

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

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

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:

**Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт
для здобувачів вищої освіти СВО «Магістр»
освітньої спеціальності 162 – «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання**

Миколаїв
2020

УДК 579.8:60

М 75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 22.10.2020 р., протокол № 3.

Укладач:

О. І. Каратеева – канд. с -г. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти :

В. О. Мельник – д-р. с. - г. наук, доцент, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

О.І. Юлевич – канд. тех. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
Лабораторна робота № 1	6
Лабораторна робота № 2	10
Лабораторна робота № 3	17
Лабораторна робота № 4	22
Лабораторна робота № 5	26
Лабораторна робота № 6	32
Лабораторна робота № 7	39
Лабораторна робота № 8	49
Лабораторна робота № 9	56
Лабораторна робота № 10	62
Лабораторна робота № 11	67
Лабораторна робота № 12	72
Лабораторна робота № 13	77
Лабораторна робота № 14	83
Лабораторна робота № 15	89
Лабораторна робота № 16	93
Лабораторна робота № 17	96
Лабораторна робота № 18	99
Лабораторна робота № 19	102
Лабораторна робота № 20	106
Лабораторна робота № 21	111
Лабораторна робота № 22	114
Лабораторна робота № 23	118
Лабораторна робота № 24	121
Література	125

ВСТУП

Навчальна дисципліна «**Молекулярна біотехнологія**» вивчає можливості використання методів генної інженерії, біохімії, молекулярної біології та інших наук для отримання тих чи інших біологічних молекул чи трансгенних організмів із метою використання в різних галузях охорони здоров'я та екології: одержання та використання клітин мікроорганізмів, тварин і рослин, а також продуктів їх життєдіяльності: ферментів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків тощо. Для спеціальності Біотехнології та біоінженерія цей курс є базовим і створює основу для подальшої спеціалізації дослідників, які планують застосовувати новітні молекулярно-біотехнологічні методи досліджень як у галузі науки, так і в прикладних дослідженнях та промисловості.

Метою дисципліни є формування у студентів базових знань про сучасний стан біотехнології як нового напрямку наукової й практичної діяльності людини на основі засвоєння методів клонування ДНК, білків та отримання трансгенних одно- й багатоклітинних організмів для вирішення різних завдань у галузях охорони здоров'я та екології

Молекулярна біотехнологія – визначається як розділ науки і технології, в якій використовується 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 біотехнологія визначається як застосування наукових і інженерних принципів для переробки матеріалів живими організмами з метою створення товарів і послуг.

Метою курсу «Молекулярна біотехнологія» є формування у здобувачів вищої освіти уявлення про стратегію створення рекомбінантних ДНК для цілеспрямованого конструювання мікро- та макроорганізмів-продуцентів біологічно-активних речовин та ознайомлення їх з комплексом сучасних методів молекулярної біотехнології. У процесі вивчення курсу студенти отримують знання про головні поняття та процеси молекулярної біотехнології. Буде розглянуто молекулярно-біологічні та генно-інженерні аспекти застосування різних організмів у біотехнологічних дослідженнях та виробництві.

Предмет досліджень – хіміко-біологічні процеси і біологічні об'єкти (мікроорганізми, культури клітин і тканин рослинного і тваринного походження, ферментні препарати та інші біологічно активні речовини) у промисловому виробництві.

Об'єкт досліджень – застосування біологічних об'єктів та хіміко-біологічних процесів з метою отримання різноманітної продукції для вирішення народногосподарських проблем.

Лабораторна робота №1

Тема: Основні терміни і поняття молекулярної біотехнології та її історія розвитку

МЕТА ЗАНЯТТЯ. Вивчити основні поняття і терміни, історія розвитку молекулярної біотехнології та її зв'язок з іншими науками.

1. Основні терміни та поняття. Молекулярна біотехнологія – це захоплююча область наукових досліджень в основі якої лежить 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.

Генна інженерія – це біотехнологічний прийом, спрямований на конструювання рекомбінантних молекул ДНК на основі ДНК, взятої з різних джерел, сукупність прийомів, методів і технологій одержання рекомбінантних РНК і ДНК, виділення генів з організму (клітин), здійснення маніпуляцій з генами і введення їх в інші організми.

Рекомбінантна ДНК (recombinant DNA, rDNA) – молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії (молекулярне клонування). Молекула поєднує в собі генетичний матеріал, виділений з різних біологічних джерел, створюючи таким чином певну ДНК послідовність. Отримана таким чином **векторна ДНК** може реплікуватись у клітинах-господарах.

Вектор – **організм**, клітина, **вірус**, **плазмід** або інший біологічний об'єкт, що несе потенційно активний елемент, який не проявляє активності під час перебуванні у фазі вектора, але може розмножуватися разом із вектором. Залежно від галузі, термін може мати більш специфічне значення:

У **молекулярній біології** і **генній інженерії** **вектор** – транспортний засіб для передачі генетичного матеріалу у клітину. **Вірусний вектор** – вірус, який був змінений для **трансдукції** специфічного генетичного матеріалу у клітину, наприклад для **генетичної терапії**. **Плазмідний вектор** також може використовуватися для доставлення штучного фрагменту **рекомбінантної ДНК** у складі плазмиди до клітини, для чого застосовують різні методи **трансфекції**.

Вектори для рекомбінантної ДНК – **плазмиди**, віруси, **штучні хромосоми** на основі дріжджових чи тваринних хромосомних елементів. Існує велика кількість різних систем, що дозволяють здійснювати експресію привнесених генів. Окрім загальної назви «рекомбінантна ДНК», таку молекулу іноді називають **химерною ДНК**. В технології рекомбінантної ДНК загалом використовують **паліндромну послідовність**, котра після відповідних маніпуляцій має тупі та липкі кінці. За допомогою технології

рекомбінантної ДНК можливо привнести в геном одного організму певний ген, виділений з геному іншого організму, створюючи таким чином генетично модифікований організм. Технологія рекомбінантної ДНК і генетична рекомбінація є різними поняттями.

Ендонуклеази рестрикції – група ферментів класу ендонуклеаз, що розрізають подвійну спіраль ДНК. Фермент робить два надрізи, один на кожному фосфатному остові подвійної спіралі без пошкодження азотистих основ. Термін «рестрикційні» походить від факту, що вже перші дослідження цих ферментів в бактерії *E. Coli* показали, що вони обмежують інфекцію певними бактеріофагами. Таким чином, роль рестриктаз полягає в опорі нападу вірусів і видаленні вірусних нуклеїнових кислот з клітини. Вони є частиною так званої рестрикційно-модифікаційної системи.

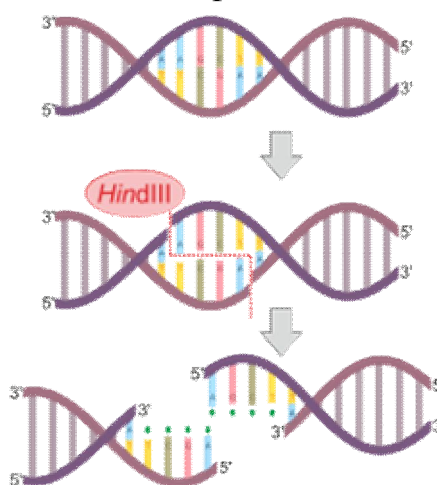


Рис. 1.1. Сайт рестрикції HindIII рестриктази, з липкими кінцями, що утворюються після розщеплення. Сайт рестрикції є паліндромною ділянкою ДНК, тобто такою, що читається однаково на обох ланцюгах ДНК в напрямку 5'-3'.

Лігази (від лат. *Ligāre* – «зшивати», «зв'язувати») – клас ферментів (КФ 6), здатних каталізувати з'єднання двох молекул з утворенням нового хімічного зв'язку (лігування). При цьому зазвичай відбувається відщеплення (гідроліз) невеликої хімічної групи від однієї з молекул.

Клонування (англ. *cloning*) – процес створення ідентичних копій (тиражування) організмів або інших об'єктів у біології, які називають клонами.

Молекулярне клонування – група методів у молекулярній біології та біотехнології, пов'язаних зі створенням рекомбінантних молекул ДНК і отриманням багатьох копій цієї молекули in vivo. Термін «клонування» у цьому випадку означає, що з однієї клітини, що містить рекомбінантну молекулу ДНК, шляхом мітотичного поділу утворюється велика кількість ідентичних за генетичною інформацією клітин – клонів.

Генетично модифікований організм (ГМО) – [організм](#), [генотип](#) якого було змінено за допомогою методів [генної інженерії](#). Генетична модифікація відрізняється від природного та штучного [мутагенезу](#) саме направленою зміною генотипу. При цьому генетичний матеріал переносять з одного організму в інший, використовуючи [технологію рекомбінантних ДНК](#). Якщо при цьому ДНК, яку переносять, походить з іншого виду, отримані організми називають трансгенними.

2. Історія розвитку.

Таблиця 1

Історія розвитку молекулярної біотехнології

Дата	Подія
1917	Карл Єрекі ввів термін «біотехнологія»
1943	Виготовлено пеніцилін в промисловому масштабі
1944	Євері, МакЛеод и МакКарті показали, що генетичний матеріал являє собою ДНК
1953	Уотсон и Крік визначили структуру молекули ДНК
1961-1966	Розкодований генетичний код
1970	Виділена перша рестрекційна ендонуклеаза
1973	Бойєрі Коен дали початок технології рекомбінантних ДНК
1975	Колер и Мільштейн описали отримання моноклональних антитіл
1976	Розроблені методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК
1978	Фірма Genentech випустила людський інсулін, отриманий за допомогою <i>E. coli</i>
1981	Дозволений до використання в США перший діагностичний набір моноклональних антитіл
1982	Дозволена до використання в Європі перша вакцина для тварин, яка отримана за технологією рекомбінантних ДНК
1983	Для трансформації рослин використані гібридні Ti-плазмідни
1988	Створений метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)
1990	Офіційно розпочаті роботи над проектом «Геном людини»
1994-1995	Опубліковані детальні генетичні і фізичні карти хромосом людини
1997	Клоновано ссавця з диференційованої соматичної клітини
2002	Розшифровано геном людини

Молекулярна біотехнологія використовує досягнення багатьох галузей науки і дозволяє створювати широкий асортимент комерційних продуктів і методів рис. 1.2.



Рис. 1.2. Зв'язок молекулярної біотехнології з іншими науками

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте рисунок 1.1 та рисунок 1.2.
3. Замалуйте таблицю 1.

Контрольні питання

1. Що таке молекулярна біотехнологія, та історія її розвитку.
2. Зв'язок молекулярної біотехнології з іншими науками та її досягнення.

Лабораторна робота № 2

Тема: Мікробіологічні системи для молекулярної біотехнології

МЕТА ЗАНЯТТЯ. Вивчити основні мікробіологічні системи, що використовуються в молекулярній біотехнології, їх будовою, функціями, призначенням.

1. Загальні положення. Об'єктами молекулярної біотехнології є найрізноманітніші біологічні системи: мікроорганізми, клітинні лінії комах, рослин і ссавців, віруси комах, рослин і ссавців, багатоклітинні організми (рослини, миші, домашні тварини і т. д.) – вибір системи залежить від цілей експерименту. Характер біологічної системи виключно важливий для біотехнологічного процесу. У багатьох випадках саме генетично модифікована самовідновна біологічна одиниця – мікроорганізм, вірус, рослина або тварина – є кінцевим комерційним продуктом. Серед безлічі біологічних об'єктів, що використовуються в молекулярній біотехнології, основними «робочими елементами» є бактерії *Escherichia coli*, одноклітинні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і різні клітинні лінії тваринного походження. Всі вони грають важливу роль в отриманні білків, кодованих клонованими генами.

Прокаріоти і еукаріоти

У прокаріотичній клітині (рис. 2.1), наприклад бактеріальної, хромосомна ДНК знаходиться безпосередньо в цитоплазмі, клітина оточена ригідною клітинною стінкою, до складу якої часто входить пептидоглікан, але не хітин або целюлоза; в клітині немає субклітинних цитоплазматичних органел.

У еукаріотичній клітині є ядро (рис. 2.2), відокремлене від цитоплазми ядерною мембраною, хромосомна ДНК знаходиться в ядрі; клітинна стінка, якщо вона є, може містити хітин або целюлозу, але не пептидоглікан; в цитоплазмі містяться різні субклітинні органели (мітохондрії, апарат Гольджі, хлоропласт в клітинах рослин).

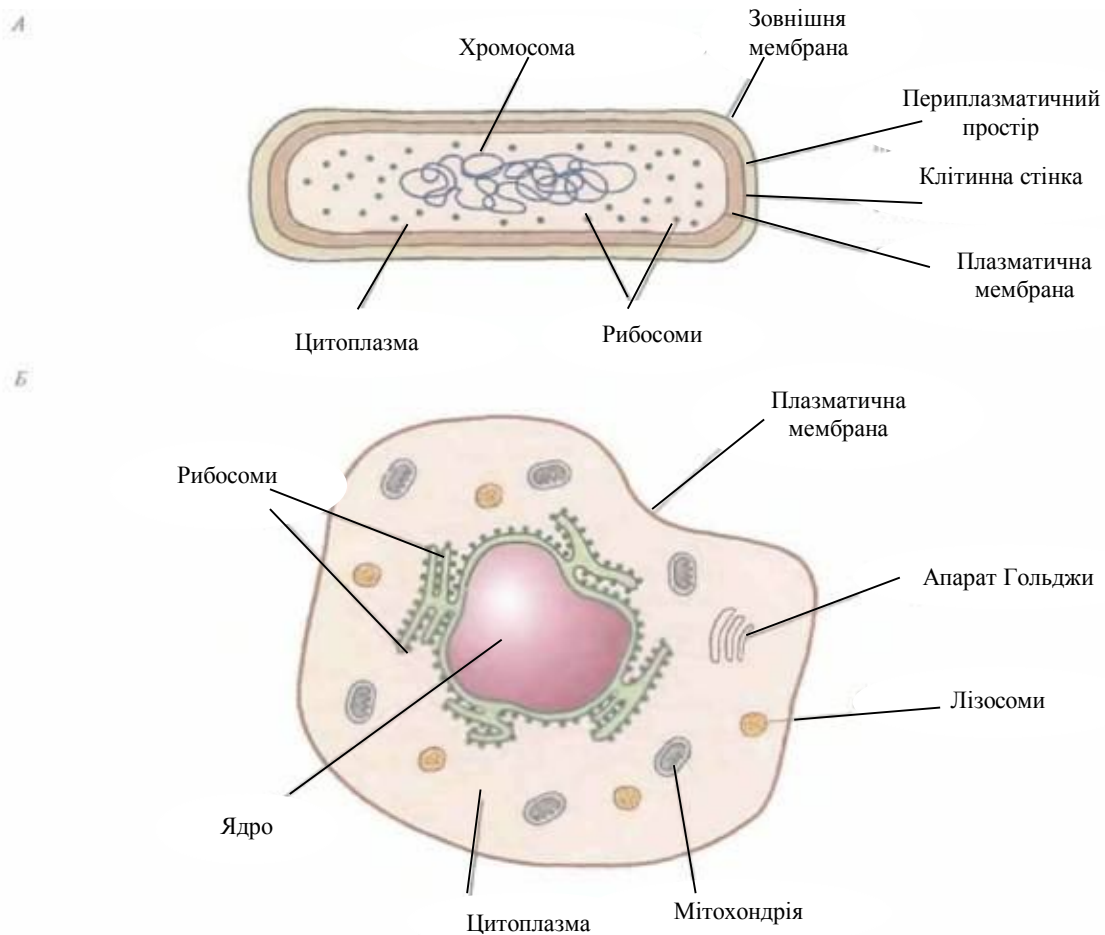


Рис. 2.1. Схематичне уявлення прокаріотичної бактеріальної клітини (А) і еукаріотичної тваринної клітини (Б).

