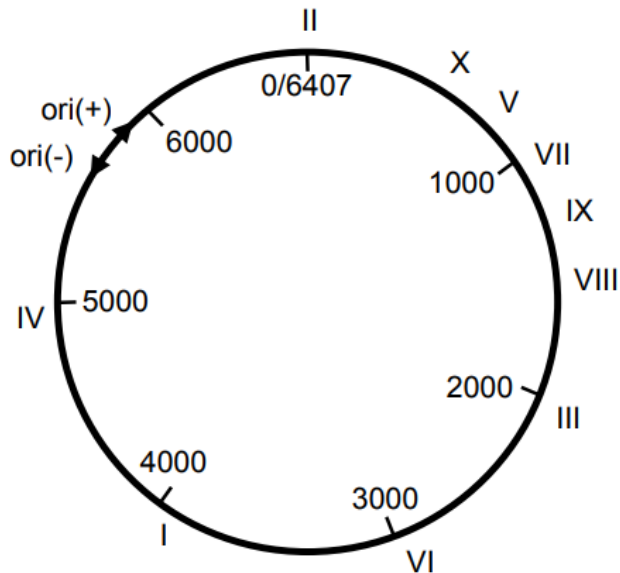


Рис. 23. Генетична карта фага M13

Віріон фага білкова трубка розміром 1000×6 нм, побудована з білка VIII, всередині якої знаходиться молекула кільцевої одноланцюгової ДНК. Білок-лоцман рIII – забезпечує адсорбцію фага на F-пілі, через яку фагова ДНК в комплексі з білком-лоцманом потрапляє всередину клітини. Між генами II та IV (див. рис.23.) знаходиться спейсер, на якому розташовано сайт рас, необхідний для морфогенезу, і два ori-сайти. Один з них, ori(-), використовується для добудови в клітині комплементарного геномному (-)-ланцюга ДНК, в результаті чого утворюється реплікативна форма (РФ). РФ реплікується з участю білка II клітинною репліказою за механізмом «кільця, що котиться», досягаючи близько 200 копій на клітину.

Після цього одноланцюгові кільцеві молекули (+) ДНК вкриваються димерами білка V, взаємодіють з білком-лоцманом і транспортуються у периплазматичний простір. При проходженні через плазматичну мембрану білок V заміщується капсидним білком VIII. Розмір віріона залежить від

довжини фагового генома і може змінюватися в досить широких межах. Вірусні частки секретуються клітиною постійно без її лізису. Вірус затримує ріст культури на 25-50%.

Переваги фага M13 для створення векторів включають такі аспекти:

1. у геномі фага між генами II і IV розташовується міжгенна ділянка - спейсер, куди можна вбудовувати чужорідні гени;
2. розмір капсиду залежить від розміру ДНК, що упаковується, тобто можна клонувати великі фрагменти;
3. M13 продукується клітиною постійно, його концентрація може сягати 10 часток в 1 мл;
4. у складі M13-вектора зручно клонувати одноланцюгову ДНК для визначення нуклеотидної послідовності.

Недоліком M13-векторів є нестабільність ДНК, що в них клонується. Це пов'язано з тим, що фаги з великими вставками розвиваються повільніше.

Загалом, конструювання векторних ДНК здійснюється з використанням дволанцюгових РФ. Стратегія створення векторів полягає у вбудовуванні в спейсерну ділянку унікальних сайтів рестрикції та селективних маркерів.

Точковий мутагенез за використання плазмідної ДНК. Останніми роками досягнуто значних успіхів у конструюванні плазмідних векторів для клонування в клітинах *B. subtilis*. Основною складністю при створенні плазмідних векторів для цих бактерій є те, що більшість з них, не містить селективних маркерів і є генетично нестабільними.

Однак деякі мультикопіювальні плазмідні *Staphylococcus* і *Streptococcus*, що мають гени стійкості до антибіотиків, можуть трансформувати клітини *B. subtilis*, стабільно у них реплікуватися і експресувати гени. Однією з них є мультикопіювальна плазміда pUB110, виділена з *St. aureus*. Вона має розмір 4,5 т.п.н. і містить гени стійкості до неоміцину і флеоміцину. Є інші мультикопійні плазмідні, здатні реплікуватися і стабільно підтримуватися у клітинах грампозитивних бактерій: pE194 (3,7 т.п.н.; Em^R), pT127 (4,5 т.п.н.; Tc^R), pC 194 (2,8 т.п.н.; Cm^R).

Зокрема, у 1980 р. на основі плазмід pBR322 і PUB110 сконструювали бірепліконний вектор pJJ10. Цей плазмідний вектор трансформує обидва типи клітин, однак експресія його генів нерівнозначна. Стійкість до канаміцину проявляється як в *E. coli* так і в *B. subtilis*. Гени Cm^r і Km^r бацилярних плазмід проявляються як в *E. coli*, так і в бацилах, тоді як ген Ap^r експресується тільки в клітинах природного господаря – *E. coli*. На жаль, ці вектори не відрізнялися функціональною і структурною нестабільністю, яка була пов'язана з тим, що використовувалися реплікатори, які не специфічні для *B. subtilis*.

Сьогодні описано надзвичайно багато плазмід для стрептоміцетів, які відрізняються своїми властивостями: високо- і низькокопійні, транс- і нетрансмісійні, криптичні і лікарської стійкості і ін. Серед мультикопіювальних векторів перевагу віддають векторам на основі pIJ101, оскільки вони добре вивчені і мають високу трансформаційну активність. Ця плазміда *Streptomyces* має найширшу господарську специфічність і високу копіювальність (40–300 копій на клітину). Плазміда pUC6 є криптичною і виділена з клітин *S. espinosus*. Вона представлена у клітині 30–40 копіями, хоча отриманий її делеційний варіант, який дає до 600 копій (найбільш високо копіювальний вектор *Streptomyces*).

Низькокопіювальні вектори мають один суттєвий недолік: складність отримання великої кількості ДНК. Із таких плазмід у *Streptomyces* найбільше використовують SLP1.2, представлену 4–5 копіями. Отримано похідні цієї плазмиди, що містять селективні маркери стійкості до тиострептонію і неоміцину. Плазміда містить унікальні сайти для рестриктаз BamHI і PstI. Клонування у цих сайтах веде до експресії чутливого до неоміцину фенотипу.

2) Нуклеотид-направлений мутагенез з використанням ПЛР-ампліфікації. У тих випадках, коли не вдається підібрати ендонуклеазу рестрикції для ідентифікації мутацій методом ПДРФ, використовується один з варіантів методу ПЛР – метод наведення відповідного сайту рестрикції шляхом сайт-спрямованого мутагенезу за допомогою ПЛР із неповністю гомологічними нуклеотидній послідовності

ДНК-матриціолігонуклеотидними праймерами. Аналіз послідовності досліджуваних генів на наявність сайтів впізнавання для ендонуклеаз рестрикції проводили з використанням програми Invitrogen Vector NTI Advance 10.

Отже, метод дозволяє цілеспрямовано змінювати нуклеотидні послідовності і, таким чином, досліджувати функції генів та білків. Спочатку синтезують олігонуклеотидні праймери, що містять бажану мутацію. Ці праймери повинні бути комплементарними до ділянки цільової ДНК, але містити заміну одного або кількох нуклеотидів. Після синтезу праймерів проводять ПЛР, де використовують ці праймери для ампліфікації цільової ДНК. Під час ПЛР відбувається синтез нової ДНК, що містить введені мутації.

Після ампліфікації отримані ПЛР-продукти очищують і використовують для трансформації клітин (найчастіше бактерій). Трансформовані клітини вирощують на селективних середовищах для відбору клітин, що містять мутантну ДНК. Далі, за допомогою секвенування, підтверджують наявність мутації у цільовій ділянці ДНК.

Метод має високу точність і дозволяє отримувати точкові мутації, інсерції або делеції, у генах. Використання високоточних термостабільних ДНК-полімераз, таких як Pfu або Phusion, забезпечує мінімальну кількість помилок під час ампліфікації. Крім того, метод сайт-спрямованого мутагенезу є відносно швидким і простим у виконанні, що робить його перспективним у сфері молекулярної біотехнології.

3) Випадковий мутагенез: «вироджені» олігонуклеотидні праймери, аналоги нуклеотидів. Вважається, що спонтанні мутації виникають мимовільно протягом усього життя організму в нормальних для нього умовах навколишнього середовища. При цьому широке розповсюдження дістала думка про те, що спонтанні мутації в еукаріотичних клітинах виникають із частотою $10^{-9} \dots 10^{-12}$ на нуклеотид за клітинну генерацію. Однак, наразі відомо, що такі значення не відображають реальності. Оскільки не враховують того факту, що частоти спонтанних

мутацій можуть істотно (на кілька порядків) змінюватися від локуса до локуса й, швидше за все, вказують на нижню межу частоти мутацій в окремих найбільш стабільних ділянках генома.

Випадковий мутагенез з використанням «вироджених» олігонуклеотидних праймерів є методом створення бібліотек генів з випадковими мутаціями, що дозволяє досліджувати функції білків, виявляти активні центри ферментів та розробляти нові білки з бажаними властивостями.

Методика передбачає використання праймерів, що містять вироджені позиції, де кожен нуклеотид може бути замінений на будь-який з чотирьох можливих (A, T, G, C). Такі праймери синтезуються хімічно, з включенням змішаних нуклеотидів у вироджені позиції, що дозволяє отримати суміш ДНК з різними послідовностями. Під час ПЛР ці праймери використовуються для ампліфікації цільового гена, що призводить до включення випадкових мутацій у його послідовність. Отримані ПЛР-продукти, що містять мутації, далі клонуються у відповідні вектори і трансформуються у клітини-хазяїни, наприклад бактерії або дріжджі. Після цього створюється бібліотека мутантних генів, кожен з яких кодує білок з відмінними амінокислотними послідовностями.

Бібліотека підлягає подальшому скринінгу або селекції для виявлення мутантів з бажаними властивостями. Випадковий мутагенез за допомогою вироджених праймерів є потужним інструментом у дослідженнях білкової інженерії, дозволяючи створювати різноманітні варіанти білків і досліджувати їх функціональні характеристики.

Випадковий мутагенез з використанням аналогів нуклеотидів. Структурні аналоги нуклеотидів, а також різні метаболіти можуть замінювати природні субстрати та витіснити їх з певних ланок окремих ланцюгів ферментативних перетворень, однак повноцінно замінити їх при виконанні специфічних функцій не можуть. Це зумовлює гальмування метаболічних перетворень різних сполук: синтез, розклад, транспорт метаболітів і, як наслідок, порушення процесів обміну.

Випадковий мутагенез з використанням аналогів нуклеотидів дозволяє

дослідникам генерувати мутації на випадкових позиціях в геномі, що є важливим для вивчення функцій генів, білків та шляхів клітинних сигналів. Аналоги нуклеотидів, які є модифікованими версіями природних нуклеотидів, використовуються для індукування мутацій під час процесу реплікації ДНК.

Механізм полягає в тому, що аналоги нуклеотидів включаються в ДНК під час реплікації, але мають дещо змінену хімічну структуру порівняно з природними нуклеотидами. Це призводить до помилок під час копіювання ДНК-полімеразою, що в свою чергу генерує мутації. Наприклад, 5-бром-урацил (5BU) є аналогом тиміну, який може спаровуватися з аденіном або гуаніном, викликаючи переходи пар основ (A:T до G:C і навпаки) під час реплікації. Такий метод мутагенезу є особливо корисним для створення бібліотек ДНК мутантів, які потім можуть бути скринінговані для виявлення нових або покращених біохімічних властивостей білків або для вивчення генетичних шляхів. Наприклад, випадковий мутагенез був використаний для покращення активності ферментів, стійкості до інгібіторів або зміни субстратної специфічності.

Крім 5-бром-урацилу, інші приклади аналогів нуклеотидів включають 2-аміноаденін, який може спаровуватися з тиміном і цитозином, та 8-оксогуанін, який може спаровуватися з аденіном. Ці аналоги можуть бути введені в клітину або організм шляхом різних методів, таких як трансформація плазмідної ДНК або інфекція вірусами, що несуть мутагенні послідовності.

Важливість випадкового мутагенезу з використанням аналогів нуклеотидів в біотехнології та медицині важко переоцінити. Він дозволяє вченим створювати варіанти генів та білків, які могли б бути важливими для розробки нових терапевтичних стратегій або промислових біокаталізаторів. Актуальні наукові дослідження з цієї тематики включають роботи, спрямовані на вдосконалення методів доставки аналогів нуклеотидів до клітин та зниження побічних ефектів від їх використання.

Наприклад, у статті "Random Mutagenesis Using Nucleotide Analogues" дослідники детально розглядають методологічні аспекти використання аналогів нуклеотидів для створення мутацій у бактеріальних системах, що

дозволяє оптимізувати виробництво ферментів з новими властивостями (Smith & Johnson, 2023). Інші дослідження, такі як "Advances in Nucleotide Analogue Mutagenesis for Protein Engineering" (Lee et al., 2022), описують сучасні досягнення у використанні цього методу для інженерії білків з покращеними каталітичними властивостями.

4) Генна інженерія білків. Генна інженерія білків – це складний і багатогранний процес, що дозволяє модифікувати білки для отримання нових або покращених функціональних властивостей. Методи ген-інженерії білків включають: утворення додаткових дисульфідних зв'язків, заміну аспарагіну на інші амінокислоти, зменшення числа вільних сульфгідрильних груп, підвищення ферментативної активності, зміну потреби ферментів у металевих кофакторах, зміну специфічності ферментів, а також підвищення стабільності і специфічності ферментів.

Утворення додаткових дисульфідних зв'язків – це один з підходів для підвищення стабільності білків. Дисульфідні зв'язки утворюються між двома залишками цистеїну, і ці ковалентні зв'язки можуть зміцнювати третинну структуру білка, роблячи його більш стійким до денатурації та деградації. Створення нових дисульфідних зв'язків вимагає точного розташування цистеїнів у білковій послідовності, що можна досягти за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу.

Заміна аспарагіну на інші амінокислоти може бути використана для зменшення деградації білка або покращення його стабільності. Аспарагін схильний до дезамідування, що може призводити до утворення нестабільних продуктів. Заміна аспарагіну на інші стабільні амінокислоти, такі як глутамін або аланін, може покращити стабільність білка і подовжити його функціональну тривалість.

Зменшення числа вільних сульфгідрильних груп. Вільні сульфгідрильні групи можуть призводити до утворення неспецифічних дисульфідних зв'язків, що викликає агрегацію або неправильне згортання білків. Заміна цистеїнів, які утворюють вільні сульфгідрильні групи, на інші

амінокислоти, наприклад серин, допомагає уникнути цих проблем.

Підвищення ферментативної активності може бути досягнуто шляхом модифікації активного центру ферменту. Цей підхід включає зміну амінокислот, що безпосередньо беруть участь у каталізі, для збільшення їх ефективності. Такі модифікації можуть збільшити швидкість реакції або х...ю...змінити оптимальні умови для ферменту.

Зміна потреби ферментів у металевих кофакторах. Деякі ферменти залежать від специфічних металевих іонів для своєї активності. Замінюючи амінокислоти, що зв'язують ці іони, на ті, що зв'язують інші метали, можна змінити металеву залежність ферменту і оптимізувати його активність у нових умовах.

Зміна специфічності ферментів включає зміну амінокислот у субстрат-зв'язуючій ділянці ферменту, щоб він міг взаємодіяти з іншими субстратами. Такі модифікації дозволяють ферментам каталізувати нові реакції або підвищити ефективність у вже відомих.

Підвищення специфічності ферментів. Модифікуючи активні або субстрат-зв'язуючі ділянки ферменту, можна змінити його субстратну специфічність, що дозволяє використовувати фермент для нових біохімічних процесів або покращити його ефективність для існуючих.

Підвищення стабільності ферментів досягається шляхом зміцнення їх структури. Це може включати створення додаткових водневих зв'язків, іонних взаємодій або гідрофобних контактів між амінокислотними залишками. Такі зміни можуть зробити фермент більш стійким до тепла, рН або інших стресових факторів.

Змістовий модуль 3: Основи клітинної інженерії

Лекція 8. Клітинна інженерія рослин

- 1. Культивування рослинних клітин та тканин. Культури калусних тканин**
- 2. Суспензійні культури клітин. Вирощування на «підкладках»**
- 3. Гібридизація та клітинна селекція рослин. Клітинна реконструкція**

Клітинна інженерія – конструювання спеціальними методами клітин нового типу. Клітинна інженерія включає реконструкцію життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин, об'єднання цілих клітин, що належали різним видам (і навіть до різних царств – рослинам і тваринам), з утворенням клітини, що несе генетичний матеріал обох клітин, та інші операції. Клітинна інженерія використовується для вирішення теоретичних проблем у біотехнології, створення нових форм рослин і тварин, що володіють корисними ознаками.

Клітинна інженерія ґрунтується на таких маніпуляціях, як культивування клітин рослин, тварин, грибів *in vitro*; гібридизація соматичних клітин та отримання гібридів за допомогою злиття протопластів; перенесення генетичної інформації за допомогою ізолюваних ядер, хромосом, клітинних органел, які містять ДНК (мітохондрії, пластиди).

На відміну від мікроорганізмів культури клітин вищих організмів є порівняно новими об'єктами, використання яких дозволяє налагодити виробництво цінних біологічно активних речовин, вакцин і моноклональних антитіл.

1) Культивування рослинних клітин та тканин. Культури калусних тканин. Метод культури клітин і тканин широко застосовується у різних галузях біології завдяки простоті тканинних та клітинних моделей у порівнянні з рослинним організмом, а також завдяки можливості точно

регулювати ріст та розвиток ізолюваних систем і контролювати метаболізм.

Прикладом може служити масове клональне мікророзмноження декоративних рослин, а також їхнє оздоровлення від вірусних і інших інфекцій. За допомогою культури *in vitro* можна розширити можливості селекційної роботи: одержувати клони клітин, а потім і рослини з запрограмованими властивостями. Завдяки здатності клітин синтезувати в культурі вторинні метаболіти виникла галузь промисловості, що здійснює біологічний синтез речовин, необхідних людині.

Клітинні культури вищих рослин порівняно із традиційною рослинною сировиною мають ряд переваг:

- можливість одержання продукту незалежно від клімату, сезону, погоди, ґрунтових умов;
- оптимізація та стандартизація умов вирощування;
- перспективи повної автоматизації та комп'ютеризації процесів.

Гени рослин Розмір геному рослин складає 50 тис.-100 тис. генів, що залежить від таксономічної групи. Для жодного виду точна кількість не встановлена у зв'язку зі складністю секвенування.

Особливості геному рослин:

1. клітини окремих органів рослини мають однакову кількість потенційно активних генів;
2. у всіх органах рослин експресуються загальні гени – «гени домашнього господарства», що кодують ферменти, необхідні для всіх клітин рослин;
3. клітини кожного з органів мають набори генів, що експресуються лише в цьому органі;
4. рослинні клітини об'єднує три відносно автономні генетичні системи: ядерну, мітохондріальну, пластидну.

Культура тканин вищих рослин має велике значення для швидкого клонального (нестатевого) мікророзмноження рослин *in vitro*, строго тотожних із вихідними рослинами. Найлегше викликати утворення тканин та органів і регенерацію рослин, стійких до вірусів, використовуючи зародки і бруньки, а

також стеблові меристеми.

Для культивування ізолюваних клітин і тканин вищих рослин застосовуються як *агаризовані*, так і *суспензійні* середовища. При вирощуванні в суспензійному середовищі значно скорочується цикл технологічного процесу. Однак необхідність постійно перемішувати суспензійні культури, а також продувати стерильне повітря вимагає спеціальної апаратури, що, звісно, ускладнює процес. Тому вирощують культури в рідкому поживному середовищі на «підкладках».

Унікальною моделлю для вивчення фундаментальних проблем фізіології рослин, таких, наприклад, як транспорт поживних речовин у клітині, склад і механізм регенерації клітинної стінки, моделювання метаболізму за відсутності міжклітинних зв'язків, слугують ізолювані *протопласти*.

Важливою галуззю практичного застосування протопластів є отримання гібридів вищих рослин шляхом злиття протопластів за допомогою соматичної гібридизації. Суть методу полягає у тому, що як батьківські використовуються не статеві клітини (гамети), а вирощені *in vitro* соматичні клітини у вигляді протопластів. Гібридизацію рослинних протопластів успішно здійснюють за певного впливу – або електростимуляцією примушують зливатися один з одним, або мікроін'єкцією РНК однієї клітини в іншу. Гібридні клітини продукують не лише метаболіти вихідних рослин, але й цілком інші. Із гібридних клітин, одержаних таким шляхом, у подальшому регенерують цілі рослини-гібриди.

Цікавим є також утворення штучних асоціацій міжклітинного та внутрішньоклітинного типів на основі культивованих клітин або ізолюваних протопластів вищих рослин з мікроорганізмами.

Одним з головних факторів утворення ефективної біотехнологічної системи культури тканин та клітин вищих рослин є правильний вибір поживного середовища, яке забезпечувало б потреби клітин продуцента у хімічних компонентах, необхідних для оптимального біосинтезу цільового продукту.

Калюс являє собою однорідну недиференційовану біомасу (рис. 24),

що виростає з *експлантата* (ізолюваний сегмент частини рослини) на поживному середовищі в асептичних умовах.

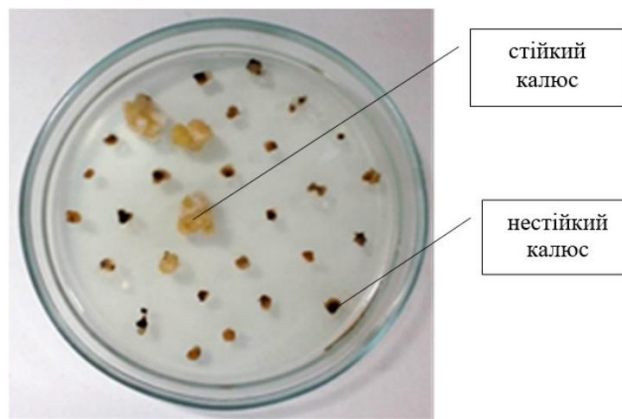


Рис. 24. Приклад калюсної лінії

У природі калюсоутворення зустрічається як реакція на пошкодження рослини, коли на місці поранення утворюється наріст (*мозоль*). Від інфекції калюс захищають імунні механізми організму.

Для культивування клітин та тканин рослин використовують різні поживні речовини, що включають макроелементи (S, P, K, Ca, Mg), мікроелементи (Mn, B, Zn, Mo, I, Cu, Co), вітаміни (тіамін, нікотинова кислота, біотин, рибофлавін, пантотенова кислота), вуглеводи (сахароза, глюкоза, фруктоза, лактоза) та три групи фітогормонів (цитокініни, ауксини, гібереліни). Цитокініни, такі як кінетин і зеатин, синтезуються у коренях і сприяють диференціації клітин та утворенню калюсної тканини, а також уповільнюють старіння органів. Ауксини, такі як 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д), індомасляна кислота (ІМК) та нафтілоцтова кислота (НОК), синтезуються в апікальній меристемі стебла і кореня та впливають на поділ, розтягнення, диференціювання клітин, стимулюючи регенерацію пагонів і утворення коренів. Гібереліни викликають і підсилюють ріст стебла та листків, знімають стан покою у листках і насінні, прискорюючи формування надземної частини рослин.

Для культивування часто використовують середовища **Мурасіге-Скуга**, **Шенка-Хільдебрандта** та інші. На першому етапі, після стерильного виділення частини рослини, до поживного середовища додають

антиоксиданти (цистеїн, глутатіон, етанол, аскорбінову кислоту), які запобігають активації гідролітичних ферментів і загибелі експлантата. Також на цьому етапі додають активоване вугілля для всмоктування шкідливих продуктів метаболізму, але воно також адсорбує фітогормони, тому їх кількість повинна бути збільшена. На початковому етапі культивування до середовищ додають дріжджовий екстракт, гідролізат козеїну, амінокислоти, які сприяють проростанню спор і виявленню прихованої інфекції.

На етапі переприщеплюваного культивування використовують стандартні поживні середовища з необхідними концентраціями фітогормонів, залежно від мети роботи. Нині виробляють кілька типів готових поживних середовищ у вигляді сухих порошків, що містять всі необхідні компоненти, крім регуляторів росту, сахарози та агару. Стерилізацію поживного середовища проводять автоклавуванням, але регулятори росту не можна стерилізувати цим методом. Агар додають перед автоклавуванням для приготування напівтвердих середовищ.

При перенесенні стерильних експлантатів у стерильне поживне середовище паренхімні клітини дедиференціюються, втрачають спеціалізацію і починають ділитися, утворюючи калюс. Незалежно від джерела, первинний калюс є однорідною масою клітин, що частково відтворюють специфіку тканини інтактної рослини. Культуру калюсу підтримують на твердому агаризованому середовищі, періодично пересіваючи. Тривалість культивування і кількість пасажів можуть змінювати ріст, морфологію та біохімічні властивості тканин.

Цитогенетична мінливість калюсних клітин може знизити їх здатність до реалізації генетичної інформації і утворення вторинних сполук. Однак, вихідна генетична інформація не зникає повністю, і для її реалізації потрібні специфічні умови, такі як світло, фітогормони та склад поживного середовища. Наприклад, кінетин стимулює накопичення нікотину і лігніну в калюсних культурах тютюну, а низька концентрація сахарози – убихінону-10. Живі паренхімні клітини зберігають здатність переходити в меристематично активний стан, відіграючи важливу роль у калюсогенезі, особливо в умовах

стерильної культури *in vitro*.

Для забезпечення розвитку калюсних клітин на поживних середовищах, що містять всі необхідні для росту речовини, клітини експлантатів мають втратити здатність до диференціювання. Цьому сприяє передінкубація експлантатів на середовищі без гормонів протягом 3-6 діб.

Процес калюсогенезу в умовах ізольованої культури тканин багатьох видів рослин проходить у три етапи: дедиференціація тканин експлантата, меристематизація і диференціація новоутворених тканин калюсу.

Перший етап, дедиференціація, відбувається швидко і зачіпає судини та ділянки паренхімних тканин на кордоні зрізів. Паренхімні тканини, що прилягають до судин, відзначаються високою проліферативною активністю. У секреторних каналах і каналцях формується первинний калюс.

Другий етап, меристематизація, характеризується утворенням меристематичних осередків. Поблизу верхньої поверхні калюсу формується багаторядна захисна зона, а на нижній стороні - окремі меристематичні осередки. На 10-й день досліджень всі калюси морфологічно чітко окреслені.

Третій етап, диференціація, включає подальшу меристематизацію та формування вторинного калюсу. На 72-й день в культурі ізольованих тканин женьшеню спостерігається утворення білих коренів. Калюсогенез у різних експлантатах з кореня женьшеню проходить однотипно. Цей процес в умовах стерильної культури характеризується динамікою формування всіх структур.

Морфологія калюсу змінюється протягом пасажу, проходячи через чотири стадії росту: латентний період, інтенсивний поділ, розтягнення клітин та стабільну стадію. У зовнішніх шарах калюсу можуть утворюватися групи дрібних "дочірніх" клітин, що виникають з однієї "материнської", що пов'язано з соматичним ембріогенезом.

Для вирощування рослинних клітин **на агаризованому середовищі** до поживного середовища додають агар до кінцевої концентрації 6-10 г/л, а значення рН доводять до 5.5-6.0 перед автоклавуванням. В асептичних умовах калюс масою 60-100 мг відокремлюють і розміщують на поверхні агаризованого поживного середовища для подальшого росту. Це дозволяє

підтримувати культуру калюсної тканини безмежно довго, періодично її пересаджуючи на нове поживне середовище. Ріст тканини на агаризованому середовищі протягом пасажу характеризується S-подібною кривою, яка включає чотири фази.

Перша фаза – лаг-фаза, триває до двох діб, протягом яких клітини практично не діляться, а їхній розмір не змінюється порівняно з клітинами вихідної рослини. Друга фаза – фаза експоненційного росту, триває приблизно 20 діб і характеризується найбільшою мітотичною активністю клітин, при цьому приріст біомаси женьшеня складає 13-14 г з 1 л середовища на добу. Третя фаза – фаза лінійного росту, характеризується найбільш інтенсивним накопиченням біомаси, з приростом 350-400 г/л на добу на 25-28 день. У цій фазі мітотична активність зменшується, а клітини збільшуються у розмірі і накопичують глікозиди. На 30-й день знижується вміст сухої речовини і стабілізується накопичення панаксозидів. Четверта фаза – стаціонарного росту, характеризується частковою загибеллю клітин і появою некротичних зон, що вимагає пересаджування культури на свіже поживне середовище на 30-й день вирощування.

Ріст культури супроводжується змінами рН середовища: у лаг-фазі та фазі експоненційного росту відбувається підкислення середовища через поглинання відновлених форм азоту, а у фазі лінійного росту – підлужування через виведення нітратних форм азоту. Наприкінці пасажу поглинання аміачних форм азоту знову призводить до підкислення середовища. Динаміка накопичення розчинних цукрів корелює з мітотичною активністю: максимальна кількість цукрів спостерігається у фазі експоненційного росту на 5-й та 15-й день, а в фазі лінійного росту кількість цукрів різко знижується. Якісний склад амінокислот не змінюється, але кількісний вміст залежить від фази росту: у фазі експоненційного росту накопичується найбільше вільних амінокислот, тоді як у фазах лінійного та стаціонарного росту їх кількість зменшується, а вміст зв'язаних амінокислот зростає.

Культивування тканин на твердих поживних середовищах часто проводиться у спеціальних установках, де багато процесів механізовані. Однак

цей процес потребує великих площ, не завжди гарантує стерильність і дає низький вихід продукту.

2) Суспензійні культури клітин. Вирощування на «підкладинках». Суспензійні культури – це рослинні клітини, вирощені в рідкому поживному середовищі глибинним способом, що складаються з окремих клітин та невеликих агрегатів. Для отримання таких культур використовують калюсні тканини, які мають бути рихлими та легко розпадатися на невеликі клітинні агрегати. Суспензійні культури отримують із життєздатних частин калюсу, які перед пересіванням фільтрують через марлю або сита, щоб відокремити крупні агрегати та залишки трансплантата. Для культивування беруть 2-3 г свіжої калюсної тканини на 60-100 мл середовища. Використовуються також ферментатори різноманітної конструкції об'ємом від 0,1 до 63 м³, що забезпечують аерацію та перемішування. Процес культивування рослинних клітин займає 2-3 тижні. Ріст суспензійних культур (рис. 25.) оцінюють за кількістю осаджених клітин, сирою та сухою масою, вмістом білка, провідністю середовища та життєздатністю клітин.



Рис. 25. Суспензійні культури калюсу

Поживне середовище для суспензійної культури може бути таким же, як для вирощування на агарі, але збагаченим ростовими факторами і фітогормонами, зокрема збільшеною кількістю ауксинів та зменшеною

кількістю цитокінінів.

Повернення суспензійних культур на агаризоване середовище та зворотний пересів у рідке середовище дає добрі результати. Швидкоростучі лінії клітин отримують за допомогою мутагенезу. При вирощуванні суспензійних культур важливо підтримувати постійні режими аерації, перемішування, відповідну температуру, рН середовища та освітленість до 5000 люксів. Ріст клітин пригнічується при недостатній кількості кисню, субстрату, наявності токсичних продуктів обміну та накопиченні CO₂. Механічний стрес від перемішування може знижувати продуктивність культур. Запобігання утворенню піни та злипання біомаси на внутрішніх поверхнях ферментаторів є важливою проблемою, що вирішується підбором поверхнево-активних речовин.

Процес культивування ведеться до припинення інтенсивного синтезу цільового продукту або вичерпання поживних речовин. Визначення кінця культивування враховує мікроскопічний контроль стану культури, концентрацію основних поживних речовин та рН середовища. Вирощування культур у рідких середовищах значно скорочує терміни культивування. Біомаса суспензійного штаму кореня женьшеню вирощується майже у півтора рази швидше, ніж на агаризованому середовищі, і не поступається природній сировині за фітохімічними показниками. Настойка з суспензійного штаму женьшеню задовольняє вимогам ТФС-42-353-72 і має вищу стимулюючу дію порівняно з настойкою з кореня женьшеню.

Використання рідких середовищ відкриває додаткові можливості для вивчення розвитку рослинних клітин і біосинтезу вторинних метаболітів у керованих умовах.

Вирощування на «підкладках». Лише для деяких штамів рослинних культур сьогодні можуть бути використані методи глибинного культивування. Це пояснюється передусім труднощами у досягненні гомогенізованого росту клітин або їх невеликих агрегатів. У зв'язку з цим викликає цікавість метод, який комбінує використання рідкого поживного середовища та твердого матеріалу, що підтримує тканину на поверхні —

"підкладинок". Першим матеріалом при культивуванні рослинних тканин на рідких середовищах з використанням "підкладинок" був фільтрувальний папір.

При такому способі вирощування можна здійснити спрямований синтез вторинних речовин шляхом регулювання вмісту компонентів харчування, рН середовища, аерації та інших важливих параметрів культивування.

Одним з найважливіших елементів поверхневого вирощування тканин на рідких середовищах є вибір "підкладинки", на якій розміщують тканини. З цією метою використовують паперові фільтри, намистинки зі скла Пірекса, кварцовий пісок, поліакриламідні гелі, пластмаси, пінополіуретани.

При такому методі вирощування вторинні метаболіти (алкалоїди) накопичувалися, в основному, в біомасі, а вміст їх в рідкому поживному середовищі складав не більше 54 % від їх загальної суми. Слід відзначити, що вихід біомаси і алкалоїдів у цьому випадку був не нижчий, ніж при вирощуванні на агаризованих середовищах, а використання основних компонентів харчування – сахарози, неорганічного фосфору, загального азоту – проходило більш повільно, ніж при глибинному способі вирощування.

Для керування процесами росту культур та синтезу ними вторинних продуктів необхідний контроль за кількістю поживних речовин у середовищі. Середовище протягом усього пасажу повинне містити компоненти живлення у кількостях, що забезпечують високу швидкість росту тканин. Відомо, що основною причиною уповільнення росту є виснаження поживного середовища. Тому удосконалення методів глибинного культивування здійснюватиметься шляхом утворення проточних режимів з постійним підтриманням основних компонентів середовища в оптимальній концентрації.

При культивуванні на рідких середовищах поверхневим методом "на підкладинці" споживання тканиною головних компонентів живлення – сахарози, неорганічного фосфору та загального азоту – менше, ніж при глибинному способі вирощування.

3) Гібридизація та клітинна селекція рослин. Клітинна реконструкція. Безліч теоретичних і практичних задач можна вирішити за допомогою ізольованих протопластів. Вони дозволяють проводити селекцію на клітинному рівні, працювати з великою кількістю клітин у малому обсязі, здійснювати прямий перенос генів, вивчати мембрани та виділяти пластиди.

Ізольований протопласт – це вміст рослинної клітини, оточений плазмолемою, але без целюлозної стінки. У 1971 році Такебе і його колеги, обробляючи клітини листа тютюну целюлазою і пектиназою, успішно отримали протопласти, які культивувалися в середовищі для поділу і формування калюсу, здатного до регенерації цілої рослини. Ці експерименти показали, що більше 90% протоклонів, отриманих з протопластів, були схожі на батьківські лінії за фенотипом і генотипом. Протопласти тютюну дозволили уникнути мінливості, характерної для інших способів отримання клонів, що було підтверджено і на інших рослинах. У 1974 році Дж. Мельхерс увів термін «соматична гібридизація» для позначення процесу злиття протопластів соматичних клітин, що дозволяє поєднувати геноми обох клітин і об'єднувати цитоплазматичні гени батьківських клітин. Соматична гібридизація відкриває можливості для будь-яких схрещувань і комбінування цитоплазматичних генів.

Штучне злиття протопластів за допомогою індуктора злиття (ф'юзогена) було вперше здійснено у 1970 році Коккінгом та його колегами. У 1972 році було отримано перший нестатевий гібрид вищих рослин при злитті протопластів двох видів тютюну: *Nicotiana glauca* і *Nicotiana langsdorfii*. У 1978 році успішно злили протопласти картоплі і томатів, отримавши рослини «томату», які утворюють бульби і плоди. Це має науковий і практичний інтерес, оскільки дозволяє перенести фактори стійкості до хвороб з томатів на картоплю в ході однієї операції, що значно скорочує час порівняно зі звичайними селекційними методами.

Нині отримано багато міжвидових і міжродинних гібридів, деякі з яких мають аномалії через хромосомну незбалансованість. Також були створені

гібриди між протопластами еритроцитів пацюка і дріжджовими клітинами, моркви і людини. Всі маніпуляції з новими генотипами мають бути ретельно продумані з дотриманням наукової етики.

У 1964 році індійські дослідники Гуха і Махесвари культивували пильовики рослин у штучному середовищі, отримуючи ембріони і гаплоїдні рослини. Сангван і Сангван-Норилл у 1976 році досягли успіху в культивуванні пилкових зерен із пильовиків рослин родини *Solanacea*. Культура пилкових зерен стала основним джерелом гаплоїдних рослин для декоративних, овочевих, зернових і кормових видів. Пилкові зерна можуть бути зручнішими за протопласти для генетичної трансформації, що призначена для отримання рослин з заданими властивостями.

Рослини, отримані вегетативним шляхом (клони), зазвичай схожі на батьківську рослину, але іноді виникають клони, що істотно відрізняються від вихідної форми – соматклони. Соматклональна мінливість є важливим джерелом генетичної розмаїття, яке можна використовувати для створення генетично змінених організмів з новими властивостями. Наприклад, у калусній культурі рису були виділені рослини, що поєднують скоростиглість і довгі зерна, на основі яких був створений новий сорт рису. У ряді випадків розмноження соматклональних варіантів привело до створення нових сортів, як-от апельсини «Навель» і персики-нектарини.

Клітинна реконструкція полягає в створенні життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин, напр., шляхом пересаджування ядра клітин одного виду в цитоплазму клітин іншого виду. Замінюють не тільки ядра, а й окремі хромосоми.

Досягнення клітинної інженерії використовують для вирішення різних теоретичних проблем біології, зокрема для вивчення взаємовпливу ядра й цитоплазми, механізмів цитодиференціації, регуляції поділу клітини, перетворення нормальної клітини в злоякісну тощо. Крім цього, отримання клітинних гібридів або реконструйованих клітин є важливим для створення біотехнологій. Напр., гібриди пухлинних і нормальних клітин імунної системи (лімфоцитів) мають властивості обох батьківських клітинних ліній: подібно до

ракових клітин вони здатні необмежений час ділитися, подібно до лімфоцитів – синтезувати моноклональні антитіла певної специфічності. Такі клітинні гібриди (гібридоми) використовують для отримання антитіл, які застосовують у медицині.

Шляхом поєднання клітин різних зародків на ранніх стадіях їхнього розвитку отримують мозаїчні тварини, або химери, які складаються з кількох генотипів. Їхнє вивчення дає змогу розкривати механізми диференціювання клітин і тканин. Пересаджування ядер соматичних клітин в яйцеклітину, з якої власне ядро було заздалегідь вилучене, й наступне вирощування зародка та отримання дорослого організму набуло широкого застосування як клонування тварин. Клітинну інженерію застосовують також у промисловій мікробіології.

Культивування гібридних або реконструйованих клітин вимагає певних умов їхнього вирощування з метою подолання спонтанного прагнення змінених клітин повернутися до первинного стану шляхом деградації нав'язаних нових компонентів. Із клітинною інженерією пов'язують сподівання щодо створення нових сортів сільськогосподарських рослин з корисними ознаками стійкості до несприятливих кліматичних умов та хвороб. Формування клітинної інженерії розпочалося в 1960-х рр., коли були опрацьовані методи культивування окремих клітин, отримання культури тканин – калусів та способів індукції морфогенезу в них. Нині діє Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ (Київ), у якому широко застосовують у дослідженні реконструйовані рослинні клітини.

Лекція 9. Клітинна інженерія тварин

- 1. Культивування клітин і тканин тварин**
- 2. Гібридизація клітин тварин.**
- 3. Гібридома. Схема отримання гібридом на основі мієломних клітин та імунних лімфоцитів**

1) Культивування клітин і тканин тварин. Культивування тваринних клітин та тканин є важливим процесом у біомедичних дослідженнях, фармацевтичній промисловості та біотехнології, але він є досить складним і вимагає ретельного дотримання багатьох умов. Сене культивування тваринних клітин і тканин полягає в можливості вивчати фізіологічні процеси, механізми розвитку хвороб та взаємодію клітин з різними біомолекулами, що важливо для біомедичних досліджень. У фармакології культивування клітин дозволяє тестувати нові ліки, оцінюючи їх ефективність і токсичність, а в біотехнології використовувати клітинні культури для виробництва біологічно активних речовин, таких як антитіла, вакцини і ферменти. Тканинна інженерія також використовує культивування клітин для розробки штучних органів і тканин для трансплантації та регенеративної медицини.

Складність культивування тваринних клітин і тканин полягає в необхідності створення і підтримання спеціальних умов. Однією з основних складнощів є забезпечення складного середовища, яке містить амінокислоти, вітаміни, мінерали, глюкозу, фактори росту та інші компоненти, необхідні для життєдіяльності клітин. Багато клітин також потребують сироваткових добавок, таких як фетальна теляча сироватка, що ускладнює стандартизацію середовищ.

Типи культур тваринних клітин та тканин:

1. Первинно-трипсинізовані – отримують із подрібнених тканин тварин шляхом їх обробки трипсином чи іншими ферментами. Витримують лише 5-10 поділів (пасажів).

2. Перещеплювані – клітини, які набули здатності до безмежного розмноження, оскільки є похідними пухлин тварин.

3. Напівперещеплювані (диплоїдні) – можуть витримувати до 100 пасажів, зберігаючи при цьому вихідний диплоїдний набір хромосом.

Промисловим методом з культур клітин отримують такі продукти, як ферменти, синтетичні гормони, моноклональні антитіла, інтерлейкіни, лімфокіни, протипухлинні препарати. Хоча багато простих білків відносно просто можуть бути отримані з використанням рДНК в бактеріальних культурах, більш складні білки, такі як глікопротеїни, в даний час можуть бути отримані тільки з тварин клітин. Одним з таких найважливіших білків є гормон еритропоєтин. Вартість вирощування культур клітин ссавців є досить високою, тому в даний час проводяться дослідження по можливості виробництва складних білків в культурах клітин комах або вищих рослин.

Дотримання асептичних умов є критично важливим для успішного культивування, оскільки необхідно уникати контамінації бактеріями, грибами або вірусами. Це вимагає використання спеціального обладнання, такого як ламінарні бокси та автоклави, а також ретельного контролю всіх процедур. Крім того, клітини чутливі до змін температури, рН, рівня кисню та вуглекислого газу, тому для підтримання оптимальних умов використовуються інкубатори з контролем температури і газового складу.

Багато тваринних клітин є адгезивними, тобто потребують поверхні для прикріплення і росту, що вимагає використання спеціальних культуральних посудин, покритих адгезивними білками або іншими речовинами. Первинні клітинні культури, отримані безпосередньо з тканин, мають обмежену тривалість життя і можуть втрачати свої властивості з часом. Для тривалих досліджень використовуються безсмертні клітинні лінії, які можуть мати генетичні мутації або змінені властивості.

Усе це робить культивування тваринних клітин і тканин важливим, але складним і затратним процесом, що вимагає спеціалізованих знань, обладнання та ресурсів. Однак, завдяки цьому процесу науковці можуть досліджувати нові методи лікування, розробляти ефективні лікарські засоби та

створювати штучні органи, що значно покращує якість медичної допомоги і наукових досліджень.

Успішні експерименти по **введенню чужорідних генів** у клітини ссавців і можливість створення генетично ідентичних тварин шляхом переносу ядра з ембріональної клітини в яйцеклітину з вилученим ядром (перенос ядра, клонування) дозволило включити в хромосомну ДНК вищих тварин окремі функціональні гени або цілі їх кластери.

Дана стратегія полягає в наступному:

1. клонований ген вводять в ядро заплідненої яйцеклітини;
2. запліднені яйцеклітини імплантують реципієнту жіночої особини (оскільки успішне завершення розвитку ембріона ссавців в інших умовах неможливо);
3. відбирають нащадків, які розвилися з імплантованих яйцеклітин і які містять клонований ген в усіх клітинах;
4. схрещують тварин, які несуть клонований ген у клітинах зародкової лінії, і одержують нову генетичну лінію.

Ідея генетичної зміни тварин шляхом введення генів у запліднені яйцеклітини була реалізована на практиці в 1980-х р.р. Тварина, чий генотип був змінений шляхом введення чужорідної (екзогенної) ДНК, була названа трансгенною, ДНК яке вводиться – трансгеном, а весь процес – трансгенною технологією, або трансгенезом.

Для переносу генів ссавців використовують три методи:

- мікроін'єкція рекомбінантної ДНК у пронуклеус зиготи;
- використання ретровірусів у якості векторів;
- ін'єкція трансформованих ембріональних стоволових клітин в ембріон.

1. Метод мікроін'єкції рекомбінантної ДНК у пронуклеус зиготи складається з таких етапів:

Одержання запліднених яйцеклітин. Для мікроін'єкції чужорідного гена необхідно мати запліднені яйцеклітини в стадії формування пронуклеусів. Перший гормон стимулює ріст і розвиток фолікулів

(фолікулостимулюючий гормон) , другий викликає овуляцію (лютеїнізуючий гормон). Через 24-36 год. донорів запліднюють.

Конструювання гена. Типовий ген еукаріот складається із двох основних частин: регуляторної та інформативної (кодуючої або структурної). За допомогою методів генної інженерії видаляють усю регуляторну частину гена й замінюють її регуляторною ділянкою – промотором бактеріального гена. Така заміна приводить не тільки до структурних змін в еукаріотичному гені, але й підсилює його функціонування.

Приготування ін'єкційного розчину ДНК. Ін'єктуємий розчин ДНК, що ін'єктується звільняють від партикулярних забруднень, здатних привести до засмічення ін'єкційної піпетки або ушкодженню зиготи.

Мікроін'єкція рекомбинантної ДНК у пронуклеус зиготи. Для перенесення чужорідних генів у пронуклеус зиготи сільськогосподарських тварин використовують інверсійний мікроскоп, два мікроманіпулятори, ін'єкційну посудину, ін'єкційну піпетку та піпетку- власник. Зиготу фіксують піпеткою-власником. Ін'єкційну піпетку наповнюють розчином ДНК із ін'єкційної посудини. За допомогою напрямного важеля ін'єкційну піпетку вводять через зону пеллюцида, плазматичну мембрану й мембрану ядра в чоловічий пронуклеус. Ін'єкція 1-2 мл. розчину ДНК призводить до збільшення обсягу чоловічого пронуклеуса до 50%.

2. Використання ретровірусних векторів. За використання ретровірусів як переносників трансгенів, ранні морули позбавляють оболонки, піддають короткочасному впливу інфекційного вірусу, в геном якого попередньо вбудовано трансген, і морула трансплантується псевдовагітним самицям. Трансгенні тварини, отримані із застосування ретровірусів завжди є мозаїками з одним сайтом інтеграції, оскільки інфікування відбувається на стадії 8 – 16 клітин. Використання ретровірусів є дуже зручним, коли необхідно здійснити перенесення генів у клітини дорослого організму, наприклад, в клітини крові для усунення генетичних дефектів. Перспективним є використання ретровірусів як векторів для вбудовування трансгенів у клітини зародкового шляху та стовбурові клітини ссавців і людини, які здатні

після низки мітотичних поділів заміщувати загиблі клітини багатоклітинного організму.

3. Ін'єкція трансформованих ембріональних стволових клітин в ембріон. Клітини, виділені з ембріонів мишей на стадії бластоцисти, можуть проліфериувати (рости і розмножуватися) у культурі. Ці клітини є поліпотентними (або плуріпотентними), тобто в культурі вони можуть диференціюватися в клітини всіх трьох зародкових листків. У ЕСК не було виявлено ніяких хромосомних аберацій (мутацій) – вони зберігали нормальний генотип соматичних клітин. ЕС-клітини – це клітини-нащадки 61 клітин внутрішньої клітинної маси (ВКМ) бластоцисти, які отримують таким шляхом: бластоцисти культивуються на підкладці з фібробластів, осідають на дно чашки Петрі й розпластуються. Клітини ВКМ декілька разів перевіряють, і деякі з їх утворюють початок лінії ембріональних стовбурових клітин.