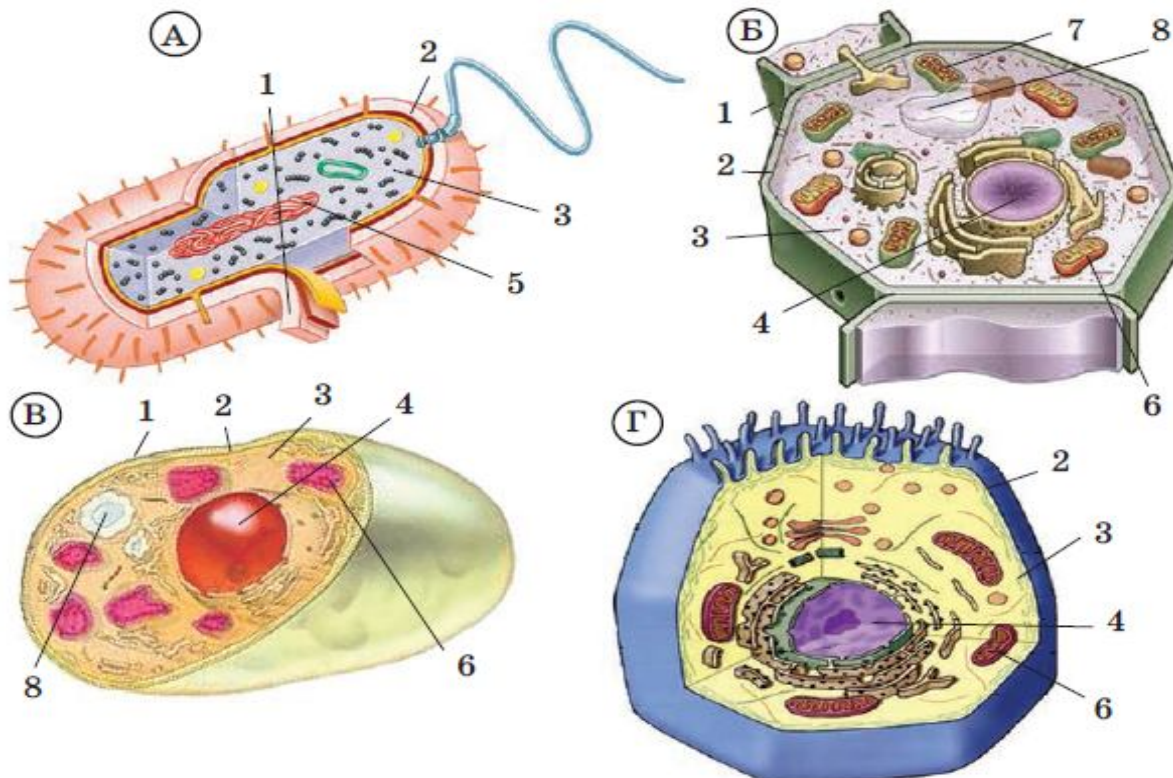


Рис. 2.2. Схема будови клітини: А – бактерії; Б – рослини; В – гриба; Г – тварини

1 – клітинна оболонка; 2 – клітинна мембрана; 3 – цитоплазма; 4 – ядро; 5 – ділянка цитоплазми, що містить ДНК; 6 – мітохондрії; 7 – хлоропласт; 8 – вакуоля, заповнена клітинним соком.

2. Віруси. ВІРУСИ – це автономні генетичні структури, здатні функціонувати і репродукуватися лише в чутливих клітинах людини, тварин, рослин, грибів, найпростіших і бактерій.

Сучасна класифікація вірусів є універсальною для вірусів хребетних, безхребетних, рослин, грибів, найпростіших і бактерій. Вона ґрунтується на фундаментальних властивостях вірусів, із яких провідними є ознаки, що характеризують нуклеїнову кислоту, морфологію, стратегію геному (механізм реплікації) та антигенні властивості.

В основу сучасної класифікації вірусів покладено такі основні критерії:

- 1) тип нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), її структура (кількість ниток);
- 2) наявність зовнішньої ліпопротеїнової оболонки;
- 3) стратегія вірусного геному (механізм реплікації);
- 4) розмір і морфологія віріона, тип симетрії, кількість капсомерів;
- 5) форми генетичних взаємодій;
- 6) спектр сприйнятливих хазяїв;
- 7) патогенність, у тому числі цитопатичні зміни та утворення ті- лець- включень у клітинах;
- 8) географічне поширення;
- 9) спосіб передавання;
- 10) антигенні властивості.

На основі перелічених ознак віруси поділяються на порядки, родини, підродини, роди і види. Формування родин проводиться за критеріями, викладеними в пунктах 1 і 2 (тип нуклеїнової кислоти та наявність зовнішньої ліпопротеїнової оболонки). Поділ на підродини, роди і види ґрунтується на основі решти ознак. Порядки об'єднують родини вірусів з подібною організацією геному та єдиним механізмом реплікації.

Нині відомо понад 3600 видів вірусів хребетних, безхребетних, рослин, грибів, найпростіших і бактерій. Із них 1550 класифіковані в 3 порядки, 56 родин, 9 підродин і 233 роди. З урахуванням штамів і серотипів налічується понад 30 000 вірусів.

Віруси хребетних входять у 2 порядки, 28 родин, із яких 10 – ДНК-вмісні і 18 – РНК-вмісні, 7 підродин і 85 родів. Деякі родини включають тільки один рід. Сім родів у складі родин не мають міжнародної назви. Крім того виділені два «плавучі» роди вірусів.

Типи симетрії вірусів

Капсиди вірусів мають два типи симетрії: спіральну та кубічну (ікосаедральну) рис. 2.3.

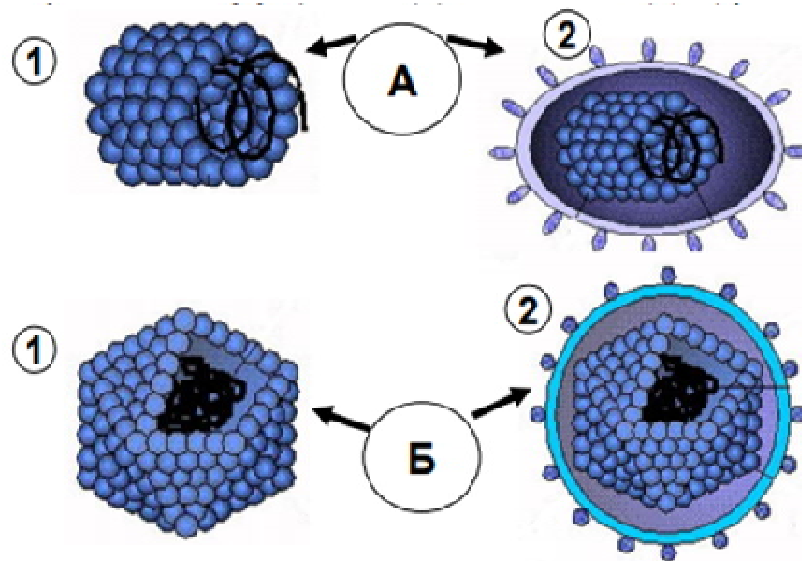


Рис. 2.3. Спіральний (А) і кубічний (Б) типи симетрії нуклеокапсиду у простих (1) та складних (2) вірусів

Поксвіруси зовні нагадують цеглину або овал. Зовнішня оболонка віріона оточує серцевину, яка нагадує двогнутий диск, по боках якого знаходяться овальні структури – бокові тіла. Серцевина містить дволанцюгову ДНК, оточену внутрішньою гладенькою мембраною та зовнішнім шаром із циліндричних субодиниць рис. 2.4.

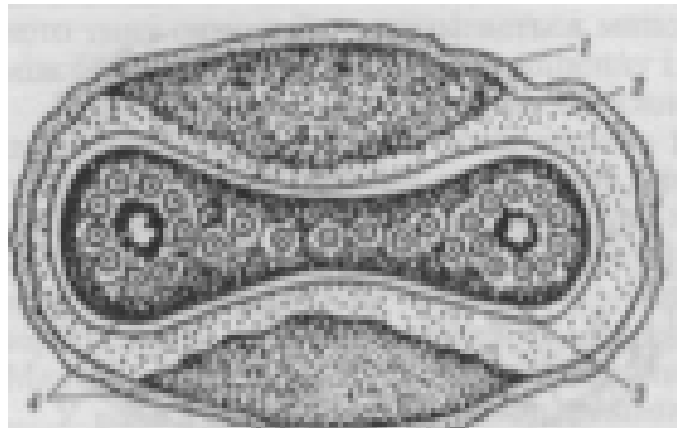


Рис. 2.4. Поксвірус

3. Бактерії. Бактерії – одна з основних груп живих організмів. Бактерії – мікроскопічні, переважно одноклітинні, організми, для яких характерна наявність клітинної стінки, цитоплазми, різних включень, відсутність ядра, мітохондрій, пластид та інших органел рис. 2.5. Вони зазвичай мають клітинні стінки, як рослинні та грибні клітини, але бактеріальні клітинні стінки зазвичай зіткані з пептидогліканів.

Бактерія *Escherichia coli* – один з найбільш добре вивчених організмів. За останні п'ятдесят років вдалося отримати вичерпну інформацію про її

генетиці, молекулярній біології, біохімії, фізіології і загальної біології. Це грамнегативна непатогенна рухлива паличка довжиною менше 1 мкм. Її місцем існування є кишечник людини, але вона також може висівати з ґрунту і води. Завдяки здатності розмножуватися простим поділом на середовищах, що містять тільки іони Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} і SO_4^{2-} , мікроелементи і джерело вуглецю (наприклад, глюкозу), *E. coli* стала улюбленим об'єктом наукових досліджень. При культивуванні *E. coli* на збагачених рідких поживних середовищах, що містять амінокислоти, вітаміни, солі, мікроелементи і джерело вуглецю, час генерації (т. Е. Час між освітою бактерії і її поділом) в логарифмічній фазі росту при температурі 37 °С становить приблизно 22 хв.

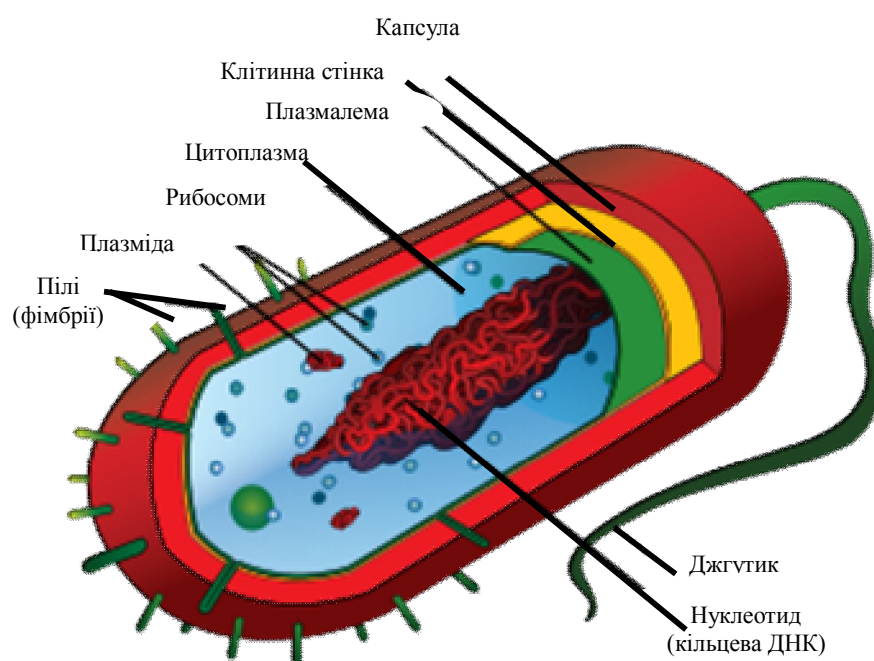


Рис. 2.5. Будова бактерії

Більшість бактерій мають або сферичну форму – так звані **коки** (від грецького слова *kókkos* – зерно або ягода), або паличковидну – так звані **бацили** (від латинського слова *bacillus* – паличка). Деякі паличковидні бактерії (**вібріони**) дещо зігнуті, а інші формують спіральні завитки (**спірохети**). Вся ця різноманітність форм бактерій визначається структурою їх **клітинної стінки** та **цитоскелету**. Ці форми важливі для функціонування бактерій, оскільки вони можуть впливати на здатність бактерій отримувати поживні речовини, прикріплюватися до поверхонь, рухатися і рятуватися від хижаків.

Для кожного живого організму існує певний температурний інтервал, оптимальний для його зростання і розмноження. При занадто високих температурах відбувається денатурація білків і руйнування інших важливих клітинних компонентів, що веде до загибелі клітини. При низьких температурах біологічні процеси істотно сповільнюються або зупиняються

зовсім внаслідок структурних змін, які зазнають білкові молекули. Виходячи з температурного режиму, який вважають за краще ті чи інші мікроорганізми, їх можна поділити на термофіли (від 45 до 90 ° С і вище), мезофіли (від 10 до 47С) і псіхрофіли, або псіхротрофи (від -5 до 35 ° С).

Мікроорганізми, активно розмножуються лише в певному діапазоні температур, можуть бути корисним інструментом для вирішення різних біотехнологічних завдань. Наприклад, термофіли часто служать джерелом генів, що кодують термостабільні ферменти, які застосовуються в промислових або в лабораторних процесах, а генетично видозмінені псіхротрофи використовують для біодеградації токсичних відходів, що містяться в ґрунті і воді, при знижених температурах.

4. Бактеріофаги. Бактеріофа́г або фаг – [віруси бактерій](#), класичний об'єкт [молекулярної біології](#).

Фаги як й інші віруси нерухомі. Взаємодія вірусу з клітиною хазяїна починається після випадкового зіткнення у середовищі рис. 2.6. Життєвий цикл бактеріофагів, які потрапили до клітини, може проходити двома шляхами, які суттєво відрізняються. Відповідно виділяють вірулентних та лізогенних фагів.

Деякі фаги уражають клітини-хазяїна, але не розмножуються у них автономно та не спричиняють лізису (руйнування) клітин до певного моменту. Такі бактеріофаги називають помірними або лізогенними, їх життєвий цикл був вивчений на прикладі [фагу λ](#) (лямбда) [кишкової палички](#). При цьому нуклеїнова кислота фага потрапивши до клітини, інтегрується у бактеріальну хромосому за допомогою специфічних ферментів. Після цього протягом кількох поколінь геном фага реплікується разом з геномом бактерії. Інформація, яка міститься у ДНК фага ніяким чином не проявляється. Такий стан може продовжуватись невизначено тривалий час. Але під впливом деяких факторів зовнішнього середовища ДНК вірусу вивільняється з геному бактерії та починається стадія вірулентного фага з побудовою вірусних часток та лізисом клітини-хазяїна.