Перевагою одержання трансгенних тварин за допомогою ембріональних стовбурних клітин є можливість тестування інтеграції трансгену в культурі клітин. Це означає, що кожний ембріон, що розвився в культурі після пересадження ядер, буде трансгенним і наступна селекція трансгенних ембріонів не потрібна. Крім того, пересадження таких ембріонів реципієнтам приведе до народження тільки трансгенних нащадків.

2) Гібридизація клітин тварин. Гібриди соматичних клітин були відкриті лише в 60-х роках нашого століття. У 1960 р Барський зі співробітниками повідомили про виділення лінії гібридних клітин. Гібридні клітини були отримані шляхом змішування двох ліній, виділених раніше з 1 клітини мишачої саркоми. Вихідні лінії відрізнялися за кількістю і морфологією хромосом, а також по здатності до утворення пухлини при введенні їх мишам. Гібридні клітини містили число хромосом, відмінне від вихідних клітинних ліній, а також мали поверхневі антигени клітин обох батьківських ліній. Далі було встановлено, що клітинні гібриди можна отримати, використовуючи клітини різних видів тварин. В якості агента, що індукує злиття виступав інактивований вірус HVJ, званий також вірусом

Сендай. З цього часу вірус Сендай став широко використовуватися в експериментах по злиттю клітин.

При вивченні міжвидових гібридних клітин, здатних до проліферації були зроблені два дуже важливі спостереження:

- в гібридах можуть проявитися обидва генома;
- в довгоживучих міжвидових гібридах елімінуються хромосоми одного виду.

Злиття клітин не обов'язково має бути чимось стимульоване. Як *in vivo*, так і *in vitro* воно може проходити і без додавання спеціальних агентів. Незважаючи на те, що всі злиття такого роду можна вважати спонтанними, деякі з них постійно відбуваються в процесі онтогенезу, а отже, еволюційно запрограмовані. До сих пір невирішеною залишається одна з найважчих загадок біології, яка полягає в тому, що мембрани, що знаходяться всередині клітини зливаються частіше, тоді як мембрани, що розмежовують клітини, зливаються рідше. Наприклад, бульбашки апарату Гольджі зливаються один з одним, утворюючи клітинні пластинки при цитокінезі у рослин, мембрани ЕР (ендоплазматичний ретикулум) – з елементами АГ (апарату Гольджі) при перенесенні знову синтезованих білків та інше.

У той же час нормальні клітини в природних умовах вкрай рідко зливаються один з одним. Виняток становить процес запліднення. Крім того, в якості подібного роду виключення виступає процес плазмогамія у вищих грибів, коли одноядерні гаплоїдні клітини зливаються, утворюючи двоядерні (дікаріони). Такі клітини розмножуються мітотичний, залишаючись двоядерними, і в результаті утворюють всім добре відомі плодові тіла.

В природних умовах злиття клітин відбувається і у ссавців. Наприклад, клітини можуть зливатися при формуванні м'язових трубочок. Ще в XIX столітті було показано, що міофібрили поперечно-смугастих м'язів утворюються в полікаріонах - великих подовжених багатоядерних клітинах.

Полікаріони – продукт злиття одноядерних міобластів. **Злиття пухлинних клітин** – досить звичайне явище, при цьому пухлинні клітини *in vivo* іноді зливаються і з нормальними. Експерименти по спонтанному злиття клітин

проводилися і *in vitro*. При проведенні подібних експериментів отримують так званих "химерних" або аллофених мишей - тварин, в тканинах яких містяться клітини різних генотипів (рис. 26).

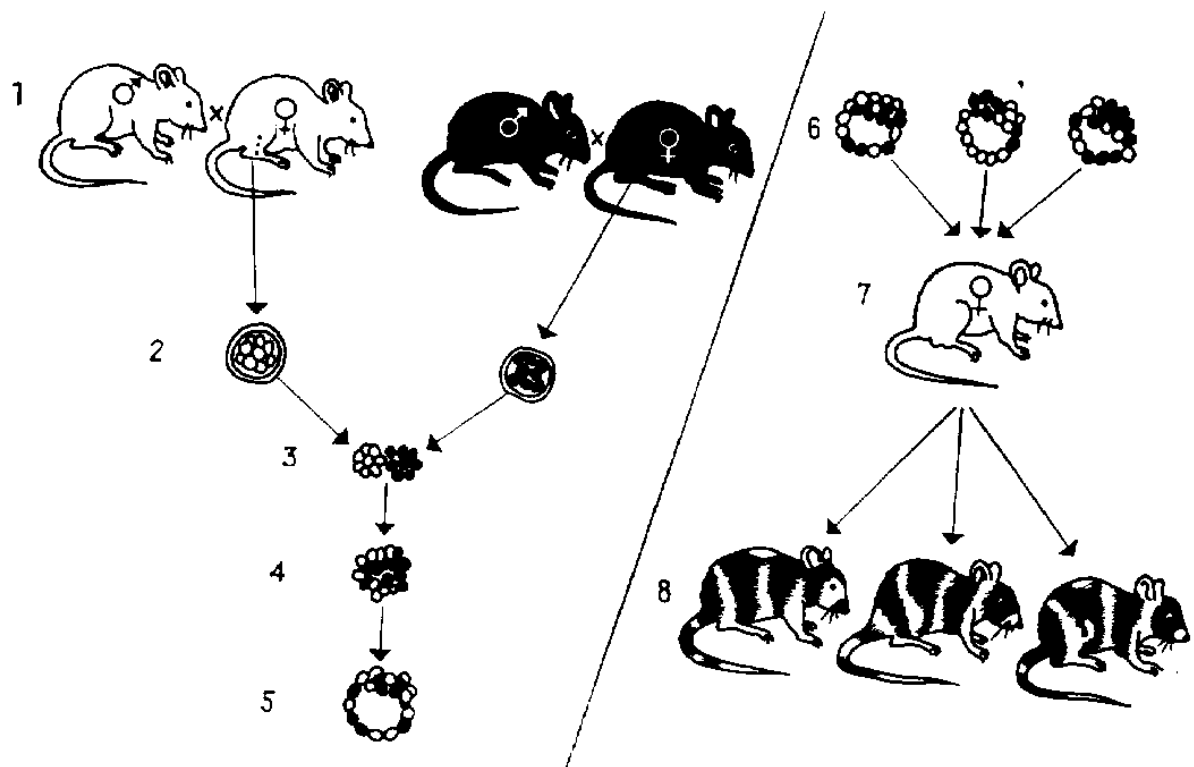


Рис. 26. Отримання аллофених мишей

Передумовами для виникнення методу отримання гібридом, синтезують моноклональні антитіла, були розробки двох методичних підходів:

1. Отримання мієлом, адаптація їх до умов культивування поза організмом;
2. Метод соматичної гібридизації клітин.

У мишей можна легко отримати мієломи (плазмацитоми). Ці пухлини є нащадками однієї клітини (тобто, мають моноклональних походження) і секретують унікальні імуноглобуліни, деякі з яких можуть взаємодіяти з відомими антигенами. Пухлини створюють у них шляхом внутрішньочеревного введення мінеральних масел або інертного твердого пластика.

Селекція гібридів заснована на тому, що в ДАТ середовищі батьківські мієломні клітини гинуть. Нормальні клітини селезінки не володіють здатністю

до росту при даних умовах культивування, тому виживають і розмножуються тільки гібридні клітини, що успадкували від батьківських клітин здатність розмножуватися і синтезувати специфічні імуноглобуліни.

3) Гібридома. Схема отримання гібридом на основі мієломних клітин та імунних лімфоцитів. Гібридома – клітинний гібрид, що отримують злиттям нормальної клітини (напр. імунного лімфоцита) з пухлиною. Має здатність до синтезу специфічного білка, направленого антитіла (властивість нормальної клітини), і до безмежного росту (властивість пухлинної клітини).

Етапи отримання моноклональних антитіл включають в себе:

1. Імунізацію тварин.
2. Підготовка мієломних клітин до злиття.
3. Злиття.
4. Клонування гібридомних клітин.
5. Виявлення антитіл, синтезованих гібридомними клітинами.
6. Активне нарощування (культивування) гібридомних клітин, що синтезують моноклональні антитіла.

Зазвичай вся процедура від моменту початку імунізації до виділення антитіл займає 3-4 міс.

Імунізація. Для імунізації використовують мишей і щурів. Це пов'язано з тим, що їх відповідні мієломні клітини широко поширені і, крім того, не представляє складнощів вирощування отриманих гібридом в організмі цих тварин. Призначення процесу імунізації полягає в тому, щоб збільшити частку клітин, що продукують антитіла заданої специфічності, і перевести ці клітини в функціональний стан, при якому вони здатні зливатися і утворювати антитілоутворюючі гібридні клітини. Використовується така схема імунізації:

1. Вводять 1-100 мг антигену в складі фосфоліпідного фактору активації тромбоцитів (ПАФ) внутрішньочеревно.
2. Через 2-3 тижні вводять антиген на фізіологічному розчині внутрішньочеревно.

3. Останню імунізацію роблять внутрішньовенно. Через 3 доби тварин забивають і готують суспензію для гібридизації.

Підготовка мієломних клітин до злиття. Підготовка мієломних клітин є важливим етапом для отримання гібридом. Необхідно дотримуватися наступних вимог: розмножити і заморозити достатню кількість ампул мишачих клітин з доброю здатністю утворювати гібридами. Використовувати клітини слід не більше одного місяця після розморожування, оскільки їх здатність утворювати гібридами поступово знижується. Клітини для злиття беруть у логарифмічній фазі росту і до моменту злиття вони повинні знаходитися в цій фазі не менше тижня. Рекомендується періодично культивувати клітини в присутності токсичного аналога нуклеотидів (8-азагуанін), для чого 15 мг речовини розчиняють в 1 мл диметилсульфоксиду для отримання 1000-кратного розчину.

Клітини адаптуються до одного виду середовища і погано переносять її заміну, тому при отриманні клітин з іншої лабораторії їх необхідно культивувати в тому ж середовищі або поступово адаптувати до нового, використовуючи суміш двох середовищ. Культури не повинні досягати високої щільності (більше 10^6 /мл), щоб уникнути масової загибелі клітин; у такому випадку краще розморозити нову партію клітин. Для підготовки клітин живильного складу використовують клітини селезінки з перитонеальними сінгенними макрофагами, які отримують від мишей без стимулятора, щоб уникнути вбивства гібридомних клітин активованими макрофагами. Суміш мієломних і селезінкових клітин, оброблених поліетиленгліколем, додають для злиття.

Злиття. Методика злиття передбачає певну послідовність проведення заходів. При цьому важливо, щоб замість клітин живильного шару було використане кондиціоноване середовище. Середовище, кондиціоноване перитонеальними макрофагами, додають до середовища культивування в співвідношенні 1:1.

Рекомендується додавати систему **ДАТ** відразу ж після злиття, а культури після злиття не чіпати кілька днів (навіть не відкривати CO₂-

інкубатор). Це пояснюється тим, що клітини після злиття дуже чутливі до змін зовнішньої температури, що виявляється в період вилучення планшетів з CO₂-інкубатора.

Клонування гібридом. Клонування гібридомних клітин здійснюється в напіврідкому агарі. Під мікроскопом витягають, користуючись пастерівської піпеткою, з агару колонії позитивних клітин цих клонів і переносять в рідку культуру для заморожування в рідкому азоті.

Виявлення антитіл синтезованих гібридомними клітинами. Для виявлення антитіл, синтезованих гібридомними клітинами, використовують імуноферментний метод. У цьому методі застосовують антитіла кролика проти імуноглобулінів миші, мічені ферментом, і оцінюють результат за появою кольорової реакції. Позитивні клітини поміщають у лунки 96-ямкового планшета для мікротитрування і додають культуральну рідину, яка може містити антитіла.

Після інкубації і відмивання в лунки заливають розчин субстрату. Якщо в культуральній рідині є антитіла проти антигену, то вони адсорбуються на антигені, а на них – кон'юговані з ферментом вторинні антитіла. Під дією ферменту субстрат розкладається і перетворюється на забарвлений продукт. Поява забарвлення свідчить про наявність антитіл до імунізуючого антигену в культуральній рідині.

Активне нарощування (культивування) гібридомних клітин, що синтезують моноклональні антитіла. Після відбору гібридомних клітин (цікавлять нас антитіла) приступають до їх активному нарощуванню з метою отримання великої кількості моноклональних антитіл. Оскільки людина не може служити експериментальною моделлю, і тому звичайні способи отримання антитіл (з використанням активної імунізації) неможливі, розроблений спосіб імунізації поза організмом, тобто *in vitro* (рис. 27).



Рис. 27. Схема створення гібридомних клітинних ліній

ГАТ-середовище – містить гіпоксантин, аміноптерин, тимидин.

Клітини цієї лінії, на відміну від нормальних лімфоцитів, не могли засвоювати гіпоксантин із поживного середовища через відсутність ферменту пуринового обміну гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (ГГФРТ)

На початку культивування гібридомні клітини будуть рости повільно, оскільки буде низька щільність посіву. Тому при посіві клітин їх треба розводити не більше ніж в 3 рази. Прискорення росту клітин також стимулюють додаванням клітин живильного шару.

Моноклональні антитіла людини знаходять широке застосування, в тому числі для діагностики і терапії різних захворювань. Наприклад, антитіла

проти пухлинних антигенів, зшиті з токсинами (іммунотоксинів), можуть бути застосовані для селективного знищення пухлинних клітин в організмі людини. Такі антитіла нескладно отримати, використовуючи для імунізації мишей чи пацюків і подальше конструювання гібридом.

Змістовий модуль 4: Основи генетичної інженерії**Лекція 10. Конструювання і застосування генно-модифікованих мікроорганізмів**

- 1. Отримання продуктів біосинтезу за допомогою ГМО: амінокислоти (лізин, триптофан, глютамінова кислота), вітаміни (В₁₂, В₂, ергостерин, каротиноїди), етанол, фруктоза**
- 2. Отримання БАП за допомогою ГМО: антибіотики, інтерферони, інсулін**
- 3. Виробництво моноклональних антитіл за допомоги *E. coli***

1) Отримання продуктів біосинтезу за допомогою ГМО: амінокислоти (лізин, триптофан, глютамінова кислота), вітаміни (В₁₂, В₂, ергостерин, каротиноїди), етанол, фруктоза.

Амінокислоти. Всі амінокислоти, з яких складаються білки, є L-формами. Із 20 амінокислот – 8 (ізолейцин, лейцин, лізин, метионін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін) незамінні для людини. Мікробіологічний метод отримання амінокислот, найбільш поширений в даний час, заснований на здатності генетично модифікованих штамів мікроорганізмів синтезувати всі L-амінокислоти, а в певних умовах – забезпечувати їх надсинтез.

Серед **продуцентів амінокислот** є різні мікроорганізми, такі як представники родів *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Використовувані в промисловості мікроорганізми поділяються на кілька класів: дикі штами, ауксотрофні мутанти, конститутивні мутанти і ауксотрофні конститутивні мутанти.

Промислові штами зазвичай мають декілька мутацій, які впливають на механізми регуляції синтезу цільової амінокислоти та її попередників.

Синтез кожної амінокислоти в мікробних клітинах перебуває під суворим генетичним контролем і реалізується в чітко визначених кількостях, що забезпечує утворення наступних амінокислот.

Контроль здійснюється за принципом зворотного зв'язку на рівні генів, відповідальних за синтез певних ферментів (репресія), і на рівні самих ферментів, які внаслідок надлишку амінокислот, що утворюються, можуть змінювати свою активність (ретроінгібування). Цей механізм контролю виключає надвиробництво амінокислот і також перешкоджає їх виділенню з клітин у навколишнє середовище.

Щоб досягти надсинтезу окремих амінокислот, необхідно обійти або змінити даний контрольний механізм їх синтезу. Зміна контрольного механізму синтезу амінокислот здійснюється генетичними методами, отримуючи організми-мутанти: ауксотрофи і регуляторні (конститутивні) мутанти.

Ауксотрофні мутанти – це організми, що втратили здатність до синтезу однієї або декількох амінокислот.

Конститутивні мутанти – це організми, у яких генетичні зміни призводять до постійної активації синтезу певних метаболітів, незалежно від наявності індукторів або інших регуляторних сигналів. У таких мутантів синтез амінокислот або інших речовин відбувається безперервно, що робить їх особливо корисними для промислового виробництва. Ці мутації зазвичай впливають на гени, що контролюють регуляцію метаболічних шляхів, знімаючи гальмівні механізми або підвищуючи активність синтезу.

Біосинтез амінокислот у мікробних клітинах відбувається у вигляді так званих вільних амінокислот або пулу амінокислот, з якого в процесах конструктивного метаболізму синтезуються клітинні макромолекули. Для синтезу всіх білків необхідно 20 амінокислот. Шляхи синтезу більшості амінокислот взаємопов'язані. При цьому одні амінокислоти є попередниками для біосинтезу інших. Як приклад, розглянемо біотехнологію отримання лізину:

Для біосинтезу *лізину* використовують гомосериндифіцитні мутанти ауксотрофних бактерій родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* та ін. У більшості природних штамів зазначених родів бактерій лізин разом з треоніном інгібує фермент аспартаткиназу, що уповільнює утворення лізину.

Щоб усунути цей дефект, генетики створили штами, нездатні синтезувати гомосериндегідрогеназу. Таким чином, усувається накопичення гомосерину, треоніну і метіоніну (рис. 28). Якщо до середовища додати в необхідних для росту культури дозах треонін, метіонін або гомосерин, то відбувається інтенсивний синтез лізину.

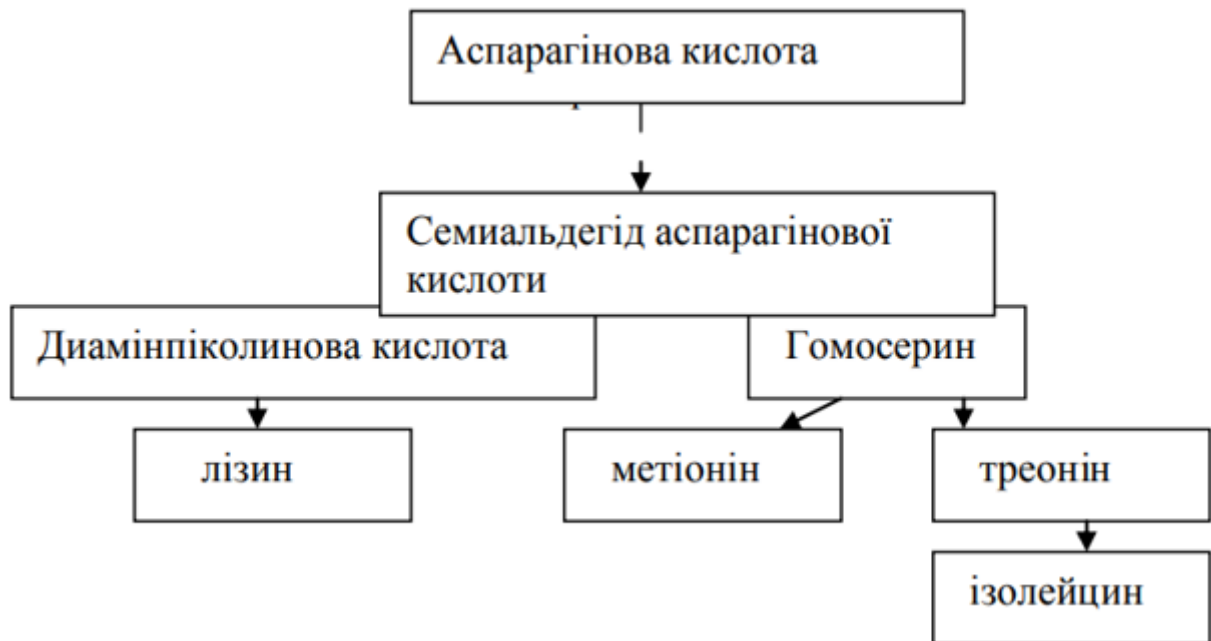


Рис. 28. Схема біосинтезу лізину у бактерій через діамінпіколінову кислоту

Створено штами родів *Brevibacterium*, що забезпечують на м'ясному середовищі синтез лізину до 50-70 г/л, на сахарозних середовищах – до 100 г/л при продуктивності системи в напівбезперервному процесі 15-20 г/л на добу.

I. Середовище для одержання лізину готується із м'яси, кукурудзяного екстракту, солей амонію, одно- і двозаміщеного фосфату калію. Кукурудзяний екстракт іноді замінюють дріжджовим гідралізатом, концентратом клітинного соку картоплі або витяжкою із пшеничних висівків. Після стерилізації таке середовище використовують для вирощування посівного матеріалу і для головної ферментації.

II. Спочатку культуру розмножують у колбах на качалках, потім у ферментерах об'ємом 100 і 3000 л. кількість посівного матеріалу 5-10% оптимальна температура 30-35°C і рН 7,4. Тривалість ферментації для кожної стадії близько 24 години. Головна ферментація триває 50-70 годин при

аналогічних режимах. Концентрація лізину в розчині 20-60 г/л, концентрація клітинної біомаси 15-20 г/л у перерахунку на суху масу. На рис. 29 представлено схему отримання ККЛ.

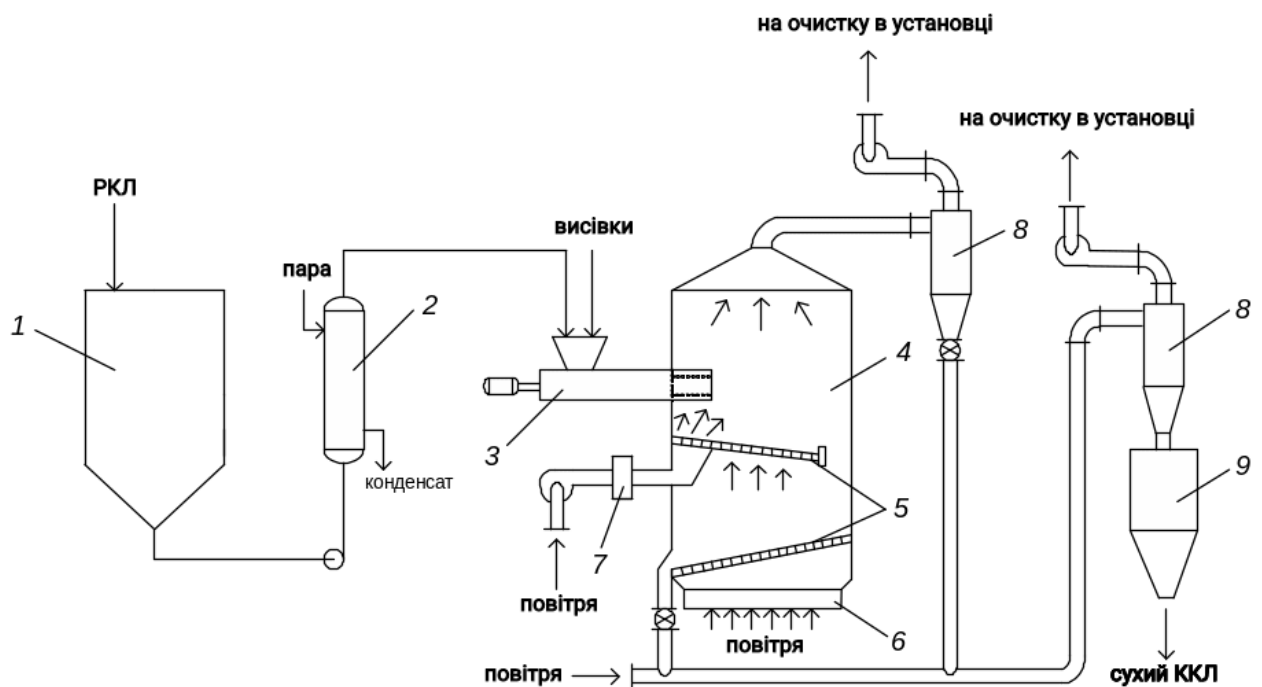


Рис. 29. Технологічна схема отримання кормового концентрату лізину:
1 – збірник РКЛ; 2 – підігрівач; 3 – гранулятор; 4 – сушарка киплячого шару;
5 – сітки; 6 – основний калорифер; 7 – додатковий калорифер; 8 – циклон; 9 –
бункер-охолоджувач

Високу концентрацію лізину 60-80 г/л можна одержати на мелясному середовищі, якщо під час ферментації ввести дробну підкормку частиною живильного середовища при дотриманні точної регуляції культивування. Мелясу можна замінити сахарозою, соком цукрового буряка, глюкозою або гідролізатом крохмалю, а також оцтовою кислотою і підняти концентрацію лізину до 100 г/л.

III. Для одержання кристалічного лізину клітинну масу центрифугують, а культуральну рідину пропускають через катіоніт КУ-2 або КВ-4-Р-2.

- Лізин елюїрують 2,0-3,5% розчином.
- Елюат упарюють у вакуумі при температурі 60 °С до 1/20 - 1/70 частини вихідного об'єму,
- потім, за допомогою НСІ встановлюють рН 4,5-5,0;

- охолоджують до 14-18°C
- кристалізують.

Після фільтрації і центрифугування кристалів одержують технічний лізин – 94-96% лізину монохлоргідрат.

Для **одержання чистого лізину** кристали технічного лізину піддають нагріванню в невеликій кількості води 70°C, додають активоване вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою HCl встановлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при 60°C. Одержаний лізин містить 99,9% лізину монохлоргідрату, і 0,1% золи і не більше 0,001% солей важких металів.

Також **кристалічні препарати лізину** отримують наступним чином: іонообмінним виділенням лізину з культуральної рідини на сульфокатіоніті КУ 2-8 в NH₄⁺-формі. Сорбційна ємність катіоніту становить близько 100 кг лізину на 1 м³ вологого іоніту. Ефективна сорбція лізину на катіоніті забезпечується попереднім переведенням молекули в форму двозарядного катіону шляхом підкислення культуральної рідини сірчаною кислотою до рН 1,6–2,0.

Технологія отримання триптофану. L-триптофан відноситься до незамінних амінокислот. Триптофан, поряд з іншими ароматичними амінокислотами, фенілаланіном і тирозином, останніми роками знаходить усе більше застосування. Відсутність або дефіцит триптофану в організмі призводить до ряду важких захворювань (діабет, туберкульоз, пелагра). Мікробіологічний синтез L-триптофану здійснюють на основі штамів мутантів дріжджів (*Candida*) і бактерій (*E. coli*, *Bacillus subtilis*), дефіцитних за тирозином і фенілаланіном. Промисловий синтез L-триптофану здійснюється на основі цукрів. Для отримання очищеного кристалічного препарату працюють з культуральною рідиною. Для отримання кормового концентрату використовують і біомасу клітин.

Технологія отримання глютамінової кислоти. L-глютамінова кислота – перша амінокислота, отримана промисловим мікробіологічним синтезом, є важливою складовою рослинних і тваринних білків, хоча і не є

незамінною. Дріжджі, мікроскопічні гриби і бактерії можуть продукувати глютамінову кислоту, причому бактерії забезпечують найвищий вихід щодо використаного вуглецевого субстрату (40-50%). Промислове значення мають бактеріальні культури родів *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*. Надсинтез кислоти у диких штамів можливий у спеціальних фізіологічних умовах, за яких гальмується швидкість росту і збільшується проникність клітинної мембрани для глютамінової кислоти. Ці умови забезпечує певна концентрація біотину в середовищі (1-5 мкг/л) та наявність деяких антибіотиків. Внутрішньоклітинна концентрація глютамінової кислоти знижується через екскрецію продукту в навколоклітинне середовище, тому регуляція синтезу кінцевим продуктом слабшає. Надпродукція глютамінової кислоти також пов'язана з високою концентрацією амонію в середовищі.

Вітаміни. Природним джерелом багатьох вітамінів є рослини і мікроорганізми. **Вітаміни** – це низькомолекулярні органічні речовини, здатні в дуже низьких концентраціях виявляти сильну і різноманітну дію. В даний час у виробництві багатьох вітамінів провідні позиції належать хімічному синтезу, проте при виробництві окремих вітамінів мікробний синтез має величезне значення, наприклад, при виробництві кормових препаратів вітамінів. Окремі вітаміни, кобаламіни, менахіони продукуються лише мікробними клітинами.

Мікробіологічним шляхом отримують деякі вітаміни групи В, а також ергостерин і каротин, що є, відповідно, попередниками вітамінів D₂ і провітаміну А.

Технологія отримання вітаміну В₁₂ передбачає культивування бактерій періодичним методом в анаеробних умовах у середовищі з кукурудзяним екстрактом, глюкозою, солями кобальту та сульфатом амонію. Утворені кислоти нейтралізують розчином лугу, який безперервно подається в ферментер. Через 72 години до середовища додають 5,6-ДМБ. Без цього попередника бактерії синтезують фактор В і псевдовітамін В₁₂, які не мають клінічного значення. Ферментацію завершують через 72 години, після чого біомасу сепарують, а вітамін екстрагують водою, підкисленою до рН 4,5-5,0

при 85-90°C протягом 60 хвилин. Водний розчин вітаміну охолоджують, доводять рН до 6,8-7,0 50%-ним розчином NaOH.

Очищення розчину здійснюють на йонообмінній смолі СГ-1, з якої кобаламін елюють розчином аміаку. Далі розчин додатково очищують органічними розчинниками, концентрують і очищують на колонці з Al_2O_3 . З оксиду алюмінію кобаламін елюють водним ацетоном. Отриманий водно-ацетоновий розчин вітаміну витримують при 3-4°C протягом 24-48 годин. Випадні кристали фільтрують, промивають сухим ацетоном і ефіром сірки, і сушать у вакуум-ексикаторі над P_2O_5 . Для запобігання розкладанню вітаміну B_{12} всі операції проводять у затемнених приміщеннях або при червоному світлі.

Хімічне очищення вітаміну B_{12} базується на його здатності утворювати продукти з фенолом і резорцином, що спрощує відділення від супутніх факторів. Промисловий концентрат ціанкобаламіну обробляють водним розчином резорцину (або фенолу), виділяють комплекс з вітаміном B_{12} і далі розкладають його для отримання кристалічного препарату.

Отримання концентрату вітаміну B_{12} включає безперервне зброджування барди комплексом бактерій, згущення метанової бражки і сушку на розпилювальній сушарці. Бродіння проводять в залізобетонних ферментерах безперервним способом протягом року. Важливо контролювати рівень жирних кислот і амонійного азоту, оскільки вітамін B_{12} нестійкий при тепловій обробці, особливо в лужному середовищі. Тому перед виправленням до метанової бражки додають HCl до рН 5,0-5,3 і Na_2SO_3 (0,07-0,10%). Перед випарюванням бражку дегазують при нагріванні до 90-95°C. Бражку згущують до 20% сухих речовин в чотирикорпусних випарних апаратах, а згущену масу висушують на розпилювальній сушарці. В якості теплоносія використовують газ бродіння. Сухий порошок розфасовують у поліетиленові мішки, вкладені в крафт-пакети.

Технологія отримання вітаміну B_{12} . Продуцентами вітаміну є бактерії (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дріжджі (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), мікроскопічні (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*)

і цвілеві гриби (*Aspergillus niger*).

Для медичних цілей мікробіологічний рибофлавін отримують на основі гриба *Aspergillus*. Для високих виходів вітаміну (до 7 г/л) використовують удосконалені штами і оптимізоване середовище, яке містить 2,25% кукурудзяного екстракту, 3,5% пептону, 4,5% соєвої олії і стимулятори (пептони, гліцин). Використовують активний інокулят, яким засівають стерильне середовище. Ферментація триває 7 діб при температурі 28°C і хорошій аерації (0,3 м³/м³•хв.). Початковий рН становить близько 7,0, але під час ферментації, через виділення кислот, середовище підкислюється до рН 4,0-4,5. Після утилізації вуглецевого субстрату продуцент починає утилізувати кислоти, рН підвищується, і відбувається утворення вітаміну В2. Кристали рибофлавіну накопичуються у гіфах і поза міцелієм. На постферментаційній стадії для виділення вітаміну міцелій нагрівають протягом 1 години при температурі 120°C.

У ряді країн для отримання кормових препаратів вітаміну В2 використовують простий спосіб на основі мікроскопічного гриба *Eremothecium ashbyii*, який вирощують у глибинній культурі протягом 80-84 годин при температурі 28-30°C на середовищі з 2,5% глюкози або мальтози, нітратом амонію (NH₄NO₃) як джерелом азоту та карбонатом кальцію (0,5%). Вихід рибофлавіну становить 1250 мкг/мл. Культуральну рідину концентрують вакуумним випаровуванням до вмісту сухих речовин 30-40% і висушують у розпилювальній сушарці. Товарна форма продукту – порошок, що містить не менше 10 мг/г рибофлавіну і 20% сирого протеїну; в препараті також присутні нікотинова кислота та вітаміни В1, В3, В6 і В12. Отриманий генно-інженерним методом штам *Bacillus subtilis* створює за 35 діб ферментації до 4 г/л рибофлавіну.

Технологія отримання ергостерину. Найбільш активні продуценти ергостерину – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*. У промислових масштабах ергостерин отримують шляхом культивування дріжджів і міцеліальних грибів на середовищі з надлишком цукрів, дефіцитом азоту, високою температурою і хорошою аерацією. Найінтенсивніше ергостерин

утворюють дріжджі роду *Candida* на середовищі з вуглеводнями. Для отримання кристалічного препарату вітаміну D2 культивують цвілеві гриби, такі як *Penicillium* і *Aspergillus*. Для отримання кормових препаратів опромінюють суспензію або сухі дріжджі (*Candida*) ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 280-300 нм. Кормові препарати дріжджів містять у 1 г АСР 5000 Е вітаміну D2 і не менше 46% сирого білка.

Для отримання кристалічного препарату дріжджі або грибний міцелій піддають кислотному гідролізу при температурі 110°C, екстрагують вітамін спиртом, фільтрують і упарюють фільтрат, кілька разів промиваючи його спиртом. Спиртовий екстракт згущують до 50% концентрації сухих речовин, омилують лугом. Отримані кристали вітаміну очищують перекристалізацією і сушать в ефірі, відганяючи його залишки. Кристалічний осад розчиняють в олії, отриманий препарат використовують у медичних цілях. Ергостерин є також початковим продуктом для отримання ряду стероїдних гормонів, харчових і лікарських препаратів.

Технологія отримання каротиноїдів. Каротиноїди – це попередники вітаміну А, серед яких найактивнішим є каротин. В організмі людини каротиноїди не синтезуються, тому повинні надходити ззовні. У печінці каротин перетворюється на вітамін А.

Продуцентами каротиноїдів можуть бути гриби і дріжджі. У промисловості каротин найчастіше отримують за допомогою мікроскопічного гриба роду *Blakeslea* (блакеслеа). Культивування проводять і поверхневим, і глибинним способами на поживних середовищах складного складу. Під час ферментації середу інтенсивно аерують. Утворення каротиноїдів в культурі мікроорганізмів не йде паралельно з утворенням біомаси. Інтенсивний синтез каротиноїдів починається, коли в середовищі використаний весь азот, а зростання культури зменшується. В якості стимуляторів в поживні середовища додають екстракти цитрусових і дріжджів.

Каротин використовують при виготовленні харчових продуктів як барвник. Його застосовують при виготовленні ковбас з метою заміни нітриту натрію і забезпечення високої інтенсивності і стійкості кольору.

Використовують при виробництві льодяників, харчових паст, кексів та інших кондитерських виробів.

У багатьох країнах каротин застосовують для підфарбовування вершкового масла. Нагрівають до 30°C, додають каротин, який при такій температурі добре розчиняється в маслі. В Італії каротиноїди використовують у виробництві макаронних виробів. Каротин застосовується для стабілізації кольору м'яса охолодженого та замороженого в тушах. З цією метою розчин каротину наносять на поверхню м'яса. Крім того, каротин володіє антиокислювальні властивості, які використовуються для продовження терміну зберігання продукту.

Етанол. Вид синтезу. Технологічний процес ґрунтується на мікробіологічному синтезі, де фенотип генетично модифікованих дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) визначає високий вихід етанолу. Мікробіологічний синтез представляє собою методи отримання сполук та продуктів завдяки життєдіяльності мікробних клітин. Отримані сполуки та продукти належать до біотехнологічних. Дріжджі, як мікроорганізми, мають унікальну здатність перетворювати глюкозу на етанол і вуглекислоту в анаеробних умовах.

Тип виробництва. Процес культивування дріжджів на етапі виробництва етанолу вимагає застосування асептичних умов. Це гарантує високий рівень стерильності та запобігає забрудненню культури іншими мікроорганізмами. Використання стерильного середовища забезпечує стабільний ріст та розвиток дріжджів, що впливає на ефективність процесу вирощування. Виготовлення стерильних і асептичних медичних засобів потребує спеціальних умов. Ці препарати повинні відповідати таким вимогам: терапевтична ефективність, чистота, стерильність, безпечність для пацієнта, апірогенність, відсутність механічних включень.

Технологічний процес. Процес вирощування дріжджів для отримання етанолу складається з декількох етапів. Починаючи з підготовки поживного середовища, де глюкоза або інші цукри виступають основними джерелами вуглеводів для дріжджів. Після цього проводиться інокуляція стартовою культурою дріжджів, яка вводиться в асептичний біореактор. Під час

культивування в біореакторі, дріжджі проймають ферментативний процес, перетворюючи цукри на етанол і CO_2 . Оптимізація температури, рН та концентрації поживних речовин відіграє важливу роль у максимізації виходу етанолу. Після завершення цього етапу, етанол вилучається та очищується, щоб отримати продукт високої чистоти (рис. 30).

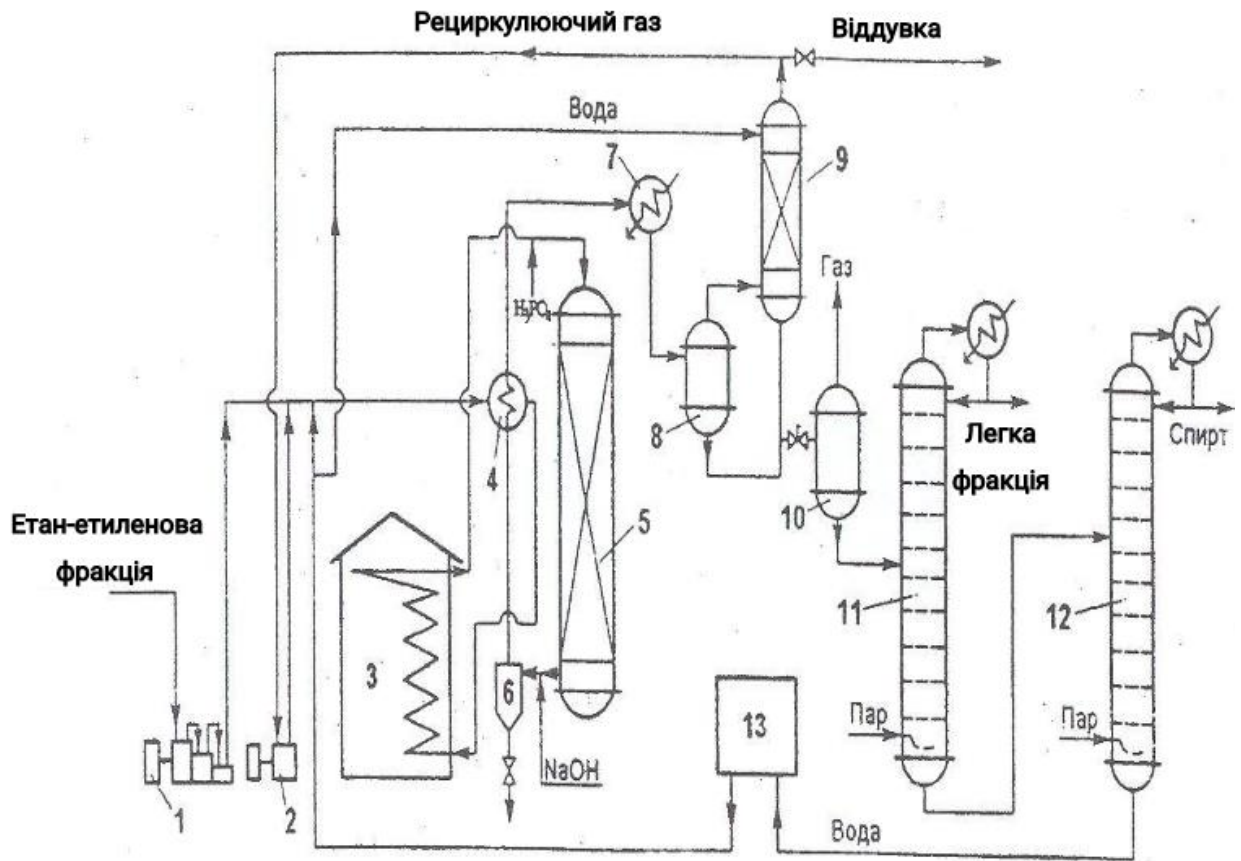


Рис. 30. Технологічна схема виробництва етанолу

Вирощування дріжджів у виробництві етанолу є складним технологічним процесом, який потребує уважного контролю параметрів культивування. Оптимізація умов вирощування та застосування високопродуктивних штамів дріжджів є ключовими факторами для забезпечення ефективності та стабільності виробництва етанолу.

Фруктоза. Фруктоза порівняно з глюкозою, має приємний смак, на 60...70% солодша, тобто її споживають менше звичайного цукру. 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.

Біохімічна суть процесу зводиться до перетворення (ізомеризації) глюкози, заздалегідь отриманої внаслідок гідролізу кукурудзяного або картопляного крохмалю у фруктозу під впливом іммобілізованої глюкозоізомерази. Препарат іммобілізованої глюкозоізомерази є комерційним і виготовляється за використання генетично модифікованих мікроорганізмів. Комерційні препарати іммобілізованої глюкозоізомерази мають вигляд гранул, кульок, волокон або аморфної маси.

Отже, початковою сировиною для технологічного процесу служить глюкоза, яку отримують при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю у присутності мінеральних кислот. 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 глюкозофруктозного сиропу на 1 кг іммобілізованого ферменту в залежності від чистоти вихідної сировини, а час напівінактивації 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 глюкозофруктозних сиропів з використанням іммобілізованої глюкозоізомерази в 1,5 рази вигідніше отримання сахарози з цукрового буряка за традиційною технологією.

2) Отримання БАР за допомогою ГМО: антибіотики, інтерферони, інсулін. Антибіотики. Антибіотики – це низькомолекулярні речовини, які розрізняються за хімічною структурою. Загальне в цих сполуках є те, що, залишаючись продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, вони в дуже малих концентраціях порушують ріст мікроорганізмів. Більшість антибіотиків належать до вторинних метаболітів, так званих ідіолітів.

Для створення нової біотехнології масштабного виробництва антибіотиків використовуються підходи, що стосуються використання генетично модифікованих організмів (ГМО).

Перший підхід, генноінженерний, передбачає використання плазмід *E.coli* як векторів для створення рекомбінантних ДНК, що містять гени, які контролюють біосинтез ферментів, що каталізують лімітуючі етапи синтезу антибіотика. Це дозволяє ефективно керувати виробництвом необхідних ферментів у клітинах-продуцентах.

Другий підхід полягає у виділенні лімітуючих реакцій і за допомогою генетичної інженерії конструюванні генів "вузьких місць" та отриманні відповідного штаму-продуцента, який виробляє достатню кількість первинного метаболіту, що раніше обмежував швидкість біосинтезу антибіотика. Це дозволяє значно підвищити продуктивність продуцента цефалоспорину.

Третій підхід передбачає введення в геном мікроорганізму інформації про фермент, необхідний для модифікації продукованого антибіотика, наприклад, метилювання за допомогою метилаз. Цей метод дозволяє створювати модифіковані форми антибіотиків з покращеними властивостями.

Четвертий підхід, мутаційний біосинтез (мутасинтез), полягає в отриманні штамів-мутантів, у яких блоковано утворення окремих фрагментів молекули антибіотика. Такі мутантні штами використовують для завершення синтезу антибіотичної молекули, отримуючи модифіковані або гібридні антибіотики.

П'ятий підхід передбачає використання штамів-суперпродуцентів антибіотиків з вдосконаленим захистом продуцента від синтезованого ним антибіотика. Ці підходи дозволяють використовувати генетично модифіковані організми для ефективного виробництва антибіотиків з покращеними характеристиками і високою продуктивністю.

Інтерферони. Інтерферони – це білки, до складу поліпептидного ланцюга яких входить 146–166 амінокислотних залишків. Вони синтезуються клітинами хребетних у відповідь на вірусну інфекцію і забезпечують

неспецифічний протівірусний імунітет. Біосинтез інтерферону як відповідь на проникнення вірусної інфекції є однією з реакцій організму, яка найшвидше реалізується і значно випереджає реакції імунної відповіді. Фактично інтерферони є першою лінією оборони проти вірусної атаки.

Використання генно-інженерних методів дозволило виробляти інтерлейкіни та інтерферони. Дані препарати на основі рекомбінантних білків отримують, уводячи гени, що містять інформацію про синтез білків людини, таких як гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор, альфа-2 β -інтерферон, альфа-2 α -інтерферон, інтерлейкін-2 до геному *Escherichia coli* (нейпоген, егіферон, лаферон, пролейкін та ін.) або до цитоплазми у вигляді плазмід (лейкомакс).

Технологічна схема одержання генно-інженерних інтерферонів принципово зводиться до такого:

1. індукція синтезу й виділення інтерференової мРНК із клітин;
2. одержання кДНК (рис.31.), комплементарної інтерференової мРНК із лейкоцитів;

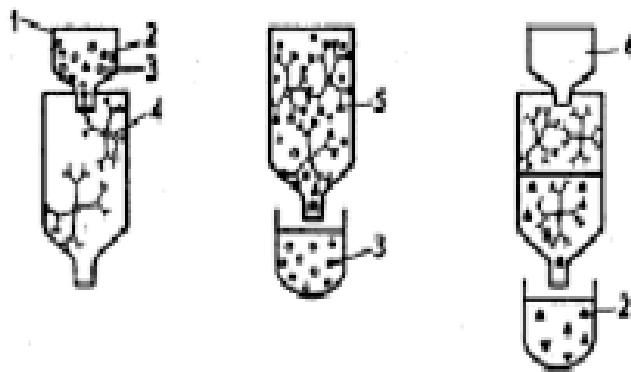


Рис. 31. Етапи клонування гена інтерферону:

1 – мРНК інтерферону з індукованих клітин; 2 – кДНК1 комплементарна одноланцюгова ДНК; 2, а – кДНК2 комплементарна дволанцюгова ДНК; 3 – зворотна транскриптаза; 4 – синтез дволанцюгової ДНК; 5 – кінцева трансфераза; 6 – рестрикція; 7 – кДНК з липкими кінцями; 8 – відпалювання; 9 – ДНК інтерферону; 10 – введення в клітини *E. coli* рекомбінантної плазмиди; КО – клонування і відбір колоній; БРП – «бібліотека» рекомбінантних плазмід

3. вбудовування кДНК у плазмиду;
4. введення реконструйованої плазмиди в клітини *E. coli*;

5. розмноження бактерій, що містять реконструйовану плазмиду, у культуральному середовищі;
6. сепарування клітин *E. coli*;
7. дезінтеграція й екстракція клітин *E. coli*;
8. осадження (наприклад, поліетиленаміном) з наступним центрифугуванням;
9. висолювання інтерферону із супернатанта сульфатом амонію;
10. діаліз осаду інтерферону;
11. очищення інтерферону (рис. 32), пропущення розчину через колонку з імуносорбентом (пришитими моноклональними антитілами);
12. елюїрування інтерферону з наступною хроматографією на целюлозному катіонообміннику.