Рис. 2.6. Будова фага

5. Дріжджі. 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 такий же простий середовищі, як і *E. coli*. Їх здатність до перетворення цукру в етанол і вуглекислий газ здавна використовувалася для виготовлення алкогольних напоїв і хліба. В даний час щорічно у всьому світі витрачається більше

Дріжджі *S. cerevisiae* представляють також великий науковий інтерес. Зокрема, вони є найбільш зручною моделлю для дослідження інших еукаріот, в тому числі людини, оскільки багато гени, відповідальні за регуляцію клітинного ділення *S. cerevisiae*, схожі з такими у людини рис. 2.7.



Рис. 2.7. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте схему будови прокаріотичної та еукаріотичної клітин (рис. 2.1 та 2.2).
3. Замалуйте схему типів симетрії вірусів та дайте їх характеристику.
4. Замалуйте та дайте характеристику бактерії, бактеріофага та дріжджів.

Контрольні питання

1. Чому в молекулярної біотехнології застосовується так багато різних біологічних систем?
2. Поясніть відмінності між прокаріотами і еукаріотами.
4. Перерахуйте основні властивості *Escherichia coli*.
5. Що означає термін «грамнегативний»?
6. Перелічіть основні властивості *S. cerevisiae*.
7. Які основні компоненти простого рідкого живильного середовища?
8. Які основні компоненти складного рідкого живильного середовища?
9. Що таке первинна клітинна культура?
10. Що таке стійка клітинна лінія?

Лабораторна робота № 3

Тема: Аналітична імунодіагностика методом ELISA

МЕТА ЗАНЯТТЯ. Ознайомитися з основними методами імунодіагностики призначених для виявлення певних антигенів в реакції антиген-антитіло.

1. Методи імунодіагностики. Більшість імунологічних систем детекції мають високу чутливість і специфічність, при цьому залишаються досить простими. Вони широко використовуються для тестування лікарських препаратів, оцінки та моніторингу різних онкологічних захворювань, визначення специфічних метаболітів, ідентифікації і контролю патогенних мікроорганізмів, але мають і свої обмеження. Якщо молекулою-мішенню є білок, то необхідно забезпечити експресію детермінуючих його генів і створити умови, в яких не відбувається маскування або блокування сайту зв'язування з антитілом.

Традиційні процедури діагностики збудників інфекції спираються або на набір характеристик патогенного мікроорганізму, або, що краще, на одну унікальну, легко помітну його особливість. Клінічні мікробіологи намагаються знайти той мінімальний набір біологічних характеристик, за допомогою якого можна буде гарантовано виявляти і ідентифікувати патогенні мікроорганізми. Наприклад, деякі збудники виробляють специфічні біохімічні сполуки, які і необхідно виявити в біологічному зразку. Часто подібну маркерну молекулу можна виявити безпосередньо, провівши високоспецифічний біохімічний аналіз. Але такий підхід неминуче призведе до збільшення числа індивідуалізованих систем детекції патогенних мікроорганізмів. Більш кращим був би універсальний метод, що дозволяє виявляти будь-яку маркерну молекулу незалежно від її хімічної природи. Саме таким є метод, заснований на ідентифікації комплексів антиген-антитіло.

2. Ферментний імуносорбентний аналіз. ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) ІФА (імуноферментний аналіз) або, точніше, ферментний імуносорбентний аналіз – це імунологічний метод дослідження призначений для виявлення певних антигенів в реакції антиген-антитіло.

Цей метод використовують здебільшого для проведення широкомасштабного епізоотичного спостереження та досліджень при запровадженні програм контролю хвороб. Це – високочутливий, специфічний, простий, швидкий та економний у виконанні метод лабораторних досліджень, що дозволяє легко відтворювати та інтерпретувати результат.

Нещодавно розроблено нові варіанти ІФА, що містять неінфекційні реагенти на основі рекомбінантних білків вірусу р32, р54 і рр62. Вони також

проявляють високу чутливість і специфічність при дослідженні сироваток крові навіть за низької її якості.

Якщо в крові тварини виявлено специфічні антитіла до певного збудника, це вказує, що тварина була інфікована. Однак самого збудника на момент дослідження крові в організмі тварини може вже і не бути.

Метод ELISA можна використовувати також і для спостереження за станом здоров'я тварин у стаді, відстежуючи наявність в їх організмі специфічних антитіл. Вагомим його плюсом є тривалий період часу для виявлення інфекції та імовірність ідентифікації тварин, які перехворіли до цього. ELISA часто використовують у «польових умовах», оскільки він легкий у виконанні: антитіла у крові відносно стабільні, а відбір та транспортування зразків – проста процедура.

ELISA доступний уже понад 20 років і дозволяє контролювати стан здоров'я тварин у стаді, виявляючи наявність специфічних антитіл до збудників інфекцій, що можуть зберігатися в крові тварини впродовж всього життя, а також дозволяє ідентифікувати нову інфекцію в стаді.

Наприклад, вірус грипу свиней активно поширюється у стаді впродовж 3–5-и діб, і, як правило, захворювання в цей період не ідентифікують. ELISA-діагностика дозволяє виявляти збудник і налагодити практики менеджменту таким чином, щоб швидше реагувати у випадку повторного захворювання.

Існує цілий ряд підходів, що дозволяють визначити, чи відбулося зв'язування антитіла з антигеном-мішенню. Один з них – це ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA), який часто використовують для діагностики. Процедура включає наступні етапи (рис.3.1).

1. Зразок, в якому хочуть виявити специфічну молекулу або мікроорганізм, фіксують на твердій основі, наприклад на пластиковій мікротитровальній плашці, зазвичай має 96 лунок (рис. 3.1., А).
2. До фіксованому зразком додають антитіло, специфічне до маркерної молекули (перше антитіло), потім промивають лунку, щоб видалити незв'язану молекулу першого антитіла (рис. 3.1., Б).
3. Додають друге антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антитілом і не взаємодіє з маркерною молекулою (рис. 3.1, В). До цього антитіла приєднаний фермент (наприклад, лужна фосфатаза, пероксидаза або уреаза), що каталізує перетворення незабарвленого субстрату в забарвлений продукт. Промивають лунку, щоб видалити незв'язані молекули кон'югата іншого антитіло-фермент.

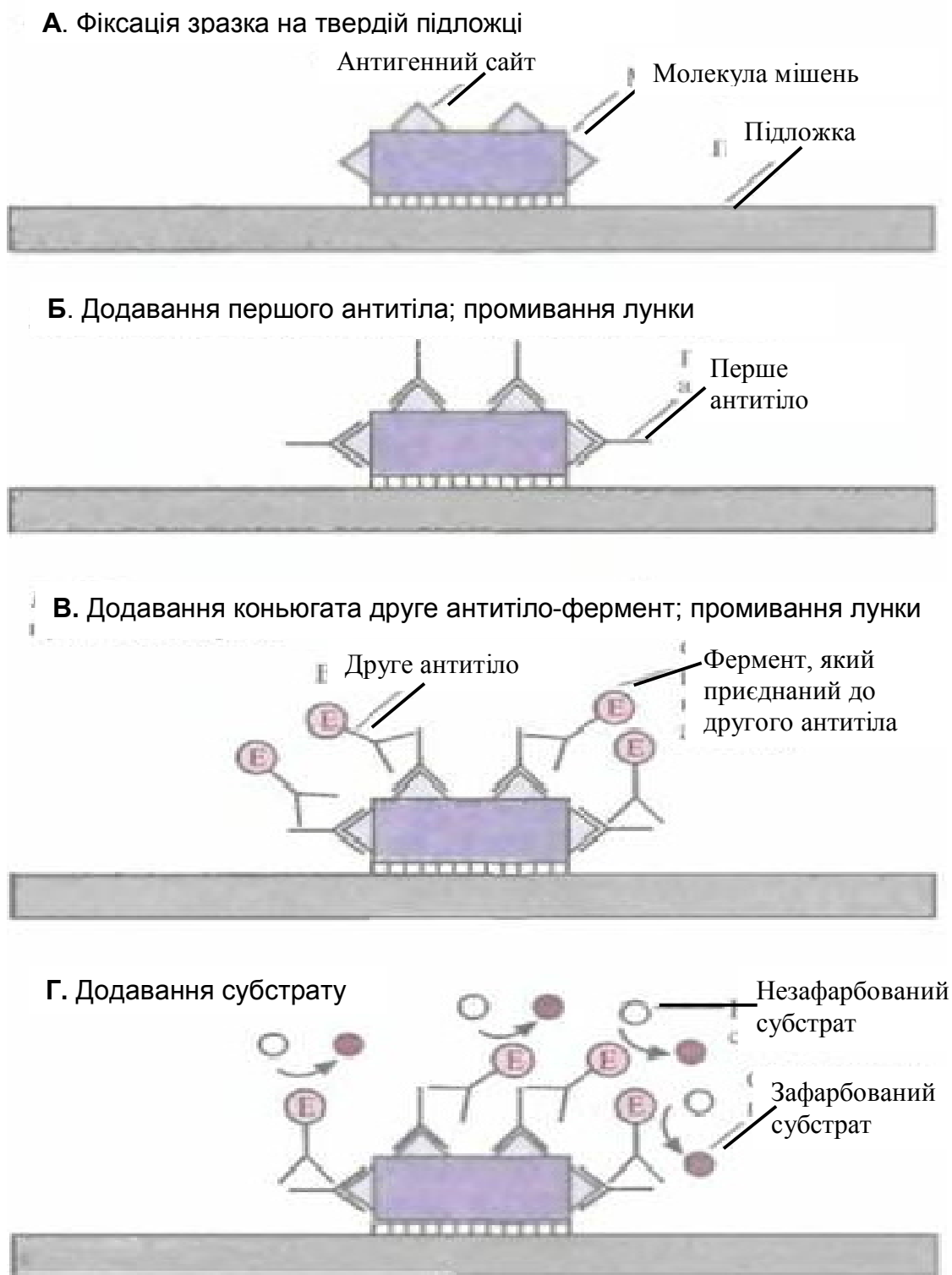


Рис. 3.1. Виявлення антигену-мішені за допомогою ELISA.

Е-фермент, приєднаний до другого антитілу.

4. Додають незафарбований субстрат (рис.3.1, Г).
5. Проводять якісне або кількісне визначення пофарбованого продукту. Якщо перше антитіло не зв'язується з мішенню зразка, то воно видаляється при першому промиванні. Оскільки при цьому кон'югату іншого антитіло-фермент ні з чим зв'язуватися, він видаляється при другому промиванні, і зразок залишається незабарвленим. Якщо зв'язування з мішенню відбувається, то друге антитіло приєднується до

першого, і кон'югований фермент каталізує утворення легкореєстрованого пофарбованого продукту.

Основний принцип ELISA – специфічне зв'язування першого антитіла з мішенню. Якщо молекула-мішень являє собою білок, то його очищений препарат зазвичай використовують для отримання антитіл, за допомогою яких потім і виявляють цю мету. Антитіла, які утворюються в сироватці (антисироватки) крові імунованих тварини (зазвичай кролика), зв'язуються з різними антигенними детермінантами (епітопами) молекули-мішені. Таку суміш антитіл називають поліклональним препаратом. Використання поліклональних антитіл має два недоліки, істотних для деяких методів діагностики:

1) вміст окремих антитіл в поліклональному препараті може варіювати від однієї партії до іншої;

2) поліклональні антитіла не можна застосовувати, якщо необхідно розрізнити дві подібні мішені, тобто коли патогенна (мішень) і непатогенна (НЕ-мішень) форми розрізняються єдиною детермінантою.

Однак ці проблеми цілком вирішувані, оскільки зараз навчилися отримувати препарати антитіл, вироблених до однієї антигенної детермінанти, тобто препарати моноклональних антитіл.

3. Системи ДНК-діагностики. Інформація про різноманіття властивостей організму укладена в його генетичному матеріалі. Так, патогенність бактерій визначається наявністю у них специфічного гена або набору генів, а спадкове генетичне захворювання виникає в результаті пошкодження певного гена. Сегмент ДНК, що детермінує дану біологічну ознаку, має суворо певну нуклеотидну послідовність і може служити діагностичним маркером.

В основі багатьох швидких і надійних діагностичних методів лежить гібридизація нуклеїнових кислот – спаровування двох комплементарних сегментів різних молекул ДНК. Процедура в загальних рисах полягає в наступному.

1. Фіксація одноланцюгової ДНК-мішені на мембранному фільтрі.
2. Нанесення міченої одноланцюгової ДНК-зонда, яка за певних умов (температури і іонної сили) злучається з ДНК-мішенню.
3. Промивання фільтра для видалення надлишку незв'язаних міченої ДНК-зонда.
4. Детекція гібридних молекул зонд/мішень.

У діагностичних тестах, заснованих на гібридизації нуклеїнових кислот, ключовими є три компоненти: ДНК-зонд, ДНК-мішень і метод детекції гібридизаційного сигналу. Система детекції повинна бути найвищою мірою своєрідною і високочутливою.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалюйте схему виявлення антигену-мішені за допомогою ELISAа опишіть основні її стадії.
3. Замалюйте схему гібридизації нуклеїнових кислот.

Контрольні питання

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Назвіть основні методи імунодіагностики.
3. На основі якої реакції базується метод імуносорбентного аналізу.
4. Дайте характеристику основних етапів ферментного імуносорбентного аналізу (ELISA).
5. В чому полягає основний принцип ELISA?
6. Назвіть основні недоліки використання поліклональних антитіл.
7. Перерахуйте основні етапи гібридизації нуклеїнових кислот.

Лабораторна робота № 4

Тема: Регуляція транскрипції у бактерій.

МЕТА ЗАНЯТТЯ. Вивчити механізми регуляції активності генів та їх етапи у організмів різного рівня складності.

1. Концепція оперона. Вперше механізми зміни активності генів пояснили французькі науковці Ф. Жакоб і Ж. Моно у 1961 р. Вони запропонували концепцію оперона, згідно з якою на активність структурних генів у прокаріотичних клітинах впливає регуляторний ген, що відповідає за синтез регуляторних білків (рис. 4.1). Ці білки блокують транскрипцію, але з появою в клітині певного субстрату (наприклад, молочного цукру – лактози) вони інактивуються, що уможливорює транскрипцію й утворення функціонального продукту. Цим продуктом є ферменти, що розщеплюють лактозу й сприяють її засвоєнню.