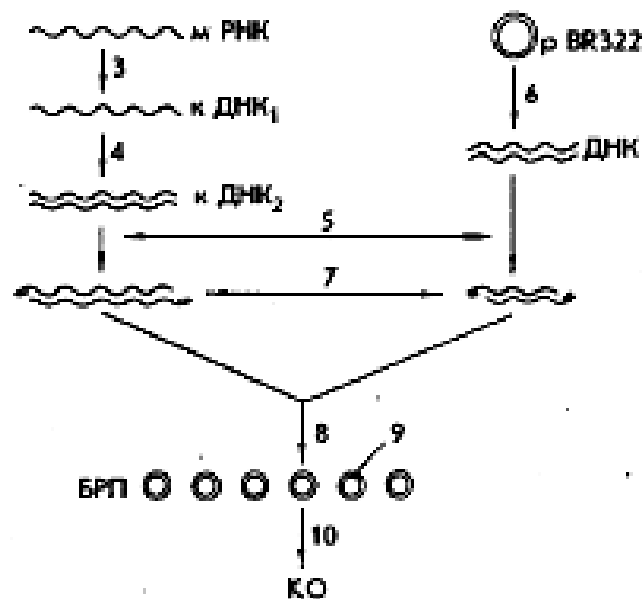


Рис. 32. Схема очищення рекомбінантних інтерферонів за допомогою моноклональних антитіл:

- 1 – діаліз із інтерфероном та іншими бактеріальними білками; 2 – інтерферон; 3 – баластні білки; 4 – моноклональні антитіла (МАТ); 5 – інтерферон, що зв'язався з МАТ; 6 – слабка кислота

Інсулін. Інсулін – гормон острівків Лангерганса підшлункової залози, який регулює процеси вуглеводного обміну і підтримки нормального рівня цукру в крові. Синтезується інсулін на рибосомах в β -клітинах острівків

лангерганса підшлункової залози у вигляді одноланцюгового попередника – препроінсуліну довжиною в 109 амінокислот. Інсулін, який був синтезований з інсуліну свині за рахунок заміни одного амінокислотного залишку на інший, не завжди є задовільним. Тому виникла потреба у виробництві інсуліну людини (рис. 33), що продукується бактеріями.

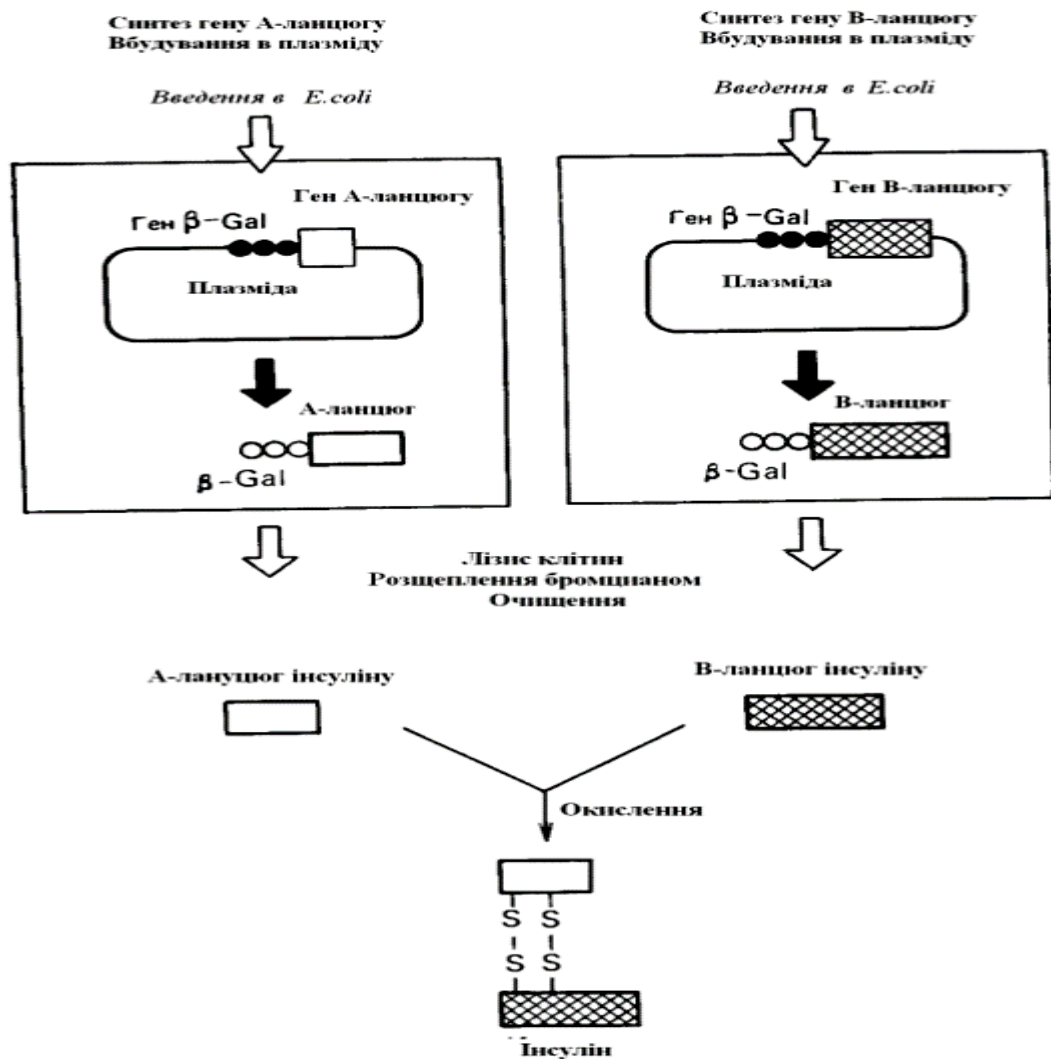


Рис. 33. Отримання інсуліну людини на основі рекомбінантних ДНК (Miller, Baxter, 1980)

Нуклеотидна послідовність кожного з ланцюгів інсуліну була розроблена штучно на основі відомої амінокислотної послідовності і генетичного коду з урахуванням частоти використання різних кодонів в бактеріальній ДНК. Кожна ділянка гену була введена у векторну плазмиду і рекомбінантна клітина синтезувала химерний білок, який складався з А- і В-пептидів інсуліну, однак з'єднання цих ланцюгів не завжди відбувалось так, як необхідно для утворення біологічно активної речовини, і тому цей спосіб

отримання інсуліну був не дуже ефективним.

Хіміко-ферментативний синтез за участі ГМО має декілька переваг:

1. необхідну структуру ДНК можна отримати з урахуванням експресії в різних організмах, тобто ввести в певні місця необхідні сайти рестрикції,

2. хімічний синтез виключає найбільш складний етап – виділення з природного джерела відповідної мРНК або геномної ДНК.

3. він спрощує модифікацію гену і білку, який з нього отримують. Загальна конструкція гену передбачала також проведення його клонування і експресії у складі бактеріальної плазмиди.

В структуру синтетичного полінуклеотиду крім триплетів, що кодують амінокислоти проінсуліну, були введені кодони ініціації і термінації трансляції, а також "ліпкі кінці" для введення гену у векторну молекулу. Експресія гену відбувалась за допомогою регуляторних елементів (рис. 33) .

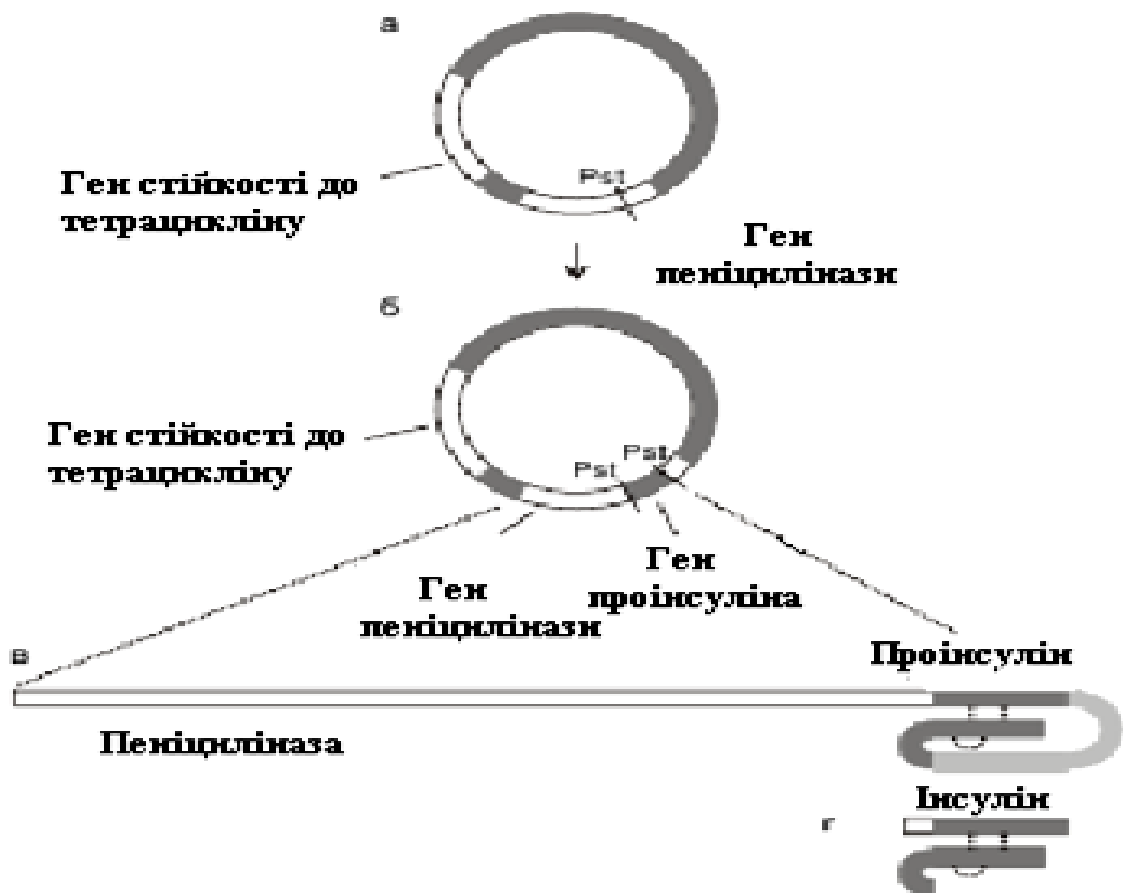


Рис.33. Біосинтез інсуліну пацюка у клітинах *E.coli*, що були сконструйовані (за Gilbert e.a., 1980):

а) карта плазмід рBR322 із двома генами – пеніцилінази і стійкості до тетрацикліну; б) карта, що отримана під час визначення послідовності кДНК рекомбінантної плазмід у клоні *E.coli*, який продукує інсулін; в) гібридний білок; г) біологічно активний інсулін після видалення пеніцилінази і сегменту проінсуліну

Синтез гену включає декілька етапів: 1 синтез більш ніж 40 олігонуклеотидів – сегментів, з яких складається весь ген; 2 ферментативна зборка синтезованих сегментів за допомогою ДНК-лігази; дволанцюгові полінуклеотиди довжиною 286 пар основ, що були отримані, вбудовувались в плазмідні вектори; після добудування і корекції регуляторних ділянок ДНК, що забезпечують експресію генетичного матеріалу, гени були введені в бактеріальні клітини.

Штами, що отримані, є продуцентами проінсуліну, який може бути перетворений в активний інсулін. В наш час такий інсулін широко використовується в медичній практиці для лікування цукрового діабету.

3) Виробництво моноклональних антитіл за допомоги *E. Coli*. Моноклональні антитіла (МАТ) є специфічними антитілами, націленими на певний епітоп антигену, що застосовуються в діагностиці та терапії різних захворювань, включаючи рак, ревматологічні та гематологічні недуги.

Моноклональні антитіла (МКА) – це специфічні імуноглобуліни, отримані з одного клону В-лімфоцитів, які розпізнають і зв'язують лише один певний антиген або його епітоп. Вони є високоспецифічними біомолекулами, які широко використовуються в медичній діагностиці, терапії та наукових дослідженнях.

Біологічна суть та принцип отримання

Моноклональні антитіла вперше були отримані в 1975 році Дж. Келером і С. Мілстайном за допомогою гібридомної технології — об'єднання В-лімфоцитів, що продукують антитіла, з раковими клітинами мієломи. У результаті утворюються гібридоми, які поєднують здатність до безмежного поділу з можливістю синтезу специфічних антитіл.

Основні властивості

Висока специфічність – кожне моноклональне антитіло розпізнає лише один антиген.

Стабільність – здатність до тривалого зберігання без втрати активності.

Відтворюваність – можливість одержання однакових антитіл у великих кількостях.

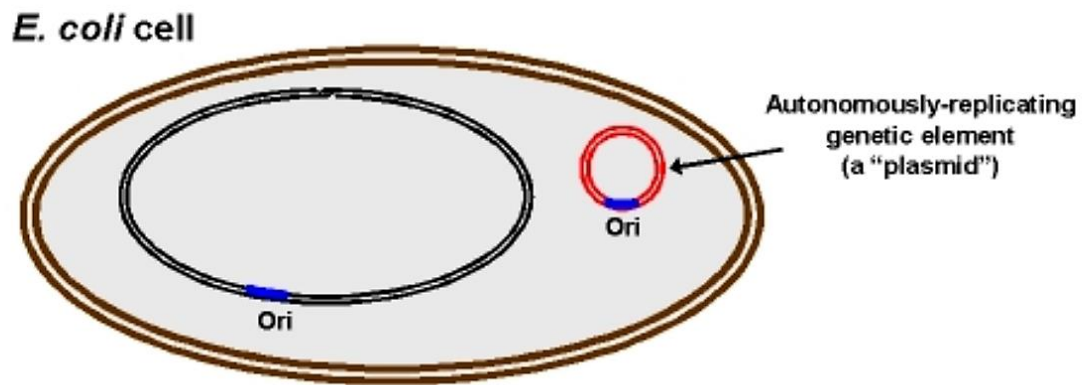
Модифікованість – МКА можуть бути "людськими", "гуманізованими" або "химерними" для зниження імуногенності при введенні людині.

Спочатку МАТ виробляли за допомогою гібридомної технології, яка включала злиття клітин селезінки щура, імунізованого специфічним антигеном, і клітин мієломи миші. Проте мишачі антитіла викликали імунну відповідь у людей, знижуючи ефективність лікування. Для отримання моноклональних антитіл з використанням *E. coli* застосовують технологію рекомбінантної ДНК.

Технології рДНК дозволяють створювати химерні, гуманізовані або повністю людські антитіла. Одним із таких підходів є метод фагового дисплею, який базується на вбудовуванні гену, що кодує потрібні антитіла, у геном бактеріофага. Фаг реплікує ці антитіла на своїй оболонці, що дозволяє отримувати їх у великих кількостях.

Основні етапи виробництва моноклональних антитіл за участю *E. coli* включають:

1. Тварин імунізують специфічним антигеном для стимуляції вироблення антитіл.
2. Виділяють лімфоцити, що виробляють антитіла, з селезінки або крові імунізованих тварин.
3. Гени, що кодують антитіла, вбудовують у плазміді *E. coli*.
4. Плазміді вводять у клітини *E. coli* (рис. 34), які починають синтезувати антитіла.
5. Трансформовані клітини вирощують у відповідних середовищах для отримання великої кількості антитіл.
6. Отримані антитіла очищають від клітинних компонентів і домішок для подальшого використання.



*Рис. 34. Трансформація *E. coli**

Даний підхід використання *E. coli* дозволяє виробляти потенційно гуманізовані моноклональні антитіла у промислових масштабах, що значно підвищує ефективність і знижує вартість їх виробництва.

Переваги над поліклональними антитілами

Моноклональні антитіла забезпечують високу точність та відтворюваність результатів, тоді як поліклональні можуть взаємодіяти з кількома антигенами, що ускладнює аналіз.

Сучасні напрямки розвитку

У сучасній біомедицині активно розробляються біспецифічні моноклональні антитіла, які можуть одночасно розпізнавати два різні антигени, та антитіла-кон'югати, що поєднують імуноглобуліни з цитотоксичними агентами для прицільного знищення патологічних клітин.

Лекція 11. Створення і використання генетично-модифікованих рослин

- 1. Створення трансгенних рослин. Проблема трансформації та прийоми отримання ГМ-рослин**
- 2. Створення стійких до різних факторів рослин: абіотичних факторів, фітопатогенів (грибків, вірусів, бактерій), комах-шкідників, гербіцидів)**
- 3. Рослини «біореактори»**

1) Трансгенні рослини – це рослини, ДНК яких модифіковане шляхом застосування генетичноінженерних методів. Основною ціллю створення ГМ рослин є представлення нових сортів із специфічними ознаками, які не притаманні для рослин цього виду. Прикладом таких ознак можуть бути стійкість до різного роду гербіцидів, шкідників, стійкість до несприятливих умов зовнішнього середовища (солестійкість, посухостійкість тощо) чи набуття нових якостей харчового значення. Найпоширенішими методами, які дозволяють здійснити привнесення чужорідної ДНК-конструкції в геном рослини, є біолістичний метод та використання Ті-плазмід від *Agrobacterium tumefaciens*.

Основним методом отримання трансгенних рослин 20-25 років тому була пряма обробка меристем, насіння, пилку чужорідною ДНК та послідовний скринінг потомства на наявність інтродукованих генів. Першою генно-інженерною рослиною була створена в Університеті штату Вісконсін химера, коли в клітині соняшнику був введений ген запасного білку бобів (ген фазеоліну) та показана його експресія.

В Україні були проведені експерименти по генетичній трансформації кукурудзи та гороху. Проводилась генетична трансформація рослин шляхом мікроін'єкцій ДНК та електропорації протопластів. Справжньою революцією в генетичній модифікації рослин є виявлення природного вектору – агробактерій для переносу генів та розробка методу мікробомбардування

(біобалістика) рослинних об'єктів мікрочастинками металів попередньо покритими ДНК.

Важливою **проблемою при трансформації рослин є отримання частини трансгенних рослин**, які є химерами, тобто їх тканини містять як трансформовані так і не трансформовані клітини. В даному випадку використовують один штам, який несе певний ген, яким інокулюють різні типи експлантів. Протягом довгого періоду часу вважали, що агробактерії здатні трансформувати тільки клітини голонасінних та дводольних рослин. Однією із причин, що обмежують агробактеріальну трансформацію злаків є нездатність їх клітин до синтезу сполук, які індують процесинг та перенесення рДНК. Проте на сучасному етапі вже розроблена трансформація для пшениці, кукурудзи та рису. Порівняна простота отримання трансгенних рослин при агробактеріальній трансформації, можливість використання уже сформованих меристем та приємливість даної методики для трансформації злаків дають прогнозувати зростання кількості трансгенних рослин для теоретичних досліджень та практичного використання даного методу трансформації.

Пряма трансформація з використанням ДНК. Для прямого перенесення генів в рослинні клітини використовують трансформацію рослинних протопластів. Як маркерний ген використовують ген неоміцин фосфотрансфери, який визначає стійкість до канаміцину та деяким іншим аміно глікозидним антибіотикам. Основною перевагою даного гену є здатність тільки трансформованих клітин до росту та позеленінню на певних концентраціях антибіотиків. На сучасному етапі 140 видів рослин були протрансформовані шляхом прямого перенесення ДНК .

Біобалістика. Найбільш розповсюдженим методом прямого перенесення ДНК є бомбардування рослинних тканин мікрочастинками металів (біобалістика). Цей метод вперше був використаний для отримання трансгенних рослин у 1987 році. Метод полягає в обстрілі клітин рослин мікрочастинками (діаметром 0,5–1 мкм) вольфраму або золота, на поверхні яких адсорбовані молекули ДНК. Для цього необхідне спеціальне обладнання

– генна гармата. Як об'єкти для бомбардування, зазвичай використовують калюси або тканинні експланти (меристеми).

Електропорація протопластів. Основною умовою для широкого застосування методів прямої трансформації протопластів є наявність надійних, добре розроблених систем регенерації повноцінних рослин у культурі *in vitro*. При використанні цього методу фрагменти екзогенної ДНК надходять у протопласти (рослинні клітини, позбавлені целюлозних оболонок) через пори в ліпідній оболонці, утворені дією короткого електричного імпульсу. Утворення таких пор є зворотнім за умови, що сила прикладеного електричного поля не перевищує певного порогового значення. В іншому випадку, відбувається масова загибель клітин.

Використання поліетиленгліколю (ПЕГ) для трансформації протопластів базується на його здатності стимулювати в присутності двовалентних катіонів преципітацію ДНК на поверхні мембрани з подальшим поглинанням фрагментів екзогенної ДНК за допомогою ендоцитозу.

Використання карбіду кремнію для трансформації клітин рослин, калюсів і рослинних експлантів є дуже простим і дешевим методом. Цей метод полягає в інтенсивному спільному перемішуванні (на шейкері) кристалів карбіду кремнію з рослинним матеріалом і фрагментами екзогенної ДНК, призначеної для введення в клітини. Під час перемішування кристали карбіду кремнію проколюють целюлозні оболонки, завдяки чому ДНК проникає в клітини і може інтегруватися в рослинний геном. Основним недоліком цього методу є низька ефективність, обумовлена загибеллю клітин при пораненні.

2) Створення стійких до різних факторів рослин: абіотичних факторів, фітопатогенів (грибків, вірусів, бактерій), комах-шкідників, гербіцидів). *Пристосованість рослин до умов зовнішнього середовища як результат їх еволюції.* Еволюційні зміни у фізіолого-біохімічних процесах, анатомічній будові, морфологічних адаптаціях рослин забезпечують їхню пристосованість до несприятливих умов. У процесі еволюції сформувалися спадкові адаптивні реакції, такі як

фотоморфогенетичні реакції, термо- і фотоперіодизм. Яровизація та термоперіодизм допомагають рослинам пристосовуватися до змін температури. При фотоперіодизмі рослини реагують на сезонні ритми, що впливає на їхні життєві процеси. При значних змінах зовнішніх умов функціональний стан організму змінюється від активізації до гальмування і летальності. Зменшення світлового періоду та зниження температури викликають зміни у метаболічних процесах, що допомагає рослинам пристосовуватися до несприятливих умов.

Зимостійкість. Зимостійкість – це здатність рослин витримувати комплекс несприятливих зимових факторів. Значні морози, відлиги, завірюхи та суховії можуть викликати випрівання, вимокання, випирання та зимову посуху. Випрівання виникає при великому сніговому покриві, вимокання - під час відлиг, випирання – при відсутності снігу. Зимова посуха виникає при сильних вітрах і нестачі опадів. Підвищення зимостійкості досягається агротехнічними заходами, такими як вапнування ґрунтів, внесення добрив і снігозатримання.

Дія на рослини максимальних температур. Рослини поділяються на три групи: термофільні бактерії і водорості, що переносять температуру 75-90°C; жаровитривалі рослини (сукуленти і ксерофіти), що витримують до 60°C; і нежаростійкі мезофітні і водні рослини, що витримують до 40°C. Жаростійкість залежить від температури і тривалості її дії. Високі температури зменшують площу листків, їх фотосинтетичну активність і викликають структурні зміни генеративних клітин. Адаптивні пристосування, такі як транспірація і вертикальне орієнтування листків, допомагають захиститися від теплових ушкоджень. Короткочасний тепловий шок може пригнічувати захисні реакції рослин проти інфекцій. Реакція рослин на високу температуру визначається функціональними і структурними особливостями клітин. Молоді рослини менш стійкі до високих температур, ніж старі. Висока температура під час цвітіння викликає стерильність квіток і обпадання зав'язей. Для підвищення жаростійкості рослин використовують обробку насіння хлористим кальцієм і зрошування.

Посухостійкість рослин. Класифікація рослин за відношенням до води. Посуха – це тривала нестача вологи, що призводить до великих втрат урожаю. Посухостійкість – це здатність рослин витримувати нестачу вологи. Є два види посухи: атмосферна і ґрунтова. Атмосферна посуха спостерігається весною і викликає збільшення транспірації. Ґрунтова посуха виникає влітку, ушкоджуючи кореневу систему і порушуючи водний режим рослин. Посухостійкі рослини мають високий вміст зв'язаної води, в'язкість цитоплазми і анатомоморфологічні пристосування. Ксерофіти є найбільш посухостійкими рослинами. Мезофіти, рослини помірного клімату, мають помірну стійкість до посухи. Гігрофіти та гідрофіти менш стійкі до посухи. Посуха найбільш шкідлива під час формування генеративних органів. Діагностику посухостійкості проводять польовими і лабораторними методами. Зрошення і внесення мінеральних добрив допомагають боротися з посухою. Найкращий спосіб поливу – дощування, яке зволожує ґрунт і покращує мікроклімат.

Трансгенні рослини стійкі до комах. Генно-інженерні методи використовуються для створення рослин, які мають підвищену стійкість до комах, зокрема за допомогою бактерії *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt бактерії виробляють інсектицидний білок-прототоксин, який активується у кишечнику комах, призводячи до їхньої загибелі. Раніше препарати на основі цього токсину швидко розкладалися, але застосування генної інженерії дозволяє внести bt2-ген з геному Bt в рослини.