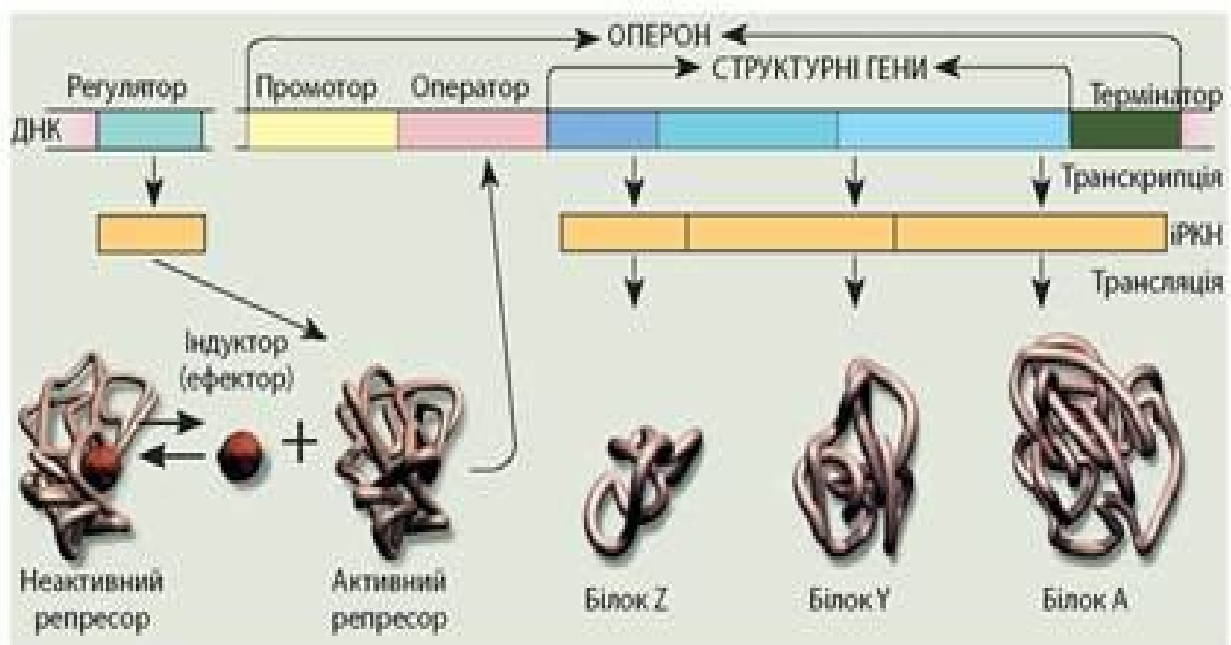


Рис 4.1. Схема регуляції активності генів згідно з концепцією оперона

2. Регуляція активності генів у прокаріот. Усі процеси, які перебувають у бактерійній клітині потребують участі білків. Проте енергетичних ресурсів клітини не стає для одночасного здійснення транскрипції та трансляції (експресії) усіх структурних генів. Тому постійно експресуються лише ті гени, які кодують білки для підтримки основних клітинних функцій, а транскрипція інших структурних генів регулюється.

Нуклеотидна послідовність, в якій закодовано більше одного білка називається оперон. Оперон знаходиться під контролем єдиного промотора та при його транскрипції утворюється одна довга молекула м-РНК, яка кодує декілька білків (рис. 4.2).

В більшості структурних генів є два сайти зв'язування для РНК-полімерази.

Оператор – ділянка ДНК, яка регулює транскрипцію оперона.

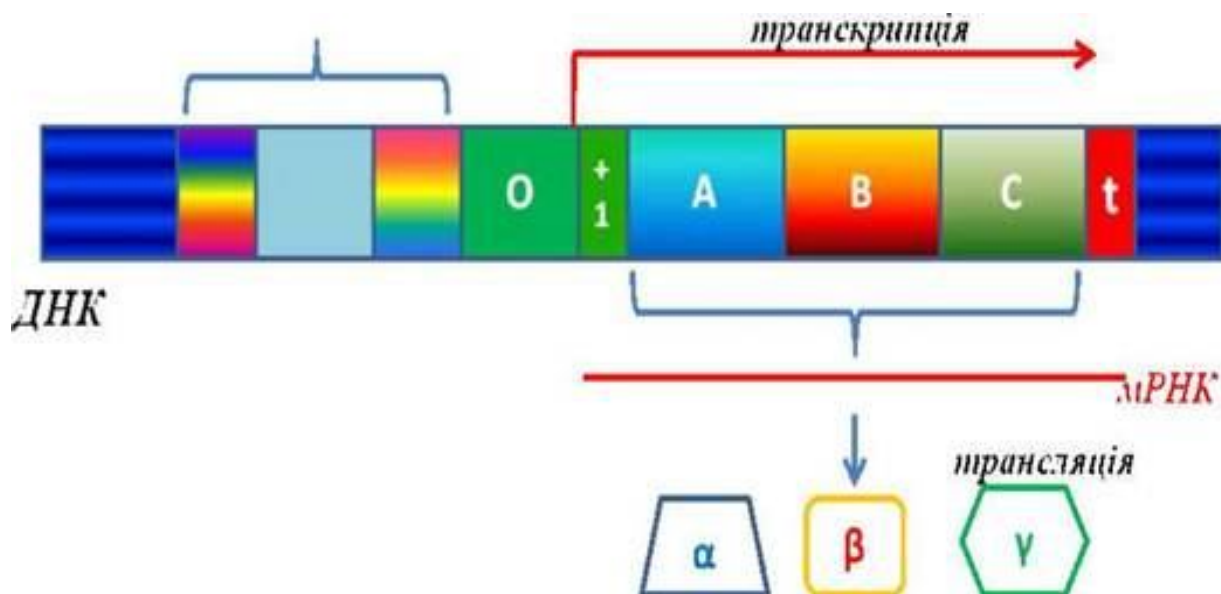


Рис. 4.2. Схема регуляції транскрипції у бактерій.

Репресор – білок, здатний взаємодіяти з оператором гена і блокувати його транскрипцію (заважає переміщенню РНК-полімерази впродовж молекули ДНК)

Корепресор – специфічний ефектор, який зв'язується з неактивним супресором і викликає конформаційні зміни останнього, які дозволяють зв'язуватися з оператором (рис. 4.3).

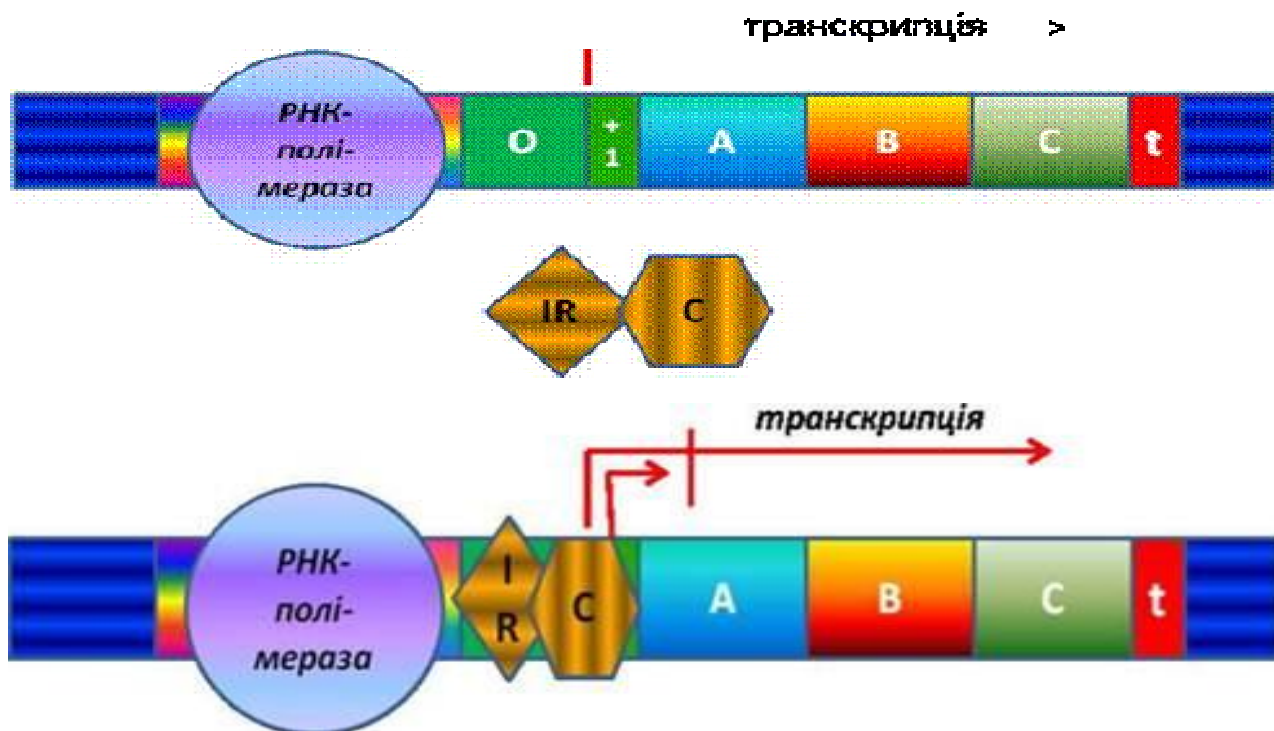


Рис. 4.3. Етапи регуляції транскрипції у бактерій.

3. **Регуляція активності генів у еукаріот.** Клітини будь-якого еукаріотичного організму містять однакову генетичну інформацію, але під

час їхнього розвитку вона реалізується вибірково. Одночасно усі гени, що є в геномі клітин, ніколи не «працюють», тобто активними усі гени водночас ніколи не бувають. Які ж механізми забезпечують регуляцію активності генів в еукаріотичних клітинах?

Регуляція активності генів згідно з концепцією оперона характерна лише для генів, розташованих у мітохондріях й пластидах. Система регуляції ядерних генів є набагато складнішою й різноманітнішою. Наявність ядра й нуклеосомної організації хроматину суттєво розширяє можливості регуляції. У еукаріотичних клітинах експресія генів регулюється на кожному з етапів – на рівні транскрипції, процесингу РНК, експорту РНК, трансляції й посттрансляційної модифікації білків. Найбільш універсальними епігенетичними механізмами регуляції є такі.

Регуляція за участі малих РНК. РНК-інтерференція – механізм регуляції, що здійснюється за допомогою малих (20-25 нуклеотидів) молекул РНК. Основними молекулами є маленькі ядерні РНК (мя-РНК) та мікро-РНК (мкРНК), які вже після транскрипції можуть вступати у взаємодію із комплементарними послідовностями і-РНК та змінювати їхню активність.

Регуляція шляхом метилювання. Це найбільш досліджений механізм регуляції, пов'язаний із приєднанням метильної групи (CH_3) до цитозину в складі нуклеотидів ДНК, що зазвичай пригнічує активність генів на рівні транскрипції.

Регуляція на рівні хроматину. Це найбільш універсальний спосіб регуляції за допомогою зміни стану хроматину впродовж життя клітини. Деконденсований еухроматин створює можливості для зчитування інформації з генів, а ущільнений конденсований гетерохроматин – блокує.

Отже, для еукаріотичних клітин характерні складні й різноманітні молекулярні епігенетичні механізми, що змінюють активність генів і не зачіпають первинної структури ДНК.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте схему регуляції активності генів згідно з концепцією оперона та дайте їй пояснення.
3. Замалуйте схему регуляції транскрипції у бактерій.
4. Замалуйте етапи регуляції транскрипції у бактерій

Контрольні питання

1. Що таке регуляторні й структурні гени?
2. Що таке регуляція активності генів?
3. Назвіть основний спосіб регуляції активності генів у прокаріотичних клітинах.

4. Назвіть найбільш універсальні механізми регуляції активності генів в еукаріотичній клітині.
5. Як організована діяльність генів?
6. Яке значення має регуляція активності генів для клітин?

Лабораторна робота №5

Тема: Моноклональні антитіла

МЕТА ЗАНЯТТЯ. Ознайомитися з методикою отримання моноклональних антитіл та її етапами.

Моноклональні антитіла – це [антитіла](#), які виробляються ідентичними [імунними клітинами](#), які [клоновані](#) з однієї клітини-попередника ([В-лімфоцита](#)), які специфічні до одного [антигену](#). Моноклональні антитіла можуть вироблятися проти будь-якого природного антигену (найчастіше це [білки](#), [полісахариди](#), білкова оболонка [вірусу](#), [пухлинні](#) або пошкоджені клітини, [токсини](#)), який можуть зв'язувати дані антитіла. Моноклональні антитіла можуть використовуватись як для виявлення специфічного антигену в організмі, так і для його зв'язування та його знешкодження. Найбільш широко моноклональні антитіла застосовуються в медицині для діагностики (зокрема, різних [гематологічних](#) захворювань), та для лікування різноманітних [онкологічних](#), [ревматологічних](#), деяких неврологічних захворювань (зокрема, [розсіяного склерозу](#)) та [пульмонологічних](#) захворювань, а також у [трансплантології](#) для профілактики [реакції відторгнення трансплантату](#). Назви усіх моноклональних антитіла, що застосовуються в медицині, мають закінчення «-маб» (скорочення, яке з англійської мови перекладається «monoclonal» (*моноклональні*) «antibodies» (*антитіла*)).

Отримання моноклональних антитіл включає у себе кілька етапів, зокрема, імунізацію тварин, одержання [лімфоцитів](#), одержання гібридом та вирощування клону в промислових біотехнологічних масштабах.

На першому етапі лабораторним мишам проводиться імунізація шляхом введення антигену, антитіла до якого мають виробляти клітини імунної системи миші (рис 5.1). Після проведення циклу імунізації, який триває кілька тижнів, перевіряють, чи в мишей розвинулась [імунна відповідь](#). Якщо імунна відповідь відбулась, то в тварин вилучають [селезінку](#), промивають та подрібнюють її, отримані клітини селезінки змішують із суспензією спеціальних мієломних клітин, і цю суміш початково інкубують у 35 % розчині [поліетиленгліколю](#), а пізніше переносять у середовище, у якому містяться [гіпоксантин](#), [аміноптерин](#) та [тимідин](#), оскільки в такому середовищі ростуть виключно клітини-гібридами мієломи-селезінки. Після отримання гібридом їх на 10-14 день переносять із вказаного вище середовища до лунок пластикових планшетів, на якому їх далі вирощують на звичайному культуральному середовищі без додавання аміноптерину, тимідину і гіпоксантину. Після цього проводиться ідентифікація гібридних клітинних ліній, які виробляють специфічні антитіла шляхом [імуноферментного аналізу](#).

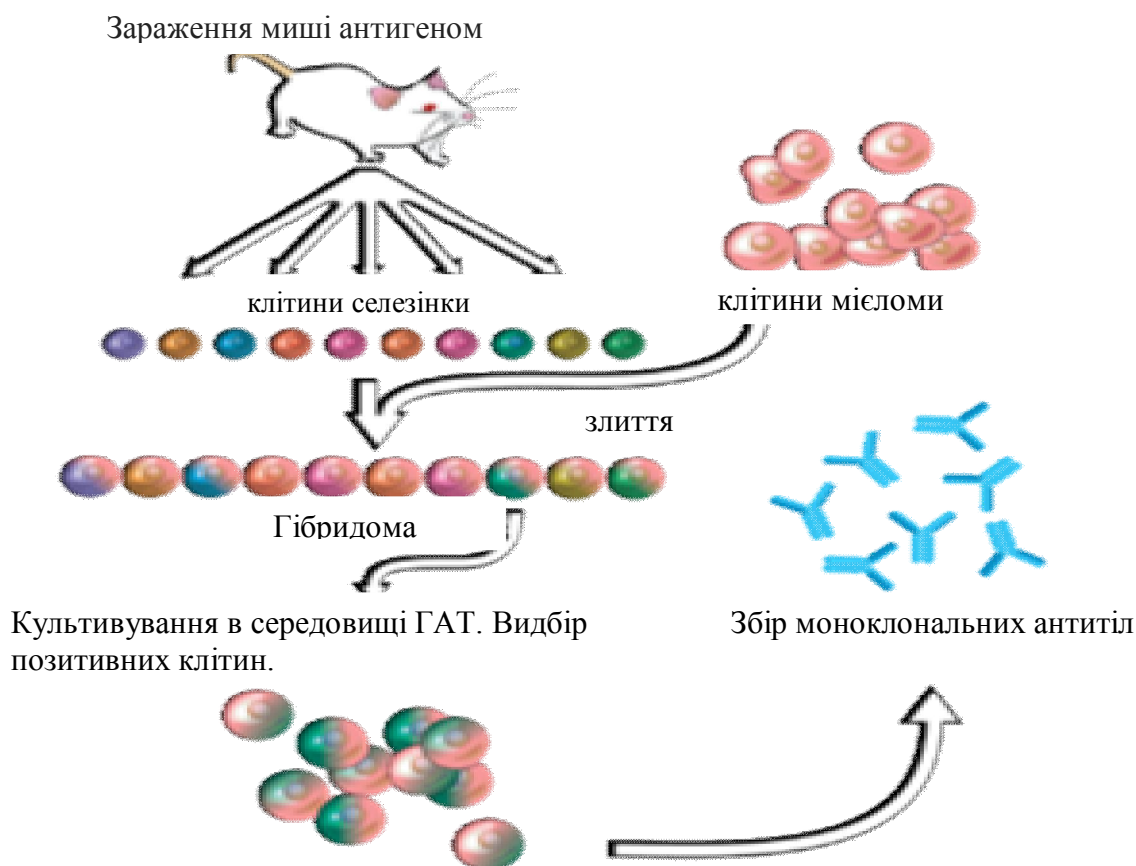


Рис. 5.1. Схема отримання моноклональних антитіл

При отриманні клітин, які продукують необхідні антитіла, їх висівають із лунок на культуральне середовище, культивуючи їх у інші лунки, і шляхом [клонування](#) їх виробляють у кількості, достатній і для промислового виробництва. Іноді гібридоми культивують в організми мишей, вводячи їх у черевну порожнину тварини, і після того, як вони приживуться та розпочинають розмножуватися, їх отримують у великих кількостях із [асцитичної](#) рідини. Деякі моноклональні антитіла отримують у системі для [експресії](#), яка створена на основі клітин [яєчників китайського хом'ячка](#).