Процес включає витягування гену bt2, його вставлення під контроль промотору 35S CaMV, та інтеграцію в геном рослин тютюну через агробактеріальну трансформацію. Виявлено, що цей ген ефективно експресується в рослинних клітинах, що підтверджується як на рівні транскрипції, так і трансляції, забезпечуючи синтез білка-токсину.

Трансгенні рослини тютюну, які містять bt2-ген, проявляють стійкість до шкідників. Використання таких рослин в томатах також продемонструвало ефективний захист від комах порівняно з традиційними інсектицидами.

Трансгенні рослини стійкі до фітопатогенів. При дії фітопатогенів у

рослинах вмикається каскад механізмів захисних реакцій. При цьому активні до інфекцій реакції можуть проходити за двома основними напрямками:

1. починається синтез сполук, що є токсичними, обмежують життєдіяльність патогенів і в підсумку зумовлюють їх загибель.
2. можуть створюватись структурні бар'єри, які запобігають ушкодженню рослин і поширенню патогенів. Це досягається лігніфікацією клітинних стінок рослин або зміцненням клітинних стінок глікопротеїдами, що зумовлюють захист тканин від пошкодження фітопатогенами.

Застосування методів генетичної інженерії, використовуючи природні захисні механізми дозволяє отримувати трансгенні рослини, стійкі до грибової, бактеріальної та вірусної інфекції. Експериментально встановлено кодування білків хітинази і глюканази одним геном, що використовується для генно-інженерних робіт з отримання трансгенних рослин, стійких до фітопатогенів. Трансгенні рослини різних видів, таких як тютюн, бавовна, кукурудза, ріпак, томат, рис, картопля, люцерна, турнепс та інші, були створені, експресуючи ген хітинази під контролем промотора 35S CaMV. Ці рослини виявили стійкість до грибкових інфекцій. Інший метод отримання стійких до патогенів рослин включає трансформацію генами, які кодують ферменти біосинтезу фітоалексинів. Цей підхід підняв рівень стійкості рослин томату, картоплі та тютюну до фітофторозу, фузаріозу та сірої гнилі відповідно.

Гени хітинази та глюконази кодуються одиночними генами. Завдяки цьому були отримані трансгенні рослини тютюну, турнепса, до складу геному яких ввели ген хитинази. Лабораторні та польові випробування виявили велику стійкість трансгенних рослин. В рослини томатів був введений ген захисних пептидів редьки *rs*, що відповідає за стійкість до фітопатогенних грибів. Нарешті, перспективні клонування та переніс генів, які кодують специфічні білки (small antibiotic-like proteins), що містяться у насінні багатьох рослин. Ці білки захищають насіння в період спокою та в час проростання від грибних та бактеріальних інфекцій.

Інший підхід для отримання трансгенних рослин, стійких до вірусної

інфекції, полягає у введенні в геном вихідних рослин гена оболонки вірусу. Це призводить до інгибування розмноження вірусу та зниження інфікованості. Завдяки такому підходу був отриманий стійкий антивірусний ефект у рослин тютюну, трансформованих геном оболонки вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ).

Ще одна група методів отримання транс генних рослин, стійких до дії фітовірусів, включає введення та експресію генів антивірусних антитіл, вірусних сателітних РНК. Цікавий ефект дало введення в геном рослини гену людського інтерферону **JFN** – одного з ключових білків індукції імунітету ссавців. За допомогою вірусів мозаїки кольорової капусти геном інтерферону були трансформовані рослини турнепсу, тютюну, картоплі, що збільшило стійкість цих рослин до вірусних захворювань. Однак в даний час більш перспективними вважаються методи, засновані на використанні рослинних генів, що обумовлюють велику стійкість трансформації рослин й низьку стійкість до фітопатогенів.

Стійкість рослин до пестицидів. У сучасному сільському господарстві широко використовуються гербіциди для знищення бур'янів, але вони можуть також пригнічувати ріст культурних рослин. Тому необхідно створювати стійкі до гербіцидів рослини. Це можливо через пряму селекцію стійких мутантних форм або генно-інженерним методом, що включає введення генів гербіцид-резистентності. Вивчення механізмів стійкості складається з чотирьох етапів: визначення мішені дії гербіцидів, відбір стійких рослин, ідентифікація та клонування генів, вивчення їх експресії для трансгенних конструкцій. Генетична інженерія дозволила створити стійкі до гербіцидів культури шляхом введення генів, що кодують ферменти, стійкі до гербіцидів, як атразин, бромоксилін, імідазол.

Наприклад, рослини лядвенця рогатого трансформували бактерією, що містить ген *bar*, який надає стійкість до білофосу. Такі рослини накопичують гербіциди, тому придатні лише для технічного використання. Введення генів, що кодують інші ферменти, дозволяє проводити детоксикацію гербіцидів, створюючи придатні до вживання рослини. Наприклад, ген монооксигенази дозволяє детоксикувати 2,4-D, а ген фосфонатази – гліфосат. Створення

стійких до комах трансгенних рослин стало можливим завдяки виявленню білка-прототоксину у бактерії *Bacillus thuringiensis*, що токсичний для комах. Ген, відповідальний за цей білок, було введено в рослини тютюну і томатів, отримавши перші трансгенні рослини, стійкі до комах.

3) Рослини «біореактори». Рослини-продуценти антитіл. Успіхи в галузі генетичної інженерії та розшифрування послідовностей рослинних геномів відкрили нові можливості у використанні рослин для отримання рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

Рослини для виробництва рекомбінантних білків для фармакології мають низку переваг: економічність, можливість широкомасштабного виробництва з помірною вартістю продукту, здатність синтезувати багато складних білків людини і тварин у правильно згорнутій і модифікованій формі, відсутність проблем, пов'язаних із безпекою зараження вірусами тварин. У ряді випадків немає потреби в очищенні виробленого рекомбінантного поліпептиду, оскільки білки, що накопичуються в традиційно використовуваних у харчуванні рослинах (морква, салат, капуста тощо), можуть вводитися в організм теплокровних тварин і людини перорально в складі рослинних тканин.

Оскільки слизова оболонка шлунково-кишкового тракту функціонує як частина імунної системи організму, а функцію захисної капсули, що оберігає білок від руйнівної дії шлункових ферментів, може виконувати клітинна стінка трансгенних рослин, такі рослини можуть бути використані як так звані «їстівні» вакцини. Рослинні клітини також можна використовувати для доставки терапевтичних білків, що мають прямий регуляторний вплив на клітини імунної системи шлунково-кишкового тракту.

Мета імунізації організму вакцинами – індукувати продукцію антитіл до патогенного агента. Альтернативою такого підходу є метод пасивної імунізації, заснований на введенні готових імуноглобулінів. Широке застосування такого підходу довгий час було обмежено високою вартістю антитіл, отриманих традиційними методами. У 1989 році А. Хіатт показав

можливість зборки функціонально активних імуноглобулінів класу IgG і IgA (табл. 4) з легких і важких ланцюгів у рослинах тютюну. На сьогодні у кількох великих лабораторіях світу були отримані трансгенні рослини-продуценти різних типів антитіл до епітопів низки патогенних агентів.

Таблиця 4

Рослини-продуценти антитіл

Використання та специфічність	Клас антитіл	Рослина-продуцент	Результат
Зубний карієс; стрептококовий антиген	IgA-IgG	Табак	500мкг/г FW
Вірус простого герпесу 2	IgG	Соя	—
Діагностика; anti-human IgG	IgG	Люцерна	1% TSP
Терапія раку; Канцеро ембріональний антиген	ScFv	Пшениця	900 нг/г FW (листки) 1,5 мкг/г FW (насіння)
Терапія раку; Канцеро ембріональний антиген	ScFv	Рис	29 мкг/г FW (листки) 32 мкг/г FW (насіння)

Аналізуючи рівень експресії перенесених генів у геномі рослин-биопродуцентів антитіл, можна відзначити, що рівень продуктивності імуноглобуліну до поверхневого антигену *Staphylococcus mutants* у рослинах тютюну виявився найвищим і склав 500 мкг/г сирої ваги (FW) тканини. Такі антитіла, виділені з трансгенних рослин тютюну, попереджали розвиток карієсу у пацієнтів при безпосередньому нанесенні на зубну емаль і не поступалися за своїми властивостями аналогічним антитілам, отриманим із гібридом мишей.

Імуноглобуліни до канцеро-ембріонального антигену (PEA) були експресовані в трансгенних рослинах рису та пшениці. Такі антитіла використовуються в імунотерапії онкологічних захворювань, а також для візуалізації пухлини *in vivo*. Слід зазначити, що рослини рису виявилися більш

продуктивними щодо накопичення антитіл порівняно з рослинами пшениці.

Рослини-продуценти субодиничних вакцин. Трансгенні рослини-продуценти білків з антигенними властивостями патогенів людини та тварин отримали назву «їстівні вакцини». У кишечнику чужорідний білок, що має антигенні властивості, розпізнається спеціальними М-клітинами, які широко представлені в слизовому епітелії, і організм запускає формування імунітету. Вже отримані трансгенні рослини тютюну, картоплі, люпину, салату, томатів, кукурудзи, арабідопсиса та люцерни, що синтезують антигени різних патогенів людини та тварин. Приклади експресованих антигенів представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Експресовані в рослинах антигени

Патогенний агент або токсин	Рослина-продуцент	Антиген	Рівень експресії
Вірус гепатиту В	Тютюн, Картопля, Люпин, Салат	HbsAg	<0,01% FW
Вірус сказу	Томат	Глікопротеїн вірусу сказу	1% TSP
Ентеропатогенна E. coli	Тютюн, Картопля, Кукурудза	В-субодиниця ентеротоксину E. coli	<0,01% TSP, 0,19% TSP, немає даних
Холерний вібріон	Картопля	В-субодиниця токсину V. cholerae	0,3% TSP
Вірус ящуру	Арабідопсис, Люцерна	VP1	немає даних
Streptococcus mutants (зубний карієс)	Тютюн	S. mutants поверхностний антиген SpaA	немає даних
Цитомегаловірус	Тютюн	Глікопротеїн В	0,02% TSP (насіння)
Вірус Норфолк	Тютюн, Картопля	Антиген капсида вірусу Норфолк	0,23% TSP, 0,37% TSP
ВІЛ-1	Тютюн	gp120	немає даних
Вірус трансмісивного гастроентериту свиней	Арабідопсис, Тютюн, Кукурудза	Глікопротеїн S коронавірусу	0,06% TSP, 0,2% TSP, 0,01% FW

За останні роки в провідних біотехнологічних центрах світу створено трансгенні рослини-продуценти широкого спектра білків для фармакології, що не поступаються за біологічною активністю аналогам з інших систем експресії (табл. 6).

Таблиця 3

Фармацевтичні білки синтезовані з трансгенних рослин

Застосування	Рослина-продуцент	Фармацевтичний білок	Рівень експресії
Анестезія	Арабідопсис	Енкефалін	2,9% (насіння)
Цироз печінки, опіки, хірургія	Тютюн	Сироватковий альбумін	0,02% TSP
Косметологія	Тютюн	Гомологен колагену	0,01% TSP
Лікування гепатитів С і В	Тютюн	β -інтерферон	0,01% TSP
Заживлення ран	Тютюн	Епідермальний фактор росту	0,001% TSP
Інгібітор тромбіну	Рапс	Гірудін	0,3% TSP
Замість гемоглобіну	Тютюн	Гемоглобін	0,003% TSP
Замінник крові	Тютюн	Гемоглобін $\alpha 2\beta 2$	0,05% (насіння)
Замість материнського молока	Картопля	Казеїн	0,01% TSP
Фібриноліз кісток, кровотечення	Рис	$\alpha 1$ -антитрипсин	немає даних
Антикоагулянт	Тютюн	Білок С	0,01% TSP
Інгібітор трипсину	Кукурудза	Апротинін	немає даних
Гормон росту	Тютюн	Соматотропін	0,18% (насіння)
Антимікробне засіб	Тютюн	Лактоферин	0,1% TSP
Синдром Гоше	Тютюн	Глюкоцереб্রозідаза	1% TSP
Запальні захворювання кишечника	Тютюн	Інтерлейкін-10	0,0055% TSP
Нейропатія	Тютюн	ГМ-КСФ	0,01% TSP
Імунотерапія раку	Картопля	Інтерлейкін-2	0,05% (насіння)
Хвороба Педжета, Остеопороз	Картопля	Кальцитонін	0,02% TSP

Такі білки, як гирудин, еритропоетин і гемоглобін, можуть бути використані в терапії гематологічних захворювань. Найперспективнішими є рослини ріпаку, що продукують гирудин (0,3% загального розчинного білка). Білки, синтезовані в рослинах, мають потенціал для терапії різних захворювань, приготування замінників крові (гемоглобін) і материнського молока (казеїн, лактоферин). Серед різних видів рослин особливої уваги заслуговують трансгенні рослини картоплі, які можуть бути використані без попередньої кулінарної обробки.

Лекція 12. Створення трансгенних тварин та їх використання

- 1. Отримання трансгенних мишей та їх застосування**
- 2. Трансгенні сільськогосподарські тварини**
- 3. Трансгенні птахи**
- 4. Трансгенні риби**

1) Отримання трансгенних мишей та їх застосування.

Трансгенез – це технологія генної інженерії, при якій ізольована послідовність генів одного організму поміщується в інший організм для передачі нової або модифікованої ознаки. Така ізольована послідовність генів називається «структурою» і складається з функціонального гена і гена-промотора, який діє як перемикач для активації функціонального гена. Організми, отримані в результаті успішного трансгенезу, класифікуються як геннетично модифіковані організми (ГМО).

Найбільш раннім напрямком стало отримання особин з генами, продукти експресії яких є регуляторами обміну речовин тварин, забезпечуючи досягнення високої продуктивності, економної витрати кормів і зміну якісних характеристик продукції. З генетичної точки зору найбільш цікаві гени, що кодують 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.

У 1984 році було показано, що ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), введені в порожнину бластоцисти, дають початок будь-яким органам і тканинам химерних мишей, включаючи й лінію статевих клітин, і успадковуються нащадками химерної тварини. На рис. 35 показані етапи одержання трансгенних мишей за допомогою ЕСК. Серед усіх цих процедур

одна із трудомісткіших – підтримка лінії ЕСК у недиференційованому стані, придатному для створення химерних тварин. У наш час цю технологію найчастіше використовують для одержання трансгенних мишей, тому що донедавна існували тільки лінії ЕСК миші.

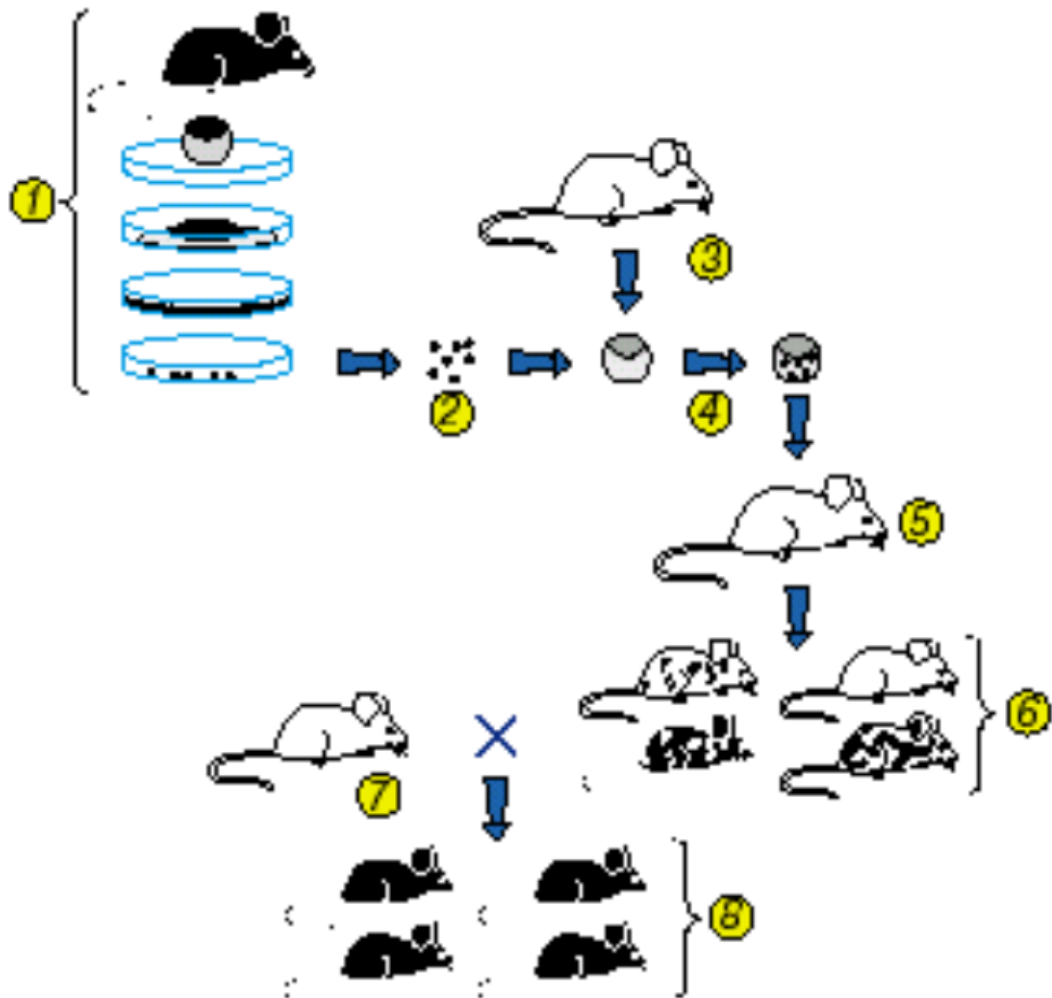


Рис. 35. Схема отримання трансгенних мишей шляхом реконструкції ембріонів із використанням ембріональних стовбурових клітин:

1 – отримання культури ЕСК; 2 – введення у ЕСК генетичної конструкції; 3 – отримання бластоцист для мікроін'єкції: їх отримують від тварин іншої лінії, що відрізняється забарвленням шерсті; 4 – конструювання химерних ембріонів: трансгенні ЕСК вводять у порожнину бластоцисти; 5 – трансплантація химерних ембріонів сурогатної матері; 6 – аналіз тварин, що народилися. Частина з них є химерами, тобто до складу їх організму входять як клітини, що походять із звичайної бластоцисти (на рисунку показані білим кольором), так й клітини-нащадки трансгенних ЕСК (на рисунку – чорні). Для схрещування відбираються тварини, в яких відсоток трансгенних клітин більший; 7 – схрещування химерних самців із самками альбіносною лінії і аналіз їх нащадків для виявлення химерних тварин, які продукують трансгенні гамети; 8 – схрещування мишей покоління тварин F1 для отримання нащадків, гомозиготних за введеним геном (за Семенової М.Л., 2001)

Використання ретровірусних векторів. Генوم ретровірусів відносно невеликий і зручний для маніпулювання, що дозволяє вводити до нього чужорідні гени. Ретровіруси мають високу інфекційність відносно клітин, забезпечуючи майже 100% зараження, і їх генوم ДНК інтегрується в ДНК клітини-мішені точно визначеним чином (рис. 36). Клітини, що отримали разом з вірусом чужорідні гени, здатні експресувати ці гени. Рівень експресії клонованих генів значно підвищується завдяки наявності в ретровірусах активних транскрипційних енансерів. Відомі ретровірусні вектори походять від вірусів лейкозу мишей (MLV) або вірусів птиці (ALV).

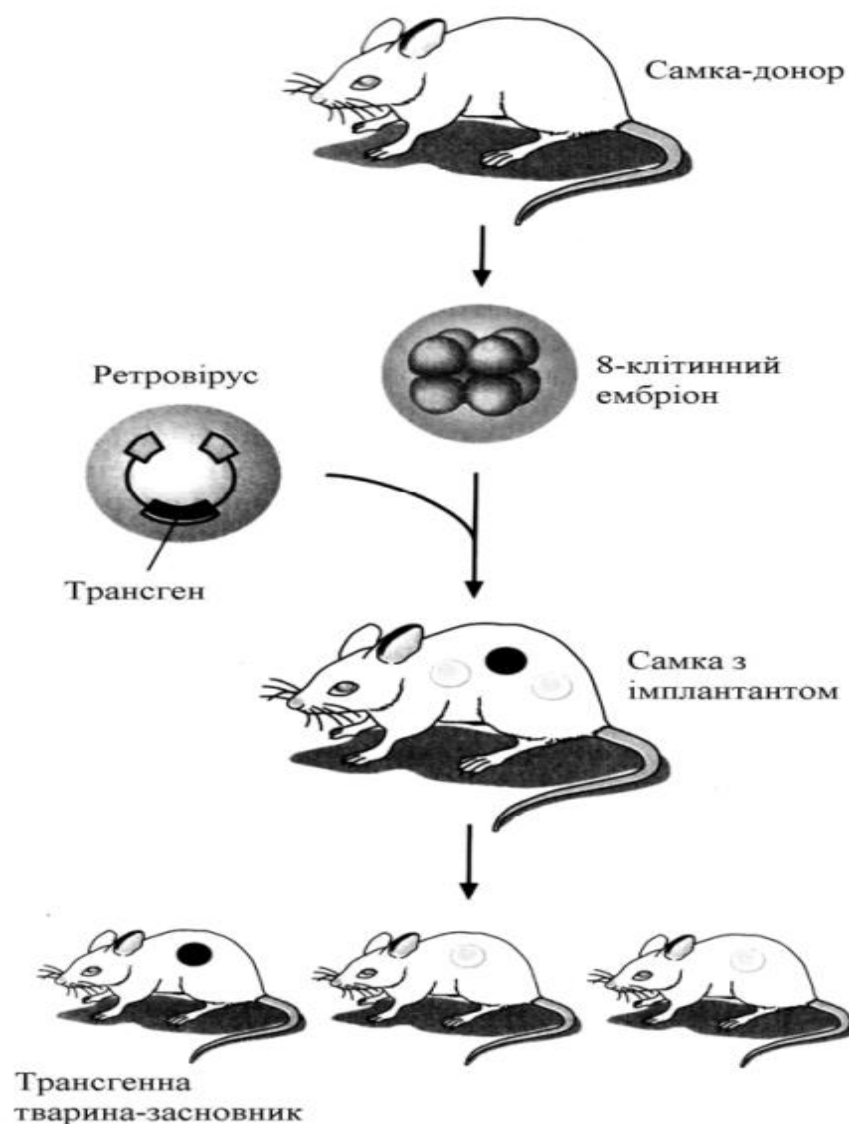


Рис. 36. Отримання трансгенних тварин за допомогою ретровірусів

Кожна вірусна часточка містить дві копії одноланцюгового РНК-генома, який після проникнення в клітину під впливом ревертази

перетворюється на лінійну дволанцюгову ДНК.

Ця ДНК проникає до ядра клітини-мішені, де набуває кільцевої форми для інтеграції в геном. Інтегрована лінійна ДНК-копія ретровірусного генома (провірус) містить на обох кінцях довгі нуклеотидні повтори – LTR (long terminal repeats). 5'LTR містить промотор, з якого починається транскрипція генів провірусу, а 3'LTR – сайт поліаденілювання, де здійснюється термінація РНК-транскриптів.

Ретровірусні вектори можуть бути створені шляхом видалення структурних генів і додавання рестрикційних сайтів для клонування. Для зараження рекомбінантним ретровірусом ембріональних клітин, восьмиклітинну морулу, звільнену від оболонки, поміщають у культуральну рідину з інфікованими фібробластами, що продукують рекомбінантний вірус. Морула інфікується, і після досягнення стадії бластоцисти її вводять у матку псевдовагітної самки. Частина бластоцист може загинути, а частина нормально розвивається і трансформується у трансгенних нащадків. Ці нащадки підлягають ретельному генетичному аналізу і можуть бути використані для створення трансгенних ліній.

Метод мікроін'єкцій ДНК. Сьогодні для створення трансгенних тварин, зокрема, мишей найчастіше використовують метод мікроін'єкцій ДНК (рис. 37). Він потребує таких дій:

1. Збільшення числа яйцеклітин, в які буде ін'єктована чужорідна ДНК шляхом стимуляції гіперовуляції у самок-донорів. Спочатку самкам вводять сироватку жеребної кобили (СЖК), а приблизно через 48 год. – хоріонічний гонадотропін людини. Внаслідок гіперовуляції утворюється приблизно 35 яйцеклітин замість звичайних 5...10.