Новітньою технологією в отриманні моноклональних антитіл, а саме чисто людських моноклональних антитіл, є метод [фагового дисплею](#), який полягає у вбудовуванні [гену](#), який кодує необхідний білок (у тому числі необхідні антитіла), у генотип [бактеріофага](#), внаслідок чого він починає відтворювати цей білок на своїй оболонці, що дає можливість пізніше методом так званої [білкової інженерії](#) отримувати цей білок у необхідних кількостях.

Під впливом на організм тварини антигена, що містить значну кількість епітопів (антигенних детермінант, ділянок поверхні антигена, до яких створюються антитіла), клітини імунної системи продукують антитіла до кожного з них, завдяки наявності величезної кількості клонів лімфоцитів, які

виробляють антитіла одного типу з вузькою специфічністю. Створюється суміш антитіл, тобто поліклональна сироватка. Спектр антитіл, що виробляються, змінюється під час імунної відповіді, а також при використанні різних тварин. У результаті соматичної гібридизації (злиття) мієломних клітин (пухлинних клітин лімфоцитарної системи) і В-лімфоцитів, які продукують антитіла після імунізації тварин відповідним антигеном, було отримано клони гібридних клітин – гібридоми, які синтезують моноклональні антитіла (моноАТ, або моноати). Передумовою для виникнення методу отримання гібридом, які синтезують моноклональні антитіла, була розробка двох методичних підходів:

- 1) отримання мієлом, адаптація їх до умов культивування поза організмом.
- 2) метод соматичної гібридизації клітин.

Гібридоми, що вирощують у судинах для культивування, синтезують 5-10 мкг антитіл на 1 мл середовища. При використанні спеціальних носіїв кількість антитіл можна збільшити до 100 мкг/мл. Найважливішою властивістю гібридом, яку вони успадкували від мієломних клітин, є їх здатність створювати асцитні пухлини при введенні мишам і синтезувати при цьому до 15 мг антитіл на 1 мл асцитної рідини. Часто ліки, які використовують при лікуванні певних захворювань, не виявляють необхідну ефективність, що може бути пов'язано з тим, що вони не доходять до органу чи клітини в необхідній концентрації. Для полегшення доставки лікарської речовини до місця дії можна приєднувати її молекули до моноклональних антитіл специфічних до певних ділянок поверхні визначених клітин, наприклад, пухлинних. Для цього необхідно, щоб моноклональне антитіло було в необхідній кількості і в достатній мірі очищене, зв'язувалося з високоспецифічним білком клітини-мішені і при необхідності було здатне проникати всередину пухлини. У цьому випадку доза лікарської речовини, що необхідна для лікування, значно зменшується, порівняно з безпосереднім використанням. Першою стадією при отриманні гібридних моноклональних антитіл, які містять два різних центри для зв'язку з антигенами, один з яких спрямований до певного антигену, а інший – до ферменту або лікарської речовини, є створення звичайної гібридоми, що синтезує моноклональні антитіла. У подальшому гібридому, яка виконує роль мієломної клітини, зливають з лімфоцитами, що отримали при імунізації мишей другим антигеном (ферментом або лікарською речовиною). В результаті злиття і відбору створюється вторинна гібридома, яка здатна синтезувати антитіла подвійної специфічності (рис. 5.2).



Рис. 5.2. Схематичне зображення системи цільової доставки лікарської речовини з використанням моноклональних антитіл

Поряд з безсумнівними перевагами, моноклональні антитіла мають і недоліки. Вони не стабільні при зберіганні у висушеному вигляді, в той час суміш звичайних (поліклональних) антитіл завжди містить групу антитіл стійких при обраних умовах. Моноклональні антитіла часто мають надто низьку спорідненість до антигена і надмірно вузьку специфічність, що перешкоджає їх використанню проти мінливих антигенів, які характерні для інфекційних агентів і пухлинних клітин.

Моноклональні антитіла застосовують у лікуванні як онкологічних, так і ревматологічних, пульмонологічних та неврологічних захворювань, є клінічних досвід застосування моноклональних антитіл у кардіології та при інфекційних захворюваннях.

Для лікування різноманітних [онкологічних](#) захворювань застосовуються ряд моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з рецепторами відповідних пухлинних клітин. Для лікування онкологічних захворювань найрозповсюдженішими препаратами моноклональних антитіл є [алемтузумаб](#), [бевацизумаб](#), [цетуксімаб](#), [ритуксімаб](#), [трастузумаб](#), [панітумумаб](#), [іпіліумаб](#), [офатумумаб](#), а [німотузумаб](#) отримав статус [орфанного препарату](#) в [Європейському Союзі](#) для лікування [гліоми](#) в 2004 році. Для лікування [ревматологічних](#) захворювань, зокрема [ревматоїдного артриту](#) та [ювенільного ревматоїдного артриту](#) застосовуються [інфліксімаб](#).

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:
 - А. Ділянки поверхні антигену, до яких створюються антитіла мають назву _____, або _____.
 - Б. В результаті _____ (злиття) _____ клітин (пухлинних клітин лімфоцитарної системи) і В-лімфоцитів, які продукують

антитіла після імунізації тварин відповідним антигеном, були отримані клони гібридних клітин – _____.

В. Найважливішою властивістю гібридом, яку вони успадкували від _____ клітин, є їх здатність створювати _____ пухлини при введенні мишам.

Г. _____, яка виконує роль _____ клітини, зливаються з лімфоцитами, що отримали при імунізації мишей другим антигеном (ферментом або лікарською речовиною). В результаті злиття і відбору створюється _____, яка здатна синтезувати антитіла подвійної специфічності.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. У мишей достатньо легко можна отримати міеломи. Ці пухлини є нащадками однієї клітини (тобто мають моноклональне походження). Пухлини індукують у тварин шляхом внутрішньочеревного введення мінеральних олій або інертного твердого пластику. Однак необхідні міеломи вдалося отримати лише в двох лініях мишей.

Б. Міеломні клітини здатні розмножуватися на поживному середовищі, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (ГАТ – середовище). Тобто міеломні клітини є ауксотрофами – клітинами-мутантами, які мають певну ділянку гена, що відповідає за синтез ферменту необхідного для підтримки процесів життєдіяльності клітини у селективному середовищі.

В. Важливою особливістю клонування є те, що воно дозволяє не лише позбавитися від клітин, що втратили здатність синтезувати антитіла, але і дозволяє відібрати клони необхідної специфічності зі стабільними спадковими властивостями.

Г. Першою стадією отримання гібридних моноклональних антитіл, що поєднують властивості різних міелом, наприклад, здатність синтезувати ферменти або лікарські речовини, є створення міеломи, що синтезує моноклональні антитіла.

Д. Найбільш широко використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Якщо до антитіл приєднати радіоактивні або магнітоактивні матеріали й увести їх у живий організм, то можна виявити в ньому патологічні зони.

Е. Для визначення структури вірусних геномів використовують моноати. Певне антитіло здатне зв'язуватися з певною антигенною детермінантою, або певною речовиною, яку синтезує вірус. Знаючи структуру антитіла, можна з'ясувати фізико-хімічні властивості антигена і на підставі цього вилучити ділянку гена, що відповідає за синтез антигена.

3. Вам необхідно отримати достатню кількість плазміну – лікарського засобу для руйнування фібриногену і запобігання виникнення захворювання тромбоемболія (закупорка артерій), однак треба враховувати, що плазмін може руйнувати і фібрин, а це може викликати внутрішню кровотечу. Яку стратегію створення і використання плазміну Ви будете вибирати? Вкажіть стадії процесу.

4. Замалюйте схему цільової доставки лікарської речовини з використанням моноклональних антитіл.

Контрольні запитання

1. Яким чином ініціюють злиття клітин тваринного походження?
2. Які клітини називають гетерокаріонами, гомокаріонами, синкаріонами?
3. Які існують середовища для культивування клітин тваринного походження?
4. Параметри, що характеризують поведінку клітин у культурі?
5. Які існують гіпотези, що пояснюють загибель клітин тваринного походження?
6. Що таке гібридома? З яких клітин вона побудована?
7. В чому перевага моноклональних антитіл перед поліклональними сироватками?
8. Які клітини називають ауксотрофами? Чому мієломні клітини повинні бути ауксотрофами?
9. Що таке епітоп?
10. З яких етапів складається схема отримання гібридом?
11. Які гібридоми називають вторинними?
12. У чому полягає особливість моноатів подвійної специфічності?

Лабораторна робота № 6

Тема: Гібридизація з ДНК-зондами

МЕТА ЗАНЯТТЯ. Освоїти сутність реакції гібридизації нуклеїнових кислот (ДНК-зонди), ознайомитися з її компонентами і методами постановки.

МАТЕРІАЛЬНЕ ОСНАЩЕННЯ. Набір компонентів, реактивів для постановки реакції ДНК-зондів.

ПРИЛАДИ Й АПАРАТУРА: апарат для горизонтального електрофорезу, вакуум-шафа з підігрівом, лічильник радіоактивності, настільна центрифуга на 10 тис. Об / хв, рентгенкассета з підсилюючі екранами.

Метод ДНК-зонди заснований на унікальній властивості генетичного матеріалу організму – молекули ДНК, що складається з мононуклеотидів, утворювати подвійну спіраль шляхом комплементарного з'єднання азотистих основ. Молекула ДНК утворює подвійну спіраль, при якій азотисті основи першої ланцюга строго комплементарно з'єднуються водневими зв'язками з азотистими підставами другий ланцюга, де аденін з'єднується з тиміном, гуанін - з цитозином (Рис. 6.1.).

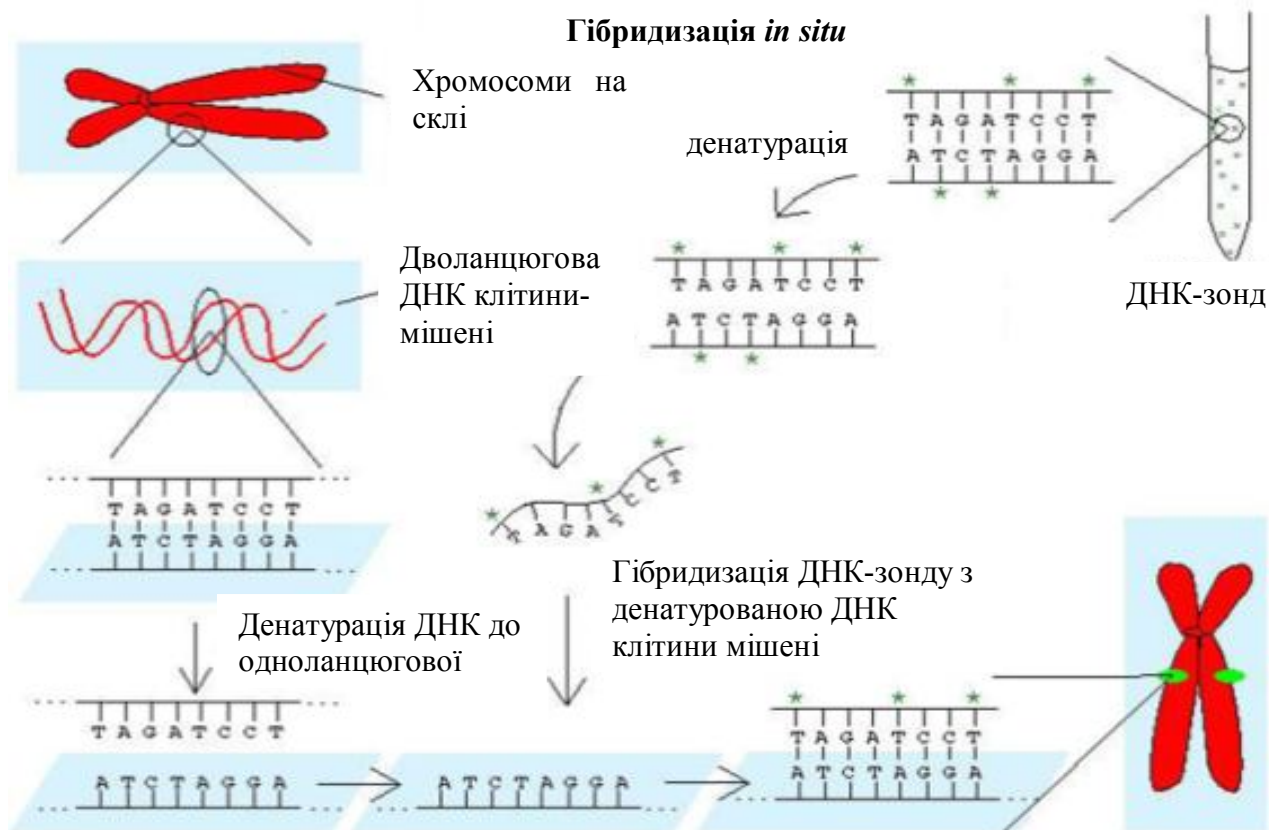


Рис. 6.1. Метод гібридизації з ДНК-зондами

Принцип методу полягає в тому, що структуру подвійної спіралі ДНК (або РНК) можна зруйнувати нагріванням і при цьому відбувається поділ ланцюгів. Цей процес називається денатурацією або плавленням ДНК.

Температуру, при якій відбувається поділ ланцюгів ДНК, називають точкою плавлення, яка дорівнює 85-95°C. Цей процес оборотний, тобто при зниженні температури відбувається відновлення зв'язків – утворення подвійної спіралі. Це явище називають ренатурацією. Якщо при ренатурації взяті молекули з різних джерел, говорять про гібридизації. Здатність до гібридизації двох препаратів нуклеїнових кислот є строгим тестом на компліментарність їх послідовностей.

Гібридизацію можна здійснювати в розчині або на фільтрі (капроновому або нітроцелюлозні). Зручним для роботи є метод гібридизації з використанням фільтрів. При цьому один з препаратів ДНК іммобілізують на нітроцелюлозних фільтрах, на яких молекула ДНК адсорбується. Потім занурюють їх у розчин, що містить другий препарат денатурованій ДНК (ДНК-зонд). Зв'язування ДНК-зонда відбувається тільки в тому випадку, якщо вона має послідовність нуклеотидів, комплементарних спочатку адсорбованій на фільтрі молекулі ДНК (рис.6. 2).

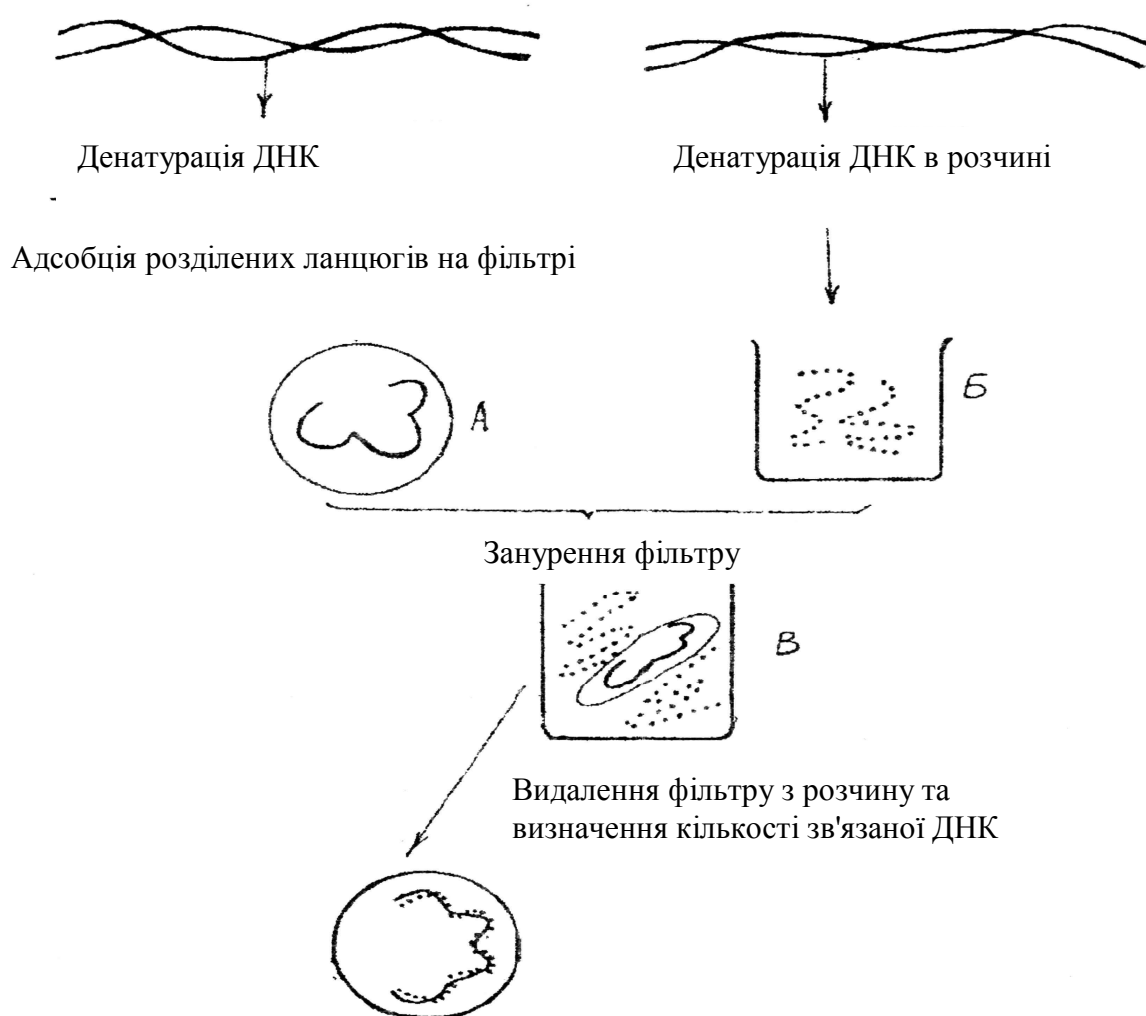


Рис. 6.2. Схема гібридизації на фільтрі: **А** - іммобілізована на фільтрі одноланцюгова ДНК; **Б** - одноланцюгова ДНК в розчині; **В** - фільтр з іммобілізованою одноланцюговою ДНК опускається в розчин, що містить денатуровану молекулу ДНК

Ефективність гібридизації визначають за кількістю мітки, що залишилася на фільтрі. Метод є дуже чутливим. При цьому необхідно мати мічені радіоактивним ізотопом РНК або ДНК-зонди, ідентифікація яких з досліджуваної молекулою реєструється за допомогою радіоавтографії.

В якості ДНК-зонда використовують мічені копії ДНК з відомою послідовністю нуклеотидів.

Метод блоттинга по Саузерну

Для ідентифікації гена молекулу ДНК-генома розщеплюють за допомогою ферментів рестриктаз на шматки розміром приблизно по 15-20 тис. пар нуклеотидів.

Розщеплений таким чином геном піддається електрофоретичного фракціонування в агарозному гелі. Після цього фракції ДНК денатурують нагріванням і переносять з агарозного гелю на нітроцелюлозний фільтр, де їх іммобілізують. Процес перенесення ДНК нагадує промокання (англійською – блот) і називається методом блоттинга по Саузерну. Сутність блоттинга полягає в тому, що агарозний гель поміщають на фільтрувальний папір, замочену в концентрованому сольовому розчині, потім на гель накладають нітроцелюлозний фільтр і зверху поміщають суху фільтрувальну папір.

Сольовий розчин вбирається в суху папір, щоб це сталося, він повинен пройти крізь агарозний гель і потім через нітроцелюлозний фільтр. ДНК переноситься разом з розчином, але затримується нітроцеллюлозою. Іммобілізовану таким чином ДНК можна гібридизувати на місці з радіоактивним зондом. З специфічним зондом будуть гібридизувати тільки комплементарні йому фрагменти. Оскільки зонд радіоактивний, то гібридизацію можна виявити за допомогою авторадіографії.

Кожна комплементарна послідовність проявляється у вигляді радіоактивної смуги, місце розташування якої визначається розміром фрагмента ДНК (рис. 6.3.).

Метод блоттинга є високочутливим і широко застосовується в різних областях, в тому числі для діагностики інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин, наприклад, для виявлення збудників сибірської виразки, бруцельозу, туберкульозу, ящуру, чуми свиней, чуми птахів, ентеровірусів тощо.

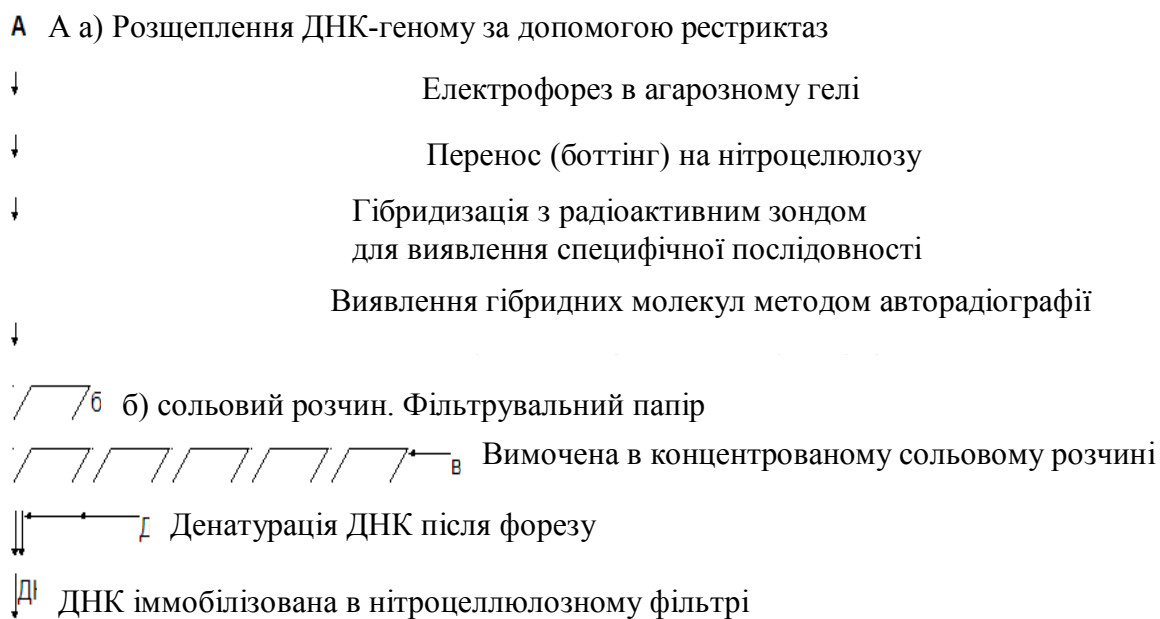


Рис. 6.3. Схема методу блоттинга по Саузерну

Генна дактилоскопія

Метод полягає в аналізі гіперваріабельних ділянок молекул ДНК, який включає наступні етапи: виділення ДНК, фрагментація її за допомогою електрофорезу в гелі. Фрагменти, що містять гіперваріабельні ділянки, виявляють за допомогою спеціального зонда - «проба Джеффріса», з якою вони зв'язуються шляхом гібридизації, які виявляються авторадіографічеськімі.

В якості радіоактивного зонда може бути використана ДНК, виділена з бактеріофага M-13.

Метод точкової (дот) гібридизації виконується шляхом внесення досліджуваних зразків ДНК в денатурованому стані на капронові мембранні фільтри у вигляді точок. Наприклад, ДНК мікобактерій туберкульозу великої рогатої худоби в кількості 3 мкл (1,8 мкг / мл) у вигляді точок наноситься в квадрати (1,5 x 1,5 см). Одноцепочечніє молекули ДНК (денатуровані) адсорбуються на мембрані і фіксуються. Після цього на фільтр наноситься ДНК-зонд, одноцепочечная молекула ДНК, виділена, наприклад, з *Mus. bovis*, мічена радіоактивним фосфором.

У разі збігу азотисті основи молекул ДНК *M. bovis* і мічена 32P ДНК-зонда комплементарні, то відбувається зв'язування азотистих основ з утворенням подвійної спіралі. Після цього незв'язані молекули ДНК-зонда відмиваються і утворюються гібридні молекули виявляють радіоавтографічеські.

На рис. 6.4 представлені результати дослідження патологічного матеріалу на туберкульоз.

а) розщеплення ДНК-геному за допомогою рестриктаз на шматки по 15-20 тис. пар нуклеотидів, електрофоретичної поділ цих рестриктаз в

агарозному гелі, перенесення їх на ніроцеллюлозний фільтр, гібридизація ДНК-зондом і виявлення утворюються гібридних молекул методом авторадіографії.

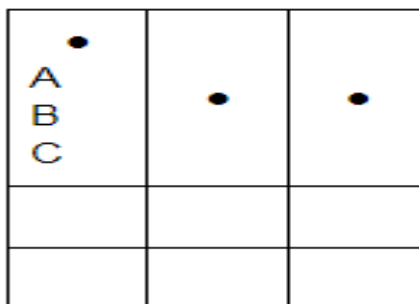


Рис. 6.4. Дот-гібридизація ДНК-зонда *M. bovis*:

A: 1 *M. bovis*; 2, 3 – ДНК з ураженої туберкульозом тканини;

B: 1, 2, 3 - ДНК, виділена з тканин здорових тварин;

C: 1 - ДНК збудника бруцельозу;

2 - ДНК збудника лістерій;

3 - ДНК *M. fortuitum*

б) схема перенесення блоттинга

Б 1 2 3

Як видно з малюнка, позитивні результати (утворення гібридних молекул ДНК) отримані з ДНК *M. bovis* і з ДНК з ураженої туберкульозом тканини (А-2, А-3).

Негативні результати отримані з ДНК, виділеної з тканин здорових тварин (В-1, В-2, В-3), а також з збудника бруцельозу (С-1), збудника лістерій (С-2), з *M. fortuitum* (С -3).

Методика постановки ДНК-ДНК-гібридизації по індикації збудника бруцельозу

Підготовка проб досліджуваного матеріалу:

1. Беруть невеликі шматочки (0,3-0,2 г) органів, тканин, гомогенизують їх шляхом розтирання з кварцовим піском і додаванням фізіологічного розчину.

2. Лизис клітин проводять з додаванням 10% -го водного розчину додецилсульфату, доводячи його концентрацію до 0,5-1,0% і проназа до 500 мкг / мл. Суміш інкубують при 37 ° С 30 хв.

3. Додають рівний об'єм суміші хлороформ-ізоамілового спирту, енергійно струшують і центрифугують при 10 тис. Об / хв. Верхню водну фазу обережно переносять в іншу пробірку і додають 2,5 об'єму холодного 96 ° етанолу. При цьому ДНК випадає в осад.

4. Осадження ДНК підсушують на повітрі і розчиняють в 10-20 мкл води.

5. Беруть капронову фільтр, розкреслюють на квадрати зі сторонами 1,5 x 1,5 см і на них в кілька прийомів наносять розчинений осад, попередньо підігрітий до 100 ° С.

6. Фільтри підсушують і витримують 2 години під вакуумом при 80 ° С.

Фільтри з зафіксованими на них зразками можна довго зберігати при кімнатній температурі в вакуумі.

Приготування ДНК-зондів

1. З бруцелл виділяють ДНК і озвучують її ультразвуком при 22 кГц протягом 1 хвилини.

2. Отримані фрагменти ДНК мітять радіоактивним фосфором методом трансляції. Для цього радіоактивний трифосфат (ТТР) в кількості 60 мк-Кюрі випарюють під вакуумом при кімнатній температурі. У цю ж пробірку додають 5 мкл (5 мкг) озвученої ДПК, по 2 мкл всіх інших трьох немічених трифосфатів, 4 мкл 10хнік-буфера, 2 мкл ДНК-полімерази 1 і 2 мкл 10000 раз розведеною ДНК-ази. Все це перемішують і ставлять на 2 години при 15 ° С. Очищення зонда від невиключившихся трифосфатів виробляють на колонці з сефадексом Ж-50. Після цього етапу зонд готовий для подальшої роботи.

3. Капронові фільтри з досліджуваної ДНК запаюють в поліетиленові пакети, залишивши отвір для внесення предгібризаційної суміші.

Склад предгібризаційної суміші:

Формаїд 1,0 мл, 20хССЦ (3М, 0, 3М цитрат натрію) - 1,2 мл 100х суміші Денхарда (1х-20го розчину фікола, 2% -ний полівінілпірролідина, 2% -го бичачого сироваткового альбуміну) - 0,6 мл, ДНК зі сперми лосося - 0,14 мл.

ДНК зі сперми лосося попередньо денатурирується кип'ятінням при 100 ° С протягом 5 хв. У пакет з фільтром вносять предгібризаційну суміш з розрахунку 0,5 мл на 1 см² фільтра і інкубують при 46 ° С 2 години.

4. Предгібризаційну суміш виливають і в пакет вносять гинув-рідизаційну суміш, що складається з розчину, зазначеного в пункті 3, а також денатуровану ДНК зі сперми лосося, ДНК-зонд. Суміш інкубують при 46 ° С 16-20 годин (залишають на ніч).

5. Гібридаційним суміш виливають і відмивання фільтрів проводять в наступному режимі: в розчині складу 2хССЦ - 0,1% ДДС 2 рази по 15 хв при кімнатній температурі, в такому ж розчині при 60 ° С по 15 хв 2 рази. В кінці фільтри споліскують в 0,1хССЦ 2 рази і висушують при кімнатній температурі.

6. Для обліку реакції проводять радіоавтографія або радіоактивність визначають на лічильнику.