2. Схрещування із самцями самок з гіперовуляцією і їхнє умертвіння. Вимивання з яйцепроводів запліднених яйцеклітин.

3. Мікроін'єкції ДНК у яйцеклітини, що запліднені відразу після виділення. Трансгенна конструкція, що вводиться, перебуває в лінійній формі й не містить прокаріотичних векторних послідовностей.



Рис. 37. Метод пронуклеарної мікроін'єкції

У ссавців після проникнення спермія до яйцеклітини ядро спермія (чоловічий пронуклеус) і ядро яйцеклітини існують відокремлено. Після того як останнє закінчує мітотичний поділ і стає жіночим пронуклеусом, може відбутися злиття ядер (каріогамія). Чоловічий пронуклеус, звичайно, набагато більший жіночого, його легко локалізувати за допомогою секційного мікроскопа й увести до нього чужорідну ДНК. При цьому яйцеклітину на час проведення мікроін'єкції можна переміщати, орієнтувати потрібним чином і фіксувати.

Після введення ДНК від 25 до 40 яйцеклітин імплантують мікрохірургічним шляхом до сурогатної матері, у якої викликають помилкову вагітність схрещуванням з вазектомованим самцем. У мишей спарювання – це єдиний відомий спосіб підготовки матки до імплантації. Оскільки вазектомований самець сперматозоїдів не продукує, жодна з яйцеклітин

сурогатної матері не запліднюється. Ембріони розвиваються тільки з введених яйцеклітин, і мишенята народжуються майже через 3 тижні після імплантації.

Для ідентифікації трансгенних тварин виділяють ДНК із маленького шматочка хвоста й тестують її на наявність трансгена за допомогою блот-гібридизації за Саузерном, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Щоб визначити, чи перебуває трансген у клітинах зародкової лінії тварини, трансгенну мишу схрещують із іншою мишею. Далі можна проводити схрещування нащадків для одержання чистих (гомозиготних) трансгенних ліній.

Застосування трансгенних тварин. Трансгенні тварини як продуценти цінних біологічно активних білків і гормонів мають ряд переваг перед мікроорганізмами і клітинними системами. Важливо, що нові білки, одержані в лініях клітин трансгенних тварин, можуть бути модифіковані, їх активність порівняна з активністю протеїнів. Для молочного виробництва представляє великий інтерес одержання цілеспрямованої трансгенної експресії в епітеліальні клітини молочної залози з метою виходу білків з молоком. Одним із основних етапів одержання трансгенних тварин, продукуючих гетерогенний білок з молоком, - ідентифікація промотора, спрямовуючого експресію структурних генів в секреторний епітелій молочної залози.

В даний час виділені гени і промотори $\alpha S1$ – казеїну, β - казеїну, α – лактоальбуміну і сивороточного кислого протеїну (WAP). Молочна залоза – чудовий продуцент чужорідних білків, які можна одержувати із молока і використовувати в фармацевтичній промисловості. Із молока трансгенних тварин відокремлюють наступні рекомбінантні білки: людський білок С, антигемофільний фактор IX, $\alpha -1$ – антитрипсин, тканинний плазматичний активатор, лактоферин, сивороточний альбумін, інтерлейкін – 2, урокиназу і хімозин. В більшості проектів, за виключенням $\alpha -1$ – антитрипсину і хімозину, ці дослідження поки ще на стадії розробки і проводяться в основному на трансгенних мишах, тому оцінювати їх з точки зору комерційного інтересу ще зарано.

Стійкість до захворювань. Наразі результати селекції на стійкість до захворювань невеликі, але обнадійливі. Наприклад, створені популяції великої рогатої худоби з домішкою крові зебу, стійкі до деяких кровопаразитарних захворювань. Встановлено, що захисні механізми від інфекцій обумовлені перепорою вторгнення збудника або зміною рецепторів. Вторгненню і розмноженню збудників перешкоджають імунна система та експресія генів головного комплексу гістосумісності.

Прикладом гена резистентності у мишей є ген *Mx*, який у модифікованій формі виявлений у всіх видів ссавців і забезпечує у *Mx*⁺ мишей імунітет до вірусу грипу А. Ген *Mx*⁺ був виділений, клонований і використаний для отримання трансгенних свиней, які експресують ген *Mx* на рівні РНК. Однак дані про трансляцію *Mx*-протеїну, що забезпечує стійкість свиней до вірусу грипу А, поки не отримані. Ведуться дослідження з метою отримання трансгенних тварин, стійких до маститу, шляхом підвищення вмісту лактоферину в тканинах молочної залози. На культурі клітин із нирок трансгенних кроликів було показано, що клітинні лінії з трансгенною антизмістовною РНК мали на 90-98% вищу резистентність до аденовірусу H5 (Ad5) порівняно з контрольними лініями. Л.К. Ернст також продемонстрував стійкість трансгенних тварин з геном антизмістовної РНК до лейкозу великої рогатої худоби.

2) Трансгенні сільськогосподарські тварини. У середині 80-х років розпочалися експерименти щодо створення трансгенних сільськогосподарських тварин. До цього часу було підібрано оптимальні умови для візуалізації пронуклеусів зигот сільськогосподарських тварин, оскільки більшість зигот містить значну кількість пігментних і жирових гранул, що утруднює процес мікроін'єкції.

Трансгенні корови. Якщо передбачається використовувати молочну залозу як біореактор, то придатною твариною для трансгенозу є велика рогата худоба, яка щорічно дає до 10 000 л молока, в якому міститься до 35 г білка на 1 л. Якщо в молоці буде міститися така кількість рекомбінантного білка й

ефективність його очищення становитиме 50%, то від 20 трансгенних корів можна буде отримувати приблизно 100 кг такого білка за рік. За випадковим збігом, саме стільки білка С, що використовується для запобігання тромбоутворення, потрібно щорічно. З іншого боку, однієї трансгенної корови буде цілком достатньо для одержання необхідної щорічно кількості фактора ІХ (фактора Кристмаса) каскадного механізму згортання крові, що вводять хворим на гемофілію для підвищення її зсідання. Для створення трансгенних корів використовують модифіковану схему трансгенозу мишей методом мікроін'єкцій ДНК. Процедура включає такі основні етапи:

1. збирання ооцитів корів, забитих на скотобійні;
2. дозрівання ооцитів *in vitro*;
3. запліднення спермою бугаїв *in vitro*;
4. центрифугування яйцеклітин, що запліднені, для концентрування жовтка, який в нормальних яйцеклітинах запобігає баченню чоловічого пронуклеусу за допомогою мікроскопу;
5. мікроін'єкція ДНК в чоловічий пронуклеус;
6. розвиток ембріона *in vitro*;
7. нехірургічна імплантація одного ембріона самки-реципієнту під час тічки;
8. скринінг ДНК нащадків на наявність трансгена.

У тестових експериментах із пула в 2470 ооцитів було отримано два трансгенних теляти. Дослідження в цій галузі тривають, і є надія на вдосконалення методики трансгенозу. Один зі способів полягає в тому, що відбирають незначну кількість клітин з ембріона, що розвивається *in vitro*, і тестують їх на наявність трансгена; така втрата клітин ембріоном не перешкодить його нормальному розвитку. Цей тест дозволить імплантувати лише ембріони, що несуть трансген.

Трансгенні кролі. У дослідах по одержанню трансгенних кролів була використана конструкція чужорідної ДНК, що полягає із промотору металотіонеїну миші й структурної частини гормону росту людину. Частота інтеграції гена гормону росту людину склала 12,8%. Вона виявилася більш ніж

у два рази нижче, чим у мишей, де частота інтеграції чужорідного гена гормону росту людини була на рівні 27%.

На культурі клітин із нирок трансгенних кроликів було показано, що клітинні лінії, які містять трансгенну антизмістовну РНК, мали резистентність проти аденовірусу H5 (Ad₅) більш високу (на 90-98%) у порівнянні з контрольними лініями клітин.

Трансгенні вівці. В 1986 р. австралійськими вченими була отримана трансгенна вівця. У цьому експерименті використовували овечий ген гормону росту з металотіонеїновим промотором. Через 5 тижнів після народження трансгенному ягнятi в раціон увели невелику дозу цинку, який включив у роботу ген, що активує регуляторну послідовність рекомбінантної ДНК. Це додаткове приймання привело до більш інтенсивного синтезу гормону росту. Через 3 року після народження трансгенна вівця в 1, 5 рази перевершувала по масі однолітків тієї ж породи. Мета таких досвідів – створення інтенсивне зростаючих трансгенних овець із високою шерстною продуктивністю.

У трансгенних овець з генами ГР і РФ ГР, не дивлячись на підвищений рівень ГР, швидкість росту не збільшувалась. Разом з тим, за даними більшості дослідників, у трансгенних свиней поряд з підвищеним вмістом білку спостерігалось дворазове зменшення товщини шпику (7-8мм у трансгенних в порівнянні з 18-20мм у контрольних тварин); аналогічні показники відмічались у трансгенних овець (25-30% жиру у контрольних тварин проти 5-7% у трансгенних овець).

Трансгенні свині. Для візуалізації пронуклеусів у зиготах свиней застосовують центрифугування. Після такої обробки зигот проводять мікроін'єкцію генів у пронуклеуси зигот. Встановлено, що після мікроін'єкції рекомбінантної ДНК 10-20% ін'єктованих зигот продовжують розвиватися до стадії бластоцисти й 6-11% після пересадження реципієнтам дають трансгенних свиней. У середньому частота інтеграції чужорідного гена у свиней становить 10%.

За даними Л.К.Ернста (1996), у трансгенних свиней з геном рилізінг-фактору гормону росту (РФ ГР) кінцеві жива маса була на 15,7% вищою

порівняно з контрольними тваринами. У потомстві трансгенних свиней, які одержували модифікований кормовий раціон з підвищеним вмістом білку (18% сирого протеїну) і з додатковою кількістю лізину, відмічалися більш високі середньодобові прирости (на 16,5%).

США здійснено метод мікроін'єкції ДНК, що відповідає за експресію β – лактоглобуліну, який здатний продукуватися тільки в молочних залозах тварин. В Единбурзі в 1992р. були виведені трансгенні вівці з геном α –1-антитрипсину людини і β -глобуліновим промотором. Вміст цього білку у різних трансгенних овець склав від 1 до 35г/л, що відповідає половині всіх білків у молоці. При такому рівні продукції білку може бути одержано близько 10кг трансгенного білку від однієї тварини в рік, що досить для 50 пацієнтів при лікуванні емфіземи легенів.

Звичайно, вихід рекомбінантних білків в системах з використанням культури клітин складає близько 200 мг/л, а у трансгенних тварин він може підвищуватися до 1л. Слід відмітити, що створення клітинних культур і їх вирощування в промислових реакторах, а також виведення трансгенних тварин і їх обслуговування – дорогі і складні процедури. Однак трансгенні тварини легко розмножуються, утримання їх порівняно дешево, що робить цих тварин добрими продуцентами різних білків з низькою вартістю.

3) Трансгенні птахи. Для нормального ембріонального розвитку пташиної яйцеклітини необхідні третинні оболонки – білкова, підшкаралупна і шкаралупа. Дроблення курячої яйцеклітини починається в білковому відділі яйцепроводу, і у свіжознесеному яйці вже є 50-60 тисяч клітин. Перша трансгенна птиця була отримана за допомогою ретровірусних векторів, оскільки ретровіруси можуть включатися в геномну ДНК господаря і реплікуватися.

Дослідники намагалися внести чужорідні гени в зародкову лінію, інфікуючи ембріони ретровірусними векторами, що реплікуються або не реплікуються. Успішне вбудовування трансгена досягало від 0,8 до 5%. Введення рекомбінантного вектора лейкозу птахів у бластодерму курячих

ембріонів дало позитивний результат щодо перенесення генетичного матеріалу в зародкову лінію. Отримані повні трансгени продемонстрували перспективність використання ретровірусів для створення трансгенних птахів.

Існує два методи отримання безвірусного трансгенезу у птахів. Перший полягає в отриманні химер шляхом підсадки ДНК в ембріони чужих клітин. Клітини ранньої бластодерми або примордіальні клітини виділяють і ін'єктують у їх ядра чужорідну ДНК, потім імплантують в ембріони, де вони приживаються і діляться. Цим шляхом отримують соматичні химери і химери зародкової лінії (рис. 38).

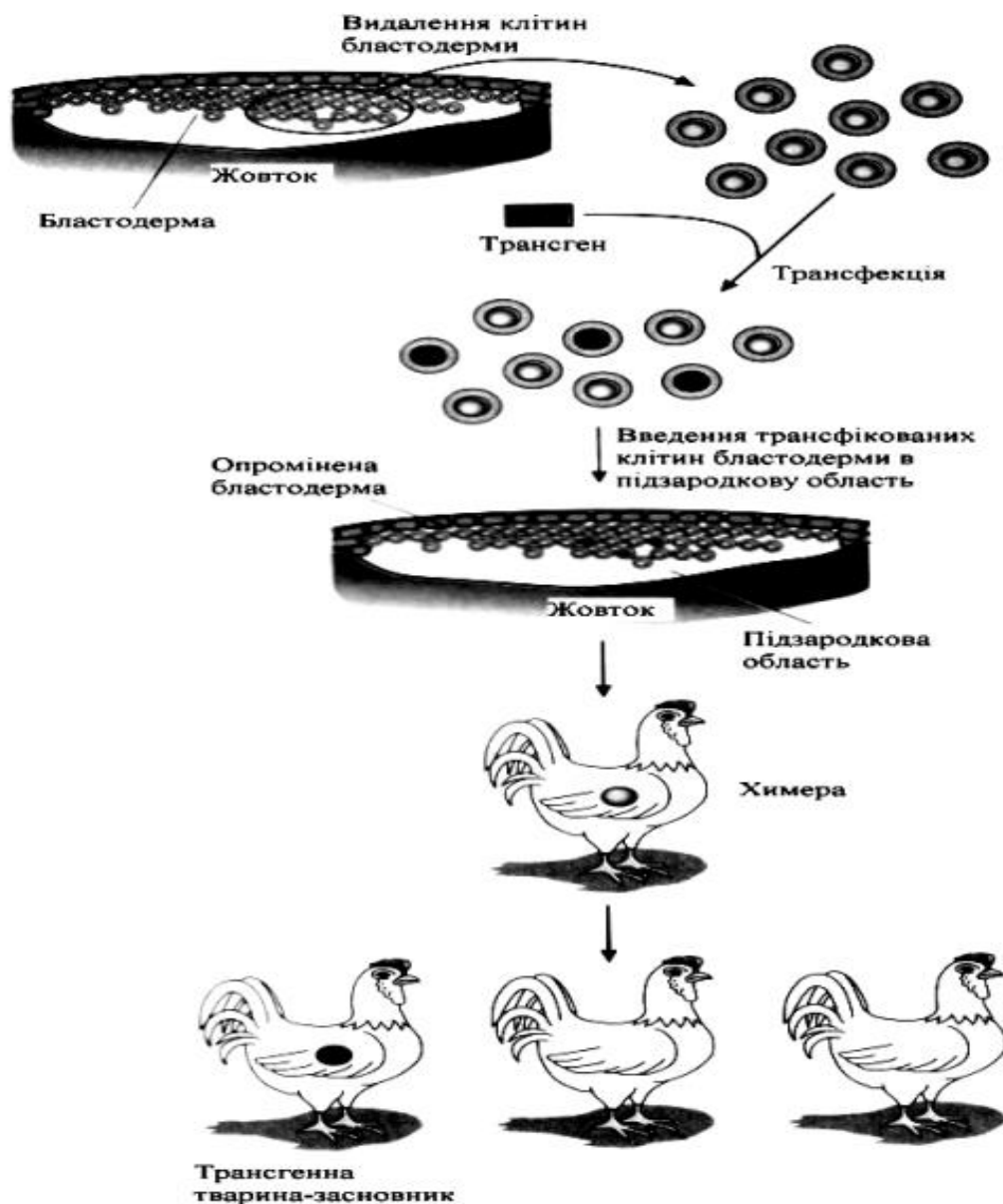


Рис. 38. Створення трансгенної птиці

Вирощуючи химерних особин, отримують потомство, частина якого є

трансгенним. Недоліком методу є низька ефективність клітинних пересадок. Згодом було показано, що клітини зародкової лінії можуть бути ефективно перенесені та інтегровані в ембріон.

Методичні прийоми застосування ембріональних клітин в якості переносників чужорідної ДНК з метою отримання трансгенної птиці продовжують розроблятися (рис. 39). Технологія отримання трансгенних ембріональних химер активно розвивається в таких країнах, як США і Японія, і на сьогоднішній день є основним претендентом на створення комерційно значущих трансгенних ліній птиці. Технологія ця вельми складна і дорога, включає **такі стадії**, як виділення і культивування первинних статевих клітин (a), їх подальшу трансфекцію чужорідною ДНК (b) і підсадку в ранні ембріони (c).

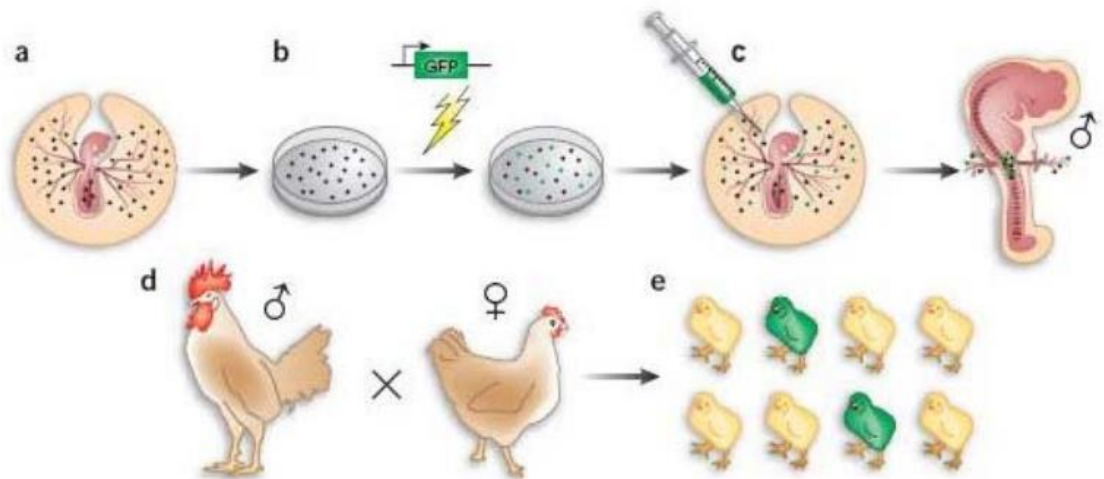


Рис. 39. Технологія отримання трансгенних ембріональних химер

Отримання трансгенної птиці методом **штучного осіменіння**, який широко використовується в птахівництві, виглядає перспективно. Птахівники говорять про майбутнє генно-інженерного конструювання нових промислових ліній із використанням генофонду рідкісних порід. Було проведено дослідження зі застосування спермій як вектора переносу чужорідної ДНК в яйцеклітини курей, показавши, що близько 80% міченої ДНК знаходиться в сперматозоїдах. Для підвищення ефективності переносу гена методом sperm-mediated gene transfer (SMGT) запропоновано використання рестрикційних

ферментів (REMI). Лінійна ДНК з рестриктазою вводиться в клітину шляхом електропорації, після чого рестриктаза розрізає геномну ДНК для полегшення інтеграції екзогенної ДНК. Використовуючи цей метод, отримано трансгенні курячі ембріони з генами β -галактозидази, з ефективністю трансформації яйцеклітин 23%.

Застосування технології мікроін'єкцій ДНК для птахів ускладнюється великим розміром ооцита, але деякі дослідники вивчали цей підхід. Було показано, що культивування заплідненої яйцеклітини в шкаралупі з білком іншої курки може подовжити ембріональний розвиток до стадії вилуплення, забезпечуючи доступ до ембріону від одноклітинної стадії до стадії курчат, що вилупилися. Виявлено, що ін'єкція чужорідної ДНК з подальшим культивуванням ембріона дозволяє отримати трансгенну птицю, хоча інтеграція введеної ДНК в хромосоми курчати є рідкісною подією. Розроблено метод прямої ін'єкції генної конструкції в цитоплазму свіжезаплідненої яйцеклітини, після чого її інкубують до вилуплення. Цим методом було отримано трансгенні кури, які успадковують трансген згідно з законом Менделя, але ефективність методу варіює від 3% до 60%.

Інший варіант мікроін'єкцій передбачає хірургічну операцію, що забезпечує доступ до яйцеклітини, ін'єкцію ДНК і повернення яйцеклітини в яйцепровід для формування інкубаційного яйця. Цей метод дозволяє отримати трансгенні кури з генами гормону росту людини, β -галактозидази, людського β -інтерферону, а також перепелів з геном гормону росту бика. Метод не вимагає використання складної апаратури і середовищ для культивування ембріонів *in vitro*, що робить його більш доступним.

Трансгенних птахів можна отримувати **без використання ретровірусів**, і створення трансгенних популяцій є здійсненним завданням. Для практичного використання трансгенні птахи повинні перевершувати існуючі промислові лінії за такими характеристиками, як швидкість росту, конверсія корму, яйценосність, стійкість до захворювань тощо. Використання трансгенезу для переносу корисного гена між лініями птиці може значно скоротити час і витрати, необхідні для селекції, забезпечуючи при цьому

збереження корисних генів.

4) Трансгенні риби. Основною метою трансгенних досліджень відносно риб останнім часом стало підвищення коефіцієнта росту в аквакультури за допомогою введення в геном генетичних структур гормону росту. Дослідження також було спрямовано на інші ознаки, такі як контроль захворювань та репродукції, і трансгенні дослідження повинні зосередитися на таких ознаках, які важко поліпшити, застосовуючи кількісні підходи. Трансгенна риба також може розглядатися як ефективна модель для вивчення регуляції генів та експресії генів і може в потенціалі стати біокомбінатом з виробництва цінних лікарських препаратів.

Антифризні протеїни риб мають кріопротекторні властивості, захищаючи організми від замерзання. Виробляються вони в печінці деяких видів бореальних риб та безхребетних, що мешкають у помірних областях Північної півкулі. Антифризні протеїни, багаті на аланін, запобігають замерзанню плазми крові або гемолімфи при низьких температурах води. Вони специфічно адсорбуються на поверхні кристалів льоду, запобігаючи їх росту, взаємодіють з мембранами клітин і пригнічують рекристалізацію. Завдяки унікальній четвертинній структурі вони у 500 разів ефективніше знижують температуру замерзання розчинів і біологічних об'єктів порівняно з іншими кріопротекторами.

У процесі еволюції костисті риби розвинули механізми зниження точки замерзання крові та інших біологічних рідин без зміни осмотичного тиску. Особливо це розвинено у риб, що мешкають у холодних морях, де температура води досягає $-1,8^{\circ}\text{C}$. Без антифризних протеїнів риби замерзають при вищих температурах, а риби з високими рівнями цих протеїнів здатні виживати в суворих умовах. Проте лососеві та інші комерційно важливі види риб не здатні синтезувати антифризні протеїни, що призводить до їх загибелі взимку біля східного узбережжя Канади, де щорічний прибуток від торгівлі аквакультурою сягає 100 млн. доларів США.

З метою вирішення цієї проблеми були проведені експерименти з

отримання трансгенних лососів з генами антифризних протеїнів риб, що підвищило їх стійкість до низьких температур і дозволило вирощувати їх у північних регіонах. Аналогічні результати були отримані і у форелівництві.

Ксенотрансплантація сперматогоній дозволяє розвивати донорні сперматогонії не тільки в організмі стерильних триплоїдних самців риб одного виду, але й у близькоспоріднених видах (рис. 40). Це важливо для збереження видового різноманіття риб і отримання сурогатних риб шляхом кріоконсервації зародкових клітин. Гамети риб, що мають великі розміри і тривалий період статевого дозрівання, можна отримувати швидше у сурогатних риб з невеликими розмірами і коротким періодом дозрівання. Це досягається шляхом ксенотрансплантації сперматогоній цільових видів риб відповідним реципієнтам.