7. Радіоавтографія проводять в наступному порядку: в рентгенівську касету (на екран) лейкопластиром приклеюють лист звичайного паперу, на

нього кріплять фільтр після гібридизації і на останню накладають в темряві рентген-плівку. Рентген-касету закривають, поміщають в поліетиленовий пакет і залишають на ніч при -70°C або -20°C . Після холодильника касету витримують протягом 1 години при кімнатній температурі, потім в темряві виймають плівку, виявляють і зображення закріплюють.

При наявності бруцелл в тканинах в тих квадратах фільтра, куди вони були нанесені, на плівці з'являються чорні плями.

Після встановлення бруцелл в досліджуваних пробах необхідно визначення видової приналежності бруцелл, яке проводиться методом мультілокусної геномної дактилоскопії.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте і опишіть метод гібридизації з ДНК-зондами.
3. Замалуйте та охарактеризуйте схему гібридизації на фільтрі.
4. Замалуйте схему та дайте характеристику методу блоттинга по Саузерну.

Контрльні питання:

1. Сутність і принципи проведення ДНК-зондів.
2. Компоненти і методика проведення блоттинга по Саузерну.
3. У чому полягає метод генної дактилоскопії?
4. Методика постановки ДНК-ДНК гібридизації по індикації збудника бруцельозу.

Лабораторна робота № 7

Тема: Плазмідні вектори. Виділення плазмідної ДНК.

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомлення з методами підготовки і руйнування бактеріальних клітин для виділення нуклеїнових кислот; опанування методу виділення плазмідної ДНК

Вектор – молекула ДНК, що використовується в генній інженерії для переносу фрагментів нуклеїнових кислот від організму донора в організм реципієнту. Молекула-вектор обов'язково повинна мати такі властивості:

по-перше, будь-який вектор повинен довгий час існувати в популяції клітин-господарів, тобто реплікуватись автономно або з хромосомами клітин;

по-друге, структура векторної молекули повинна допускати вбудування в неї чужорідної послідовності нуклеотидів без порушення її функціональної цілісності ;

по-третє, в будь-якому векторі повинні бути біохімічні або генетичні маркери, що дозволяють виявляти його присутність в клітинах.

Плазміди – це поза хромосомні дволанцюгові кільцеві молекули ДНК, які реплікуються автономно.

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

Плазміди є практично в усіх бактерій. Деякі з них містять гени стійкості до антибіотиків або дезинфікуючих засобів, інші – гени, що забезпечують перенос їх з клітини до клітини та інш. Розміри плазмід можуть бути від 1 до 500 т.п.н. Кожна плазміда містить сайт початку реплікації *ori*, без якого самостійна реплікація в клітинах-господарях була б неможлива.

Перші ефективні вектори для клонування фрагментів чужорідної ДНК були одержані з використанням бактеріальних плазмід. Велика серія векторних плазмід, позначена символом pBR, створена на основі реплікона природної плазміди *ColE1*. Найбільш широко використовується плазміда pBR322 (рис.1), що складається з 4363 п.н. Послідовність нуклеотидів pBR322 повністю визначена.

Плазміда містить гени стійкості до тетрацикліна Tet і ампіциліна Amp. Обидва ці гени є маркерами. Плазміда pBR322 містить також ділянку ДНК *ori*, з якої починається реплікації. Треба мати на увазі, що включення в плазмиду фрагментів ДНК по сайтам рестрикції, що містяться в генах Amp або Tet (наприклад *PstI* або *BamHI*), буде порушувати цілісність цих генів. Таким чином стає можливим проведення швидкого відбору рекомбінантних плазмід на селективних поживних середовищах.

Вимоги до векторів:

1. Невеликий розмір (ефективність перенесення екзогенної ДНК у *E.coli* знижується при довжині плазміди більше 15 т.п.н.).
2. Наявність унікального сайту рестрикції, в якій можна вставити екзогенну ДНК.
3. Наявність селективних генетичних маркерів для ідентифікації реципієнтних клітин, які несуть рекомбінантну ДНК.

Плазмідний вектор pBR322 рис. 7.1 був одним з найпопулярніших векторів 80 років 20 ст. Цю плазмиду створили Ф.Болівар та Р.Родригес. Довжина плазміди 4361 п.н.

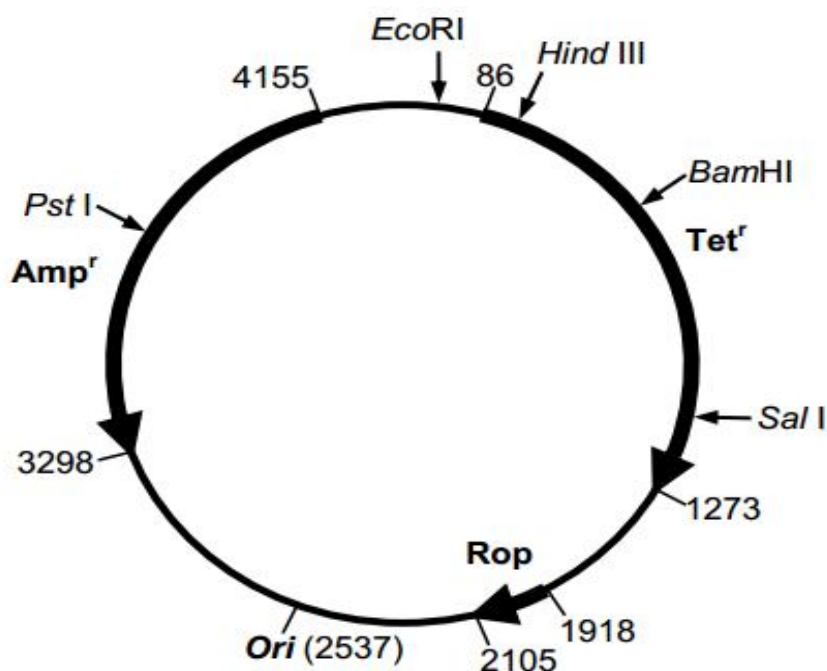


Рис. 7.1. Генетична карта плазмідного вектора pBR322

Вона несе два гена стійкості до антибіотиків – ампіциліну та тетрацикліну, а також унікальні сайти для *BamHI*, *HindIII*, *SalI* в гені *Tetr*, один сайт *PstI* в гені *Amp^r*, один сайт для *EcoRI*. Також є сигнал початку реплікації виключно у ешеріхії. В інші бактерійні клітини переноситься важко.

Всередині цих генів є ділянки дії рестриктаз. Плазміда, точніше ген стійкості до антибіотика, розрізується рестриктазою, і в місці розрізу за допомогою ферментів вмонтовується чужа ДНК, нарізана на фрагменти цією самою рестриктазою. Розрізаний ген при цьому пошкоджується, і бактерія з рекомбінантною плазмідною втрачає стійкість до антибіотика. Зверніть увагу на те, що рестриктази розщеплюють ДНК у тих ділянках, де комплементарні нуклеотиди розміщуються відповідно до осової симетрії. Місця розщеплення молекули даною рестриктазою вказані пунктирними стрілками. Внаслідок розщеплення утворюються фрагменти з липкими кінцями (ТТАА;

ААТТ). Фрагменти різного походження, одержані під впливом однієї рестриктази, мають комплементарні липкі кінці і легко зшиваються між собою в кільцеву структуру. Поряд з плазмідною ДНК вона містить ДНК донора. Найчастіше для створення рекомбінантних гібридних молекул використовують плазмідні вектори, які мають лише одну ділянку дії для певної рестриктази, тобто ДНК розрізується нею в одному місці. У плазміді можна вставити фрагмент чужої ДНК розміром не більше 15 тис. пар нуклеотидів. З цією метою розрізані певною рестриктазою плазмідні вектори і фрагменти ДНК донора змішуються і під дією лігази зшиваються у кільцеву структуру – гібридну плазмідну (рекомбінантну ДНК).

Деякі інші плазмідні вектори при роботі *E. coli* наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Характеристика плазмідних векторів при роботі *E. coli*

Вектор	Копійність	Розмір т.п.н.	Селективні маркери	Унікальні сайти рестрикції	
				в межах маркерного гена	поза маркерним геном
pRK2501	низько-копійний	11,1	ген резистентності до тетрацикліну	<i>Sal</i> I	—
			ген резистентності до канаміцину	<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I	
pSC101	низько-копійний	8,7	ген резистентності до тетрацикліну	<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I	<i>Eco</i> RI
pMB9	мульти-копійний	5,5	ген резистентності до тетрацикліну	<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I	<i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I, <i>Sma</i> I
			ген резистентності до коліцину ¹	—	
pUC19	мульти-копійний	2,7	ген резистентності до ампіциліну	—	—
			<i>Lac</i> Za ² під контролем <i>Lac</i> I	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Xma</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Xba</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Hinc</i> II, <i>Acc</i> I, <i>Bsp</i> MI, <i>Pst</i> I, <i>Sph</i> I, <i>Hind</i> III	

¹ – токсин, що кодується деякими плазмідами і активний до клітин *E. coli*

² – містить промотор і амінокінцеву частину гена β -галактозидази *E. coli*

Рекомбінантні молекули так само, як і вихідні плазмідні, під час введення їх у клітину реплікуються і передаються дочірнім клітинам.

Внаслідок трансформації реципієнтні клітини набувають певних ознак донора.

Як працює клонуєчий вектор?

Плазмиду обробляють рестриктазою, яка розщепляє кільце плазмиди лише в одному сайті одного з генів стійкості. Таким чином утворюється лінійна молекула з липкими кінцями.

Такі молекули змішують з попередньо обробленою рестриктазами донорною ДНК (яка містить необхідний ген). Така ДНК теж має липкі кінці.

Оскільки липкі кінці цих двох ДНК комплементарні, вони спарюються з утворенням гібридних молекул.

Потім суміш обробляють ДНК-лігазою фага T4 у присутності АТР.

В результаті утворюються

- різні комбінації фрагментів
- об'єднані фрагменти донорної ДНК
- об'єднані фрагменти плазмідної ДНК

Щоб зменшити кількість об'єднаних фрагментів плазмідної ДНК, рестрикційну ДНК обробляють лужною фосфатазою, яка відщеплює від лінеарізованої молекули ДНК 5-фосфатні групи. ДНК-лігаза не може зшити дефосфорильовані кінці плазмідної ДНК.

Рекомбінантні молекули ДНК мають два одно ланцюгових розриви, проте її фрагменти тримаються разом двома фосфордифірними зв'язками, які утворюються між дефосфорильованою плазмідною ДНК та рестрикованою донорною ДНК. Після реплікації у трансформованій клітині одноланцюгові розриви лігуються системою клітини-господаря

Трансформація та відбір.

Щоб створити копії рекомбінантних ДНК необхідно ввести її у клітину-господаря. Цей процес називається **трансформацією**.

Практично трансформація досягається змішуванням клітин-хазяїв та суміші ДНК. Для досягнення більшої ефективності клітини піддають дії високих температур, обробляють CaCl_2 . Проте ефективність трансформації залишається невисокою, як правило трансформації піддаються одна з тисячі клітин.

Більшість клітин не містять рекомбінантні ДНК. В деяких з них є об'єднана плазмідна ДНК, в інших неплазмідна ДНК, і лише в поодиноких гібридомна плазміда.

Потім необхідно провести **ідентифікацію клітин**, які містять рекомбінантну ДНК.

Ідентифікація складається з двох етапів. Клітини після трансформації висівають на поживні середовища з ампіциліном – виростають клітини з

інтактним геном *Amp^r* або у складі плазмиди pBR322 або у складі гібридомної плазмиди.

Загальні відомості

Термін "**плазмиди**" був уперше застосований Дж. Ледербергом в 1952р. для позначення всіх позахромосомних спадкоємних детермінант. Нині під цим терміном розуміють незалежно реплікуючу позахромосомну ДНК бактерій.

Плазмиди – звичайні компоненти бактеріальних клітин, але вони також можуть зустрічатись у низчих еукаріот. У більшості випадків плазмиди – це суперспіралізовані ковалентно-замкнені кільцеві молекули ДНК довжиною від 2 до 600 тисяч пар нуклеотидів. Завдяки кільцевій структурі плазмідні ДНК не підпадають під вплив екзонуклеаз. Існують також і лінійні плазмиди, стійкість яких до дії екзонуклеаз забезпечується білками, що знаходяться на кінцях молекули ДНК.

Клітини, які отримують плазмиди, як правило, отримують і нові ознаки. Ці ознаки лягли в основу назв вперше виявлених плазмід, а саме: *F*-плазмід (фактор статі), які надають клітинам донорних властивостей; *Col*-плазмід, які сприяють синтезу коліцинів; *R*-плазмід, що визначають стійкість клітин до антибіотиків.

Плазмиди дають клітинам різноманітні фенотипові ознаки, зокрема, стійкість до антибіотиків (ампіциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та ін.), катіонів (вісмута, кадмія, кобальта, ртуті, свинцю), аніонів (арсенату, арсеніту), мутагенів (акридинів, етидіум-броміду, УФ-хвилям), бактеріоцинів. Отримавши певні плазмиди, клітини здатні викликати біодеградацію камфори, ксилолу, нафталіну, *n*-алканів, толуолу; можуть синтезувати антибіотики, бактеріоцини, гемолізін, інсектециди, пігменти, поверхневі антигени, токсини; використовувати у якості джерела вуглецю різноманітні цукри і незвичні амінокислоти; здатні кон'югувати з реципієнтними штамми бактерій; можуть індукувати пухлини у рослин⁴ а також здійснювати рестрикцію і модифікацію ДНК.

Основними біологічними властивостями плазмід є здатність до реплікації, кон'югативність, інтегративність, несумісність, стабільність і фенотипові ознаки, які вони надають бактеріям.

Плазмиди відіграють роль своєрідних посередників (векторів) при міжклінному обміні генами. Більшість таких генів, зокрема, гени стійкості до антибіотиків, попадають до плазмід за допомогою транспозонів і інтегронів. Цей процес сприяє швидкій адаптації клітин до факторів зовнішнього середовища. Частота таких явищ в природі порівняно невисока. Але на протязі останніх десятиліть вона суттєво виросла у зв'язку з

неконтрольованим використанням антибактеріальних препаратів і забрудненням навколишнього середовища промисловими відходами.

Підготовка бактеріальної культури для проведення досліджень.

У дослідженнях важливе значення має вибір бактеріальної культури та її культивування з метою одержання достатньої кількості клітинної біомаси – матеріалу для генетичних досліджень. У зв'язку із цим звертають увагу, поперше, на склад поживного середовища та на пов'язані з цим проходженням клітинами фаз розвитку, по-друге, на утворення достатньої кількості біомаси, по-третє, на формування клітинних структур, що добре піддаються генетичному аналізу. Для виділення плазмідної ДНК із клітин *E. coli* K-12 останні вирощують на багатому поживному при середовищі при температурі 37 °С в умовах слабкої аерації (досягається легким погойдуванням колби). Відношення об'єму середовища до об'єму колби 1:25. Вирощування проводять протягом 10 – 12 год. Концентрація клітин у середовищі має досягти щільності, що дорівнює $5 \cdot 10^7$ клітин/мл (при цьому спостерігається ампліфікація ДНК).

Руйнування клітин для виділення нуклеїнових кислот.