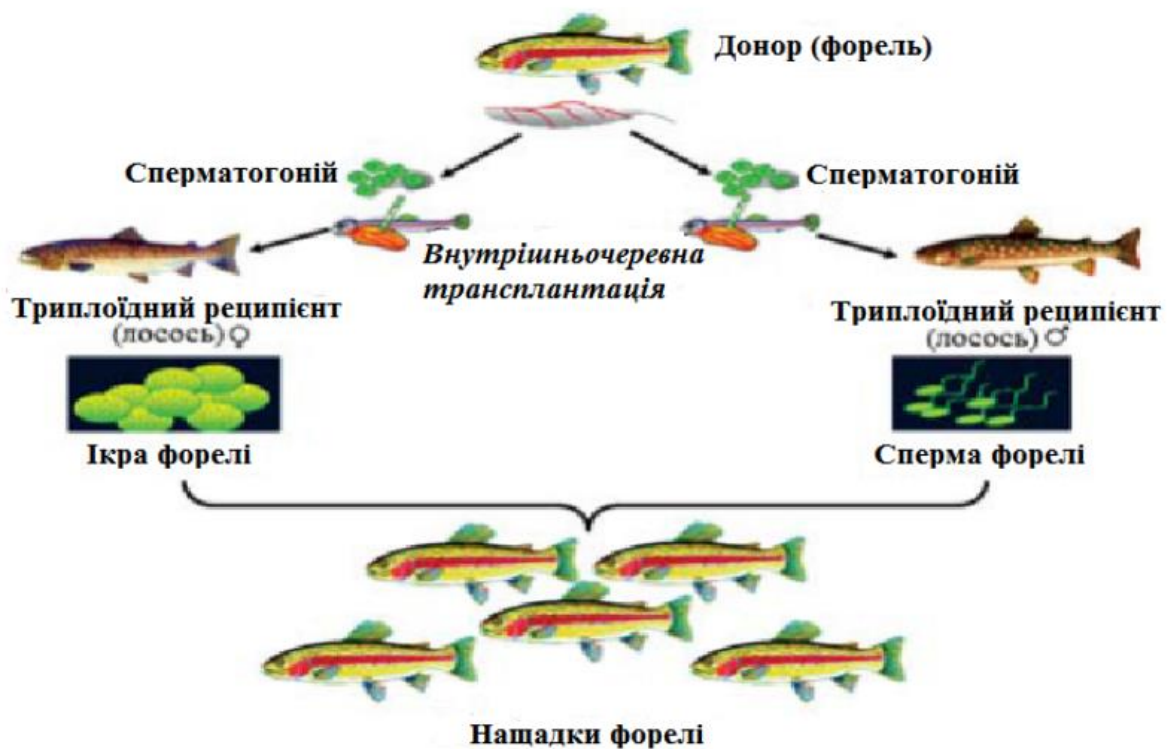


Рис. 40. Ксенотрансплантація сперматогоній

Така технологія економічно доцільна, оскільки скорочує площі для розведення риб в аквакультурі і економить значні ресурси і час. Крім того, вона має велике значення для збереження видового різноманіття популяцій риб з природного середовища шляхом застосування кріоконсервованих

зародкових клітин. Схема досвіду збереження зникаючих видів риб представлена на рис. 41.



Рис. 41. Спосіб збереження рідкісних і зникаючих видів риб

Інтерес до статі деяких видів риб, особливо осетрових і лососевих, обумовлений двома основними причинами: одержання одностатевих самок для виробництва ікри та вивчення диференціації статі нижчих хребетних. Отримання одностатевих самок також вирішує проблему раннього дозрівання самців лососевих риб, що знижує їх товарну цінність. Кількість господарств, які вирощують одностатевих самок, зростає. Створення таких самок проходить у два етапи: спочатку отримують одностатевих самців-реверсантів, потім, при схрещуванні їх зі звичайними самками, отримують одностатевих самок.

Реверсія статі досягається обробкою молодих риб низькими дозами андрогенів, таких як метилтестостерон, метилдегідростерон (МДНТ) або гідроксиандростенідіон (ВПА). Реверсанти можуть бути двох типів: фенотипічні самці з жіночим генотипом (XX), які при схрещуванні зі звичайними самками дають 100% самок, і нормальні генетичні самці з X- та Y-хромосомами. Розрізнити ці два типи самців можна лише за гістологічними

дослідженнями або реципрокним схрещуванням, що займає багато часу. Однак для прискореного виявлення самців-реверсantів були розроблені молекулярно-біологічні методи на основі ДНК-технологій.

Комбіноване згодовування двох форм тестостерону райдужній форелі призводило до зміни статі, що підтверджували результати методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і зміни у гонадах. ПЛР ідентифікувала генотипи самців райдужної форелі, ампліфікуючи фрагмент ДНК довжиною близько 800 пар нуклеотидів. Застосування ПЛР стало можливим після виявлення канадськими дослідниками повторюваних послідовностей ДНК на Y-хромосомі. ПЛР-діагностика самців широко використовується в рибництві, дозволяючи виділяти ДНК з плавників або крові, зберігаючи рибу живою.

Наразі розроблено велику кількість молекулярних маркерів для різних видів лососевих риб.

Лекція 13. Контроль досліджень у галузі молекулярної біології

- 1. Контроль експериментів з рекомбінантними ДНК**
- 2. Контроль виробництва харчових продуктів та харчових добавок**
- 3. Контрольоване вивільнення генетично-модифікованих організмів у навколишнє середовище**
- 4. Політика у галузі генної терапії соматичних клітин**

1) Контроль експериментів з рекомбінантними ДНК.

Правове регулювання генетичних технологій у міжнародному праві, зокрема, у **Конвенції Ов'єдо**, визначається великою увагою до захисту прав людини та гідності. Конвенція забороняє використання медицини проти людини та дискримінацію на підставі генетичної спадковості. Вона також регулює генетичне тестування лише для медичних цілей.

Незважаючи на існуючі нормативні акти, правове регулювання потребує подальшого удосконалення для мінімізації ризику шкоди для людей, суспільства та навколишнього середовища, оскільки розвиток генетичних технологій відбувається дуже швидко. Об'єктами суспільних відносин у цій сфері можуть бути конституційні права на життя, здоров'я та безпеку, а також недоторканність приватного життя та особиста таємниця.

Небезпечному впливу при цьому можуть наражатися:

1. генетичний біоматеріал людини, об'єктів тваринного та рослинного світу, який перебуває у прямому причинному зв'язку з можливою небезпекою для життя та здоров'я як самих носіїв, а також інших людей, тварин, рослин. Такий матеріал може завдати їм шкоди, зокрема і з проекцією наступні покоління;
2. геномна інформація, що містить у різних інформаційних джерелах, базах даних. Незаконне поширення та використання подібних відомостей безпосередньо зачіпає конституційні права людини в галузі

недоторканності приватного життя, захисту персональних даних, особисту та сімейну таємницю та ін.

Розберемо вказані напрями докладніше.

1. Загрози, що виникають під час генетичних досліджень.

Як було зазначено раніше, одним із напрямків генетичних технологій, у сфері яких можуть бути порушені конституційні права і свободи людини та громадянина, є небезпечний вплив на геном біологічного матеріалу та незаконне використання генетично модифікованого матеріалу. Як такі можуть виступати клітини людини, тварин, рослин, кров, органи та тканини, ембріони, а також нові продукти генної інженерії – штучний біоматеріал та клітинні продукти, створені на основі людського біоматеріалу.

Під генно-інженерною діяльністю розуміється діяльність, що здійснюється з використанням методів генної інженерії з метою створення генно-інженерно-модифікованих організмів, а також до робіт у галузі генетичних маніпуляцій з метою генної діагностики та генної терапії, проведення випробувань генно-модифікованих організмів, утилізації відходів такої діяльності, правочини та інша діяльність, пов'язана з генно-інженерними технологіями. Зі змісту закону, що розглядається, можна також зрозуміти, що допускається виключно неуспадкована модифікація геному.

Потенційні ризики генетичних досліджень включають:

1. Невивчені наслідки редагування геному людини, що може призвести до небажаних змін у геномі та викликати етичні проблеми, оскільки це втручання у здорові ембріони.

2. Неконтрольований випуск генно-модифікованої продукції (ГМО) у сільському господарстві та тваринництві, що може мати непередбачені наслідки для екосистеми та здоров'я людей.

3. Можливе використання генної інженерії для створення біологічної зброї, що загрожує військовій безпеці і може призвести до нових форм біотероризму.

4. Ризики, пов'язані з використанням генетичного матеріалу для клонування та маніпулювання ембріональним матеріалом, що вимагають уваги

законодавця та дотримання норм моралі та етики.

Правовий захист геномної інформації.

Геномна інформація – це персональні дані, що включають кодовану інформацію про певні фрагменти дезоксирибонуклеїнової кислоти фізичної особи або непізнаного трупа, що не характеризують їх фізіологічні особливості. Дане визначення не повною мірою відображає сутність такої інформації, оскільки розглядає лише дані про підзвітні особи та непізнані трупи з метою їх реєстрації, розшуку, ототожнення для потреб правоохоронної діяльності.

Ще одна особливість геномної інформації полягає в тому, що на відміну від інших біометричних персональних даних, вона містить відомості не тільки про особу носія ДНК, але і про його кровних родичів і навіть про окремі національні групи. Крім того, така інформація може бути отримана не тільки завдяки криміналістичному аналізу ДНК, а й сукупністю інших засобів та методів генетичного тестування, що включають генетичний скринінг, генетичний моніторинг. Дані напрямки дозволяють встановлювати наявність спадкових захворювань, шкідливий вплив довкілля на геном певних групи населення.

2) Контроль виробництва харчових продуктів та харчових добавок. **Безпечність харчових продуктів** – відсутність токсичної, канцерогенної, мутагенної чи іншої несприятливої дії продуктів на організм людини у разі споживання їх у загальноприйнятих кількостях. Безпечність гарантується встановленням і дотриманням регламентованого рівня вмісту (відсутність або обмеження рівнів гранично допустимих концентрацій) забруднювачів хімічної та біологічної природи, а також природних токсичних речовин, що характерні для даного продукту та становлять небезпеку для здоров'я.

Безпеку харчових продуктів характеризують 2 показниками: санітарна доброякісність і епідемічна безпека. **Санітарна доброякісність** – відсутність у продукті ознак мікробної і фізико-хімічної зміни, залишків сторонніх й

отруйних речовин органічної і неорганічної природи. **Епідемічна безпека** – відсутність або обмеження рівнів забруднення харчових продуктів патогенними та потенційно патогенними мікроорганізмами.

Мікробіологічні критерії безпечності харчових продуктів включають чотири групи показників:

I група - санітарно-показові - це мікроорганізми, що використовують як індикатори дотримання санітарних і технологічних режимів обробки молока та молочних продуктів (бактерії групи кишкових паличок, мезофільні аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми);

II група - потенційно патогенні мікроорганізми;

III група - патогенні мікроорганізми - збудники харчових отруєнь та інфекційних захворювань;

IV група - показники мікробіологічної стабільності продукту (дріжджі, мікроскопічні гриби).

Добре організовані технохімічний та мікробіологічний контролю на всіх стадіях технологічного процесу від приймання сировини до випуску готової продукції є однією з важливіших передумов виробництва високоякісної продукції, правильного ведення технологічного процесу, оптимального використання сировини та матеріалів.

Інформацію про правильність ведення технологічного процесу зобов'язана надавати служба технохімічного контролю на підставі аналізів і показників контрольно-вимірювальних приладів. Технохімічний та мікробіологічний контроль здійснюють відділи технічного контролю (ВТК), які є самостійними структурними підрозділами підприємства. Керівник ВТК підпорядковується безпосередньо директору підприємства. Головним обов'язком ВТК є здійснення контролю продукції, що випускається підприємством, щодо суворості відповідності її вимогам стандартів, технічних умов, державних правил, санітарних норм.

За відсутності в структурі підприємства самостійного ВТК його права, обов'язки і відповідальність покладаються керівником підприємства на лабораторії або осіб, які здійснюють ТХК і МБК (лаборантів, майстрів). Робота

ВТК (лабораторії) здійснюється у відповідності до положення про відділи технічного контролю згідно з діючими інструкціями і схемами технохімічного і мікробіологічного контролю, санітарними правилами тощо. Співробітники лабораторії у своїй роботі керуються організаційно-методичною та нормативною документацією на сировину, готову продукцію та методи їх контролю.

У методології нормування ксенобіотиків у харчових продуктах та інших середовищах існують принципові відмінності. Вони зумовлені тим, що токсикологічно допустима доза має бути включена до загальної маси усіх щоденно вживаних людиною продуктів, у яких реально присутній нормований ксенобіотик, а його допустимий вміст потрібно визначити окремо у кожному з цих продуктів, враховуючи вплив сторонньої речовини на якість даного продукту за гігієнічно значущими показниками.

Тому науковому обґрунтуванню підлягають два види нормативів різного призначення: 1) допустима добова доза (ДДД), яка визначає допустиме добове надходження (ДДН) ксенобіотика у складі раціону, і 2) серії гранично допустимих концентрацій (ГДК) цієї речовини в окремих продуктах. Нормативи цього виду у гігієні харчування єдиної назви не мають: для пестицидів - це максимально допустимі рівні; для важких металів – ГДК; для нітратів – допустимий вміст; для харчових добавок – межа).

ДДД – максимальна доза (у міліграмах на 1 кг маси тіла), щодобове надходження якої в організм людини протягом усього життя безпечне для її здоров'я і здоров'я потомства. Це базовий норматив гігієни харчування, який входить у санітарне законодавство.

Добуток ДДД на масу тіла стандартної людини (60 кг) являє собою ДДН (у міліграмах на добу) ксенобіотика у складі раціону. Як норматив ДДН використовується за одним із трьох принципів: 1) комплексного нормування у їжі, воді і атмосферному повітрі (пестициди); 2) єдиного нормування ксенобіотиків, які надходять через харчовий канал (нітрати); 3) незалежного нормування у кожному середовищі (важкі метали).

Нормативи ГДК обмежують вміст ксенобіотика в одиниці маси або

об'єму окремого продукту (у міліграмах на 1 кг або 1 дм³) таким чином, щоб сумарний вміст речовини у добовому продуктовому наборі не перевищував ДДН і у цьому разі не змінювались харчові і біологічні властивості даного продукту (якщо їх зміна не робиться навмисно, як у разі використання харчових добавок - ароматизаторів).

У зв'язку з цим для кожного виду продуктів ураховують 3 показники шкідливості – токсикологічний, органолептичний і загальногігієнічний, за якими визначають порогові концентрації 1) за токсикологічними критеріями, узгоджену з ДДД; 2) яка запобігає зменшенню біологічної цінності харчового продукту; 3) яка запобігає погіршанню органолептичних властивостей. Менша з трьох концентрацій визначить лімітуючий показник шкідливості і верхню межу допустимого вмісту нормованого ксенобіотика у даному харчовому продукті.

Харчові добавки – природні або синтезовані речовини, які спеціально вводяться до продуктів харчування з метою надання їм потрібних властивостей (органолептичних, технологічних) і не вживаються самостійно у вигляді харчових продуктів або звичайних компонентів їжі. Кожна добавка, запланована до використання у виробництві харчових продуктів, повинна проходити ретельні дослідження щодо виявлення шкідливого впливу на організм людини.

Послідовність досліджень щодо виявлення шкідливого впливу на організм людини: Спочатку проводиться попередня токсиколого-гігієнічна оцінка, коли на підставі даних розробника визначається товарна хімічна назва речовини, її призначення, технологія отримання, хімічна структура і склад, вміст домішок, її фізико-хімічні властивості; встановлюється ступінь небезпечності даної добавки, орієнтовно розраховується концентрація, за якої спостерігається виражений токсичний ефект, а також кумулятивні властивості досліджуваної речовини. На другому, основному етапі, в результаті проведення так званого хронічного експерименту, що триває 9...18 місяців, визначають порогову та максимально недіючу загальнотоксичну дозу харчової добавки. На третьому етапі узагальнюють отримані результати,

визначають та обґрунтовують добову допустиму дозу, допустиме добове надходження та її гранично-допустиму концентрацію в харчових продуктах. Після цього добавка допускається до використання у виробництві продуктів харчування. На четвертому етапі триває спостереження з метою підтвердження її нетоксичності та за потреби вносяться поправки у відповідні нормативи.

В Україні застосування харчових добавок регламентовано відповідними санітарними правилами і нормами по застосуванню харчових добавок Санітарні правила і норми по застосуванню харчових добавок, № 222 від 23.07.96 р. В даному нормативному документі поданий перелік добавок, дозволених до використання із зазначенням галузі застосування, гранично допустимих концентрацій в харчових продуктах.

Не дозволяється використовувати харчові добавки у випадках, коли технологічного ефекту можна досягти іншими засобами у разі удосконалення виробничого процесу. Не дозволяється використовувати харчові добавки для приховування вад недоброякісної сировини, з метою фальсифікації харчових продуктів, у разі значних втрат їх біологічної цінності; вони не повинні сприяти контамінації, впливати на процес травлення та всмоктування. Обов'язково необхідно інформувати споживача про наявність харчових добавок у продуктах (на етикетках, у рецептурах).

3) Контрольоване вивільнення генетично-модифікованих організмів у навколишнє середовище. Згідно з Законом України від 31.05.2007 № 1103-V, вивільнення ГМО у навколишнє середовище – діяння (дія або бездіяння), в результаті якого відбулося внесення ГМО у навколишнє середовище. Необхідною умовою вивільнення ГМО у навколишнє середовище виступає їхня державна реєстрація. **У державних реєстрах ГМО в Україні реєструються:**

- а) сорти сільськогосподарських рослин та породи тварин, створені на основі ГМО;
- б) ГМО джерела харчових продуктів;

в) ГМО - джерела кормів.

Слід зазначити, що такий перелік об'єктів, що підлягають державній реєстрації, сформовано внаслідок внесення у 2014 р. змін до Закону України «Про державну систему біобезпеки під час створення, випробування, транспортування та використання генетично модифікованих організмів», метою яких було запровадження європейських принципів регулювання ГМО, зокрема, щодо реєстрації саме джерел ГМО, а чи не продуктів, вироблених їх. **До 2014 р. обов'язкової реєстрації** також підлягали засоби захисту рослин, отримані з використанням ГМО, кормові добавки та ветеринарні препарати, що містять ГМО або отримані з їх використанням, а також харчові продукти, косметичні засоби та лікарські препарати, що містять ГМО або отримані з їх використанням.

На виконання вищевказаного положення про державну реєстрацію постановою Кабінету Міністрів України від 23 липня 2009 р. № 808 було затверджено Порядок державної реєстрації генетично модифікованих організмів сортів сільськогосподарських рослин у відкритій системі, а постановою від 12 жовтня 2010 р. № 919 – Порядок державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, кормів, кормових добавок та ветеринарних препаратів, які містять такі організми або отримані з їх використанням. У липні 2013 р. в Україні вперше було зареєстровано ГМ сировину для виробництва кормів – ГМ соєвий шрот, а в жовтні 2015 р. реєстрацію проведено і щодо вірусу, який є частиною вакцини від сказу для м'ясоїдних тварин.

Слід зазначити, що українське законодавство у сфері використання ГМО динамічно розвивається та зазнає змін, спрямованих на адаптацію його до норм ЄС, а також на оптимізацію системи уповноважених державних органів.

Важливу роль у забезпеченні безпечного поводження з ГМО відіграє належний державний контроль. Але, на жаль, порядок та періодичність його проведення, а також перелік питань, що виносяться для його здійснення, досі не затверджено. Розроблено лише Критерії оцінки ризику потенційного

впливу ГМО на навколишнє середовище (наказ Мінприроди від 7 лютого 2011 р. № 36), які мають бути підставою для визначення періодичності проведення планових заходів державного нагляду.

4) Політика у галузі генної терапії соматичних клітин.
Генотерапія – сукупність генноінженерних (біотехнологічних) та медичних методів, спрямованих на внесення змін до генетичного апарату соматичних клітин людини з метою лікування захворювань. Це нова область, що бурхливо розвивається, орієнтована на виправлення дефектів, викликаних мутаціями (змінами) у структурі ДНК, або надання клітинам нових функцій.

Концепція генотерапії, з'явилася відразу після відкриття явища трансформації у бактерій та вивчення механізмів трансформації клітин тварин пухлиноутворюючими вірусами. Такі віруси можуть здійснювати стабільне впровадження генетичного матеріалу в геном клітини господаря, тому було запропоновано використовувати їх як вектори для доставки бажаної генетичної інформації в геном клітин. Передбачалося, що такі вектори можуть у разі потреби виправляти дефекти геному.

Реальністю генна корекція соматичних клітин стала після 1980-х років, коли були розроблені методи отримання ізольованих генів, створені еукаріотичні вектори, що експресують, стали звичайними переноси генів у мишей та інших тварин.

Історично генна терапія націлювалася на лікування спадкових генетичних захворювань, проте поле її застосування принаймні теоретично розширилося. В даний час генну терапію розглядають як потенційно універсальний підхід до лікування широкого спектра захворювань, починаючи від спадкових, генетичних та закінчуючи інфекційними.

До геннотерапевтичних підходів тепер відносять також і такі підходи, коли клітини модифікують, щоб посилити імунну відповідь організму на небажані явища, спричинені інфекцією або виникненням пухлин. Модифікація також здійснюється введенням нової генетичної інформації або клітини, проти яких хочуть збільшити імунну відповідь, або клітини імунної

системи, за допомогою яких хочуть посилити цей ефект. Хоча суворо кажучи, ця стратегія не зовсім вписується в класичне поняття генної терапії.

Головною проблемою є подолання бар'єрів для проникнення терапевтичного агента в пухлину з мінімальною токсичністю здорових клітин. Моделі дають дуже обіцяючі результати, проте навіть із найкращими тваринними моделями залишається проблема переходу до людини, яка відрізняється і біохімічно та фізіологічно від моделі.

Список використаних джерел

1. Березін В. Є. Методи молекулярної біології та біотехнології. Харків : Ранок, 2021. 356 с.
2. Гаврилюк В. П., Козак О. І. Генетична інженерія та біотехнологія : навч. посіб. Львів : Новий Світ, 2022. 412 с.
3. Гулій М. Ф., Харкевич Н. А. Молекулярна біотехнологія: сучасні методи та застосування. Київ : Видавництво КНУ ім. Т. Шевченка, 2023. 389 с.
4. Півень О. О., Скоробогатова З. М. Сучасні інструменти редагування геному з основами молекулярної генетики : навчальний посібник. Київ : Біокомполіт, 2021. 178 с.
5. Молекулярна біотехнологія. Лабораторний практикум : навчальний посібник / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: Л. В. Маринченко, І. І. Левтун, Д. С. Колтишева, Н. С. Титенко. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2024. 71 с. URI: <https://ela.kpi.ua/handle/123456789/68195>
6. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль, М. І. Біотехнологія : навчальний посібник / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/1025>.
7. Юлевич О. І., Луговий С. І., Каратєєва О. І., Баркарь Є. В. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с. URL: <http://172.16.0.31:8080/jspui/handle/123456789/11705>
8. Alberts B., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 7th ed. New York : Garland Science, 2022. 1464 p.
9. Brown T. A. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 8th ed. Oxford : Wiley-Blackwell, 2023. 400 p.
10. Glick B. R., Pasternak J. J. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 6th ed. Cham : Springer, 2021. 850 p.
11. Lodish H., et al. *Molecular Cell Biology*. 9th ed. New York : W. H. Freeman and Company, 2021. 1280 p.

12. Madigan M. T., Bender K. S., Buckley D. H., et al. *Brock Biology of Microorganisms*. 17th ed. Boston : Pearson, 2023. 1120 p.
13. Primrose S. B., Twyman R. M. *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 9th ed. Oxford : Wiley-Blackwell, 2024. 760 p.
14. Saha K., Weiss R. The synthetic genome frontier: reprogramming life at the molecular scale // *Science*. 2025. Vol. 390, No. 6675. P. 56–64.
15. Sambrook J., Russell D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2020. 2100 p.
16. Zhang Y., et al. CRISPR-Cas systems: recent advances and future perspectives in molecular biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2024. Vol. 42, No. 3. P. 345–360.

Навчальне видання

Молекулярна біотехнологія

курс лекцій

Укладач: **Каратєєва** Олена Іванівна

Технічний редактор: О. І. Каратєєва

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 8,25

Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

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