Залежно від того, який мікроорганізм узято для досліджень (грампозитивний або грамнегативний, його таксономічне положення) застосовують три методи руйнування клітин:

- 1) за допомогою хімічного детергенту;
- 2) з використанням сумісної дії детергентів і гідролітичних ферментів;
- 3) за допомогою таких фізичних методів як руйнування під дією ультразвуку, у результаті різкої зміни тиску або під час струшування зі скляними кульками (діаметром 0,1 – 0,7 мм).

Для руйнування клітин з використанням детергентів і виділення ДНК бактеріальну культуру центрифугують при частоті обертання 6000 об/хв протягом 10 хв при температурі 4 °С.

Осад промивають холодним розчином 0,1 М NaCl, 10 мМ тріс-НСl, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0 і центрифугують при частоті обертання 6000 об/хв протягом 10 хвилин.

Клітини ресуспендують у розчині 50 мМ глюкози, 25 мМ тріс-НСl, 10 мМ ЕДТА, рН 8,0 з 5 мг/мл лізоциму (кристалічного). До 1 г клітин додають 6 мл цього розчину. Суміш залишають на 10 – 20 хв при кімнатній температурі.

Потім до суміші додають 0,2 М розчин NaOH, 1,4 мл 1% розчину ДДС і протягом 10 – 15 хв перемішують вміст склянки.

ДНК можна отримати також по методу Савули й Кроуфорда (Savula R. V., Crawford 1972). Методика виділення ДНК складається з таких етапів:

1) клітини донора *E. coli* K12 вирощують із використанням аерації при 30 – 35 °С до ранньої стаціонарної фази в 10 мл L-бульйону. Аерацію здійснюють пропусканням бульбашок повітря через середовище в пробірках (пробірки 25 200 мм) через скляні палички діаметром 4 – 5 мм, що виходять через корок пробірки. Палички через гумові трубки приєднують до акваріумного мікрокомпресора, дотримуючись правила подавання стерильного повітря). Або аерують культуру клітин струшуванням на качалці в колбах, занурених у водяну баню;

2) клітини осаджують центрифугуванням при частоті обертання 6000 об/хв 10 хв і ресуспендують у 2,4 мл сольового буфера з ЕДТА (БР І);

3) додають 100 мкл 6 % розчину ДДС й інкубують суспензію 10 хв при температурі 37 °С для забезпечення лізису клітин;

4) освітлюють лізат додаванням 50 мкл 5 М КСІ і після охолодження при температурі 0 °С (в льоді) протягом 10 хв центрифугують 20 хв при частоті обертання 10000 об/хв і охолодженні для відділення клітинного дебрісу;

5) надосадову рідину, що містить ДНК, нагрівають при температурі 50–60 °С протягом 5 хв для інактивації залишкових ферментів;

6) стерильність лізату перевіряють висівом на чашки з L-агаром і витриманням протягом 10 – 12 год при температурі 30 – 39 °С;

7) якщо потрібно, осаджують ДНК додаванням двох об'ємів 96 % холодного етанолу й намотують її на скляну паличку з гачком на кінці, а потім розчиняють ДНК у ССР;

8) визначають концентрацію ДНК кольоровою пробою з дифеніламіном, тому що в отриманому препараті можуть міститися РНК й інші домішки, що поглинають в ультрафіолеті;

9) зберігають препарат ДНК у етанолі при температурі 4 °С

Хід роботи

Для проведення занять отримують клітинну масу донорного штаму *Bacillus subtilis*. Бактерії вирощують на глюкозо-сольовому середовищі (або середовищі Спіцайзена) з доданням бульйону Хоттингера (10%).

5 мл середовища в пробірці 22 200 мм висівають культурою донорного штаму, узятій зі свіжого розсіву на чашці або пробірці з агаризованим бульйоном Хоттингера. Бажано, щоб концентрація бактерій в інокуляті становила приблизно 10⁵ клітин/мл. Пробірку вміщують на качалку при температурі 37 °С на 18 год. Після цього порції по 1 мл отриманого посівного матеріалу переносяться в колби на 0,75 л з 50 мл прогрітого середовища. Загальну кількість висіваної культури, готують з розрахунку 20 мл на одного студента. Культури вирощують на качалці при температурі 37 °С у протягом 10 – 12 годин.

Бактерії з усіх колб збирають центрифугуванням на холоді ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) при частоті обертання 6000 об/хв протягом 10 хв (або при частоті обертання 3000 об/хв протягом 20 – 30 хв). Осад ресуспендують у 50 – 100 мл холодного ССР і повторно центрифугують. Потім отриманий осад промивають таким само чином у холодному ССР.

Процедуру центрифугування й промивання бактеріальних клітин проводять без дотримання стерильності.

Промиту біомасу (у вигляді осаду) донорного штаму готують безпосередньо до першого заняття.

Якщо буде потреба, біомасу можна отримувати завчасно й зберігати до початку заняття в замороженому стані.

1. Для виділення ДНК (не стерильно) промиту біомасу донорного штаму, зібрану з 20 мл культури, суспендують в 1 мл БР I у пробірці місткістю 10 – 20 мл із притертою пробкою (рис. 7.2). Для проведення експерименту потрібна невелика кількість ДНК; досить виділити препарат із клітин, зібраних з 20 мл культури, тому що з невеликої кількості біомаси (зібраної з об'єму культури меншого, ніж 5 мл) важко отримати добре сформований осад ("медузу") ДНК. Можна виділити препарат з біомаси, зібраної з 100 мл культури, збільшивши об'єм всіх використовуваних розчинів у п'ять разів порівняно з кількостями, наведеними у прописі. Виділеної при цьому ДНК із надлишком вистачить на проведення багатьох експериментів.

2. До суспензії додають 1 мл БР I, що містить лізоцим у концентрації 2 мг/мл. Суміш інкубують при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 30 – 60 хв, періодично перемішуючи.

3. Після закінчення інкубації в суміш вносять 0,5 мл 5 % розчину ДДС й витримують при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 хв. При цьому відбувається бурхливий лізис біомаси, супроводжуваний різким збільшенням в'язкості. Лізат ретельно розмішують скляною паличкою, після чого до нього додають 2,5 мл БР II.

4. Далі проводять депротейнізацію ДНК: до лізату додають рівний об'єм (5 мл) суміші хлороформ – октиловий спирт, ХОС (9:1) або суміші хлороформ – ізоаміловий спирт, ХІС (24:1). Суміш інтенсивно струшують 30 хв, потім переносять у центрифужну пробірку й центрифугують при частоті обертання 10000 об/хв 15 хв. Після центрифугування верхній водний шар відбирають пастерівською піпеткою (або звичайною піпеткою з розширеним кінцем) і переносять у хімічну склянку місткістю 50 – 100 мл. Зручно користуватися піпеткою, з'єднаною гумовою трубкою зі шприцом, закріпленим у затискачі фізичного штатива. Відбирання слід робити обережно, не захоплюючи денатурований білок на межі поділу фаз.

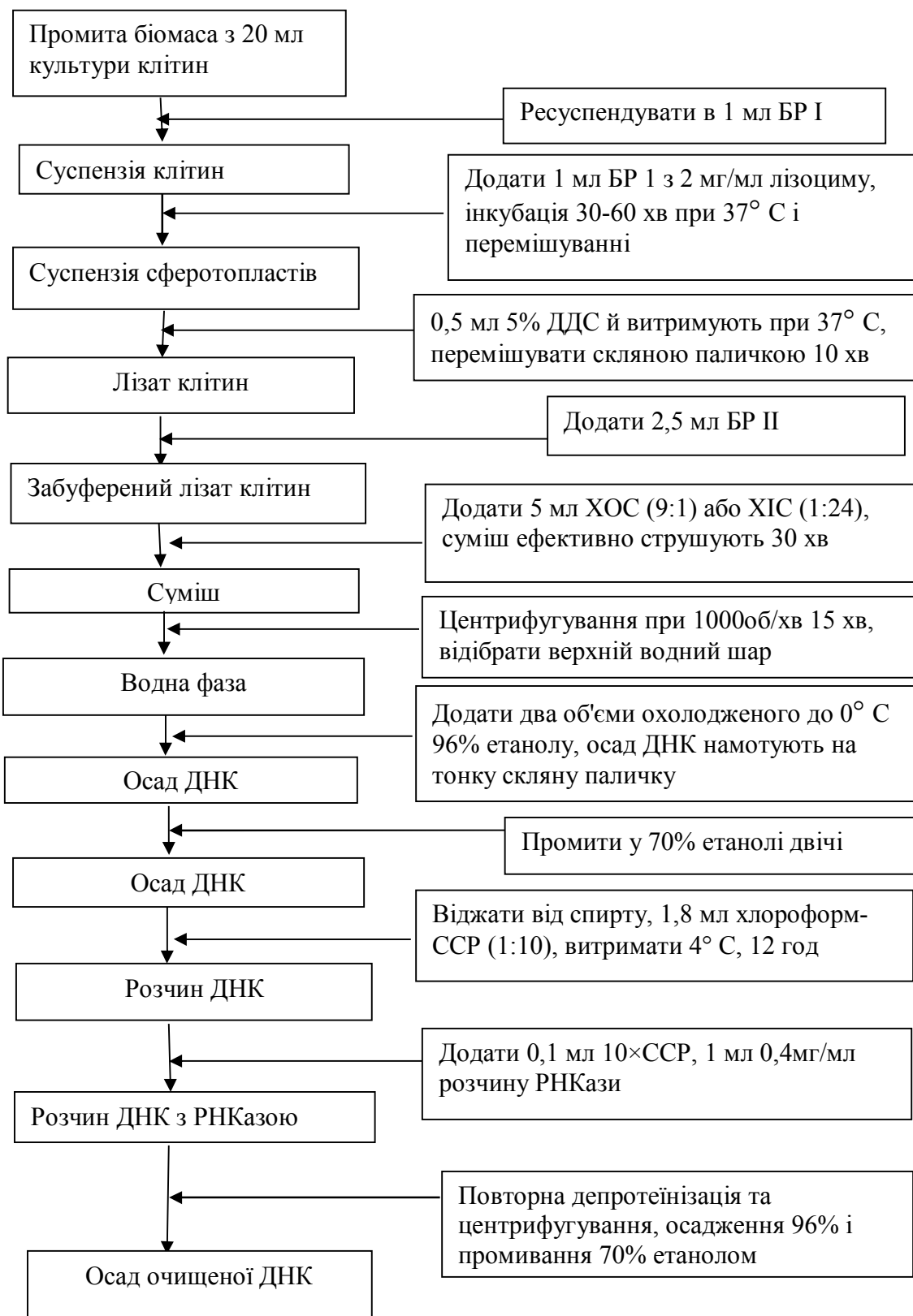


Рис. 7.2. Виділення ДНК з *Bacillus subtilis*

5. До зібраної водної фази доливають два об'єми холодного (0 °С) 96 % етанолу. Утворений осад ДНК намотують на тонку скляну паличку, притискають до стінки склянки, віджимачи від спирту, промивають у двох порціях 70 % етанолу для видалення слідів детергенту. Потім знову віджимають від спирту й переносять осад у пробірку із притертою пробкою,

що містить 1,8 мл суміші хлороформ–ССР (1:10). Пробірку поміщають на ніч у холодильник для розчинення ДНК.

6. Після розчинення ДНК у пробірку додають 0,1 мл десятикратного ССР й 0,1 мл розчину панкреатичної РНК-ази в концентрації 0,4 мг/мл (бактеріальна ДНК дуже повільно розчиняється у ССР). Тому зручніше спочатку розчинити її в розведеному в 10 разів ССР, а потім уже довести концентрацію солей у препараті додаванням десятикратного ССР). Суміш інкубується при температурі 37 °С протягом 30 хв. Після охолодження до неї додають рівний об'єм суміші ХОС (або ХІС) і проводять депротеїнізацію препарату, як описано вище. Якщо після поділу фаз проміжний шар містить багато денатурованого білка, після відбирання водної фази до неї слід додати нову порцію суміші ХОС і знову провести депротеїнізацію (звичайно при очищенні препаратів ДНК за допомогою хлороформ-спиртової суміші процедуру депротеїнізації повторюють не менш чотирьох разів).

7. Далі суміш переносять у центрифужну пробірку, центрифугують при частоті обертання 10000 об/хв 30 – 60 хв, верхню водну фазу відбирають, охолоджують і ДНК осаджують двома об'ємами холодного 96 % етанолу. Осад ДНК промивають двома об'ємами 70 % етанолу й зберігають у 70 % етанолі в холодильнику при температурі 4 °С.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалюйте генетичну карту плазмідного вектора pBR322.
3. Охарактеризуйте плазмідні векторів які використовуються при роботі *E.coli*.
4. Здійсніть підготовку бактеріальної культури для проведення досліджень.
5. Проведіть руйнування клітин для виділення нуклеїнових кислот.
6. Здійсніть виділення ДНК, замалюйте блок-схему процесу та занонуйте хід роботи.

Контрольні запитання

1. Що означає термін – плазміда?
2. Де в клітині розташовуються плазміди й епісоми? У чому їхня схожість і відмінність?
3. Які властивості повинна мати молекула-вектор?
4. Які вимоги пред'являються до векторів?
5. Які існують методи руйнування клітин?
6. Як отримують ДНК за методом Савули і Кроуфорда?
7. Як зберігають препарат ДНК?

Лабораторна робота №8

Тема: Вектори для клонування великих фрагментів ДНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомлення з типами векторних систем, що застосовуються у молекулярному клонуванні, з методами синтезу кДНК; опанування методу клонування рекомбінантних ДНК

Для клонування еукаріотичних структурних генів необхідні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони з первинних РНК-транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК в бактеріальній клітині неможлива. Більш того, експресія еукаріотичної ДНК може здійснюватися тільки при наявності прокариотичних сигнальних послідовностей, що регулюють транскрипцію і трансляцію. Кінцеві ділянки еукаріотичних мРНК особливим чином модифіковані: їх 5'-кінці кеповані (містять «кеп з залишку G, часто метильованого»), а 3'-кінці поліаденіліровані (містять poly (A)-«хвіст» з приблизно 200 залишків аденозину).

Наявність poly (A)-хвоста дозволяє відокремити мРНК від рибосомної і транспортної РНК. Для цього сумарну еукаріотичну РНК пропускають через колонку, заповнену целюлозою, до якої «пришиті» короткі олігонуклеотидні ланцюжки з тимідинових залишків довжиною приблизно 15 ланок, oligo (dT). Poly (A)-хвости молекул мРНК спаровуються з oligo (dT) і затримуються в колонці, а молекули тРНК і рРНК вільно проходять через неї. Потім колонку промивають буфером, в якому відбувається розрив водневих зв'язків між А та Т, і мРНК вивільняється.

Саму мРНК можна вбудувати в ДНК-вектор, спочатку на ній необхідно синтезувати двох-ланцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотну транскриптазу і фрагмент Кленова ДНК-полімерази I (рис. 1). Спочатку в реакційну суміш з очищеної мРНК додають короткі oligo (dT), зворотну транскриптазу і чотири dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Poly (A)-хвіст мРНК злучається з oligo (dT), який містить вільну 3'-ОН-групу, яка ініціює синтез комплементарного ланцюга. Матрицею в такому синтезі є молекула мРНК, а каталізує його зворотна транскриптаза, що продукуються деякими РНК-вірусами. Вона послідовно приєднує до зростаючого ланцюга залишки Т, С, G або А, комплементарні А, G, С або U мРНК. *In vitro* синтез ДНК йде не до кінця, при цьому зворотна транскриптаза перед зупинкою зазвичай «повертає назад» і приєднує кілька нуклеотидів в зворотному напрямку (рис. 8.1), так що в результаті утворюється «шпилька».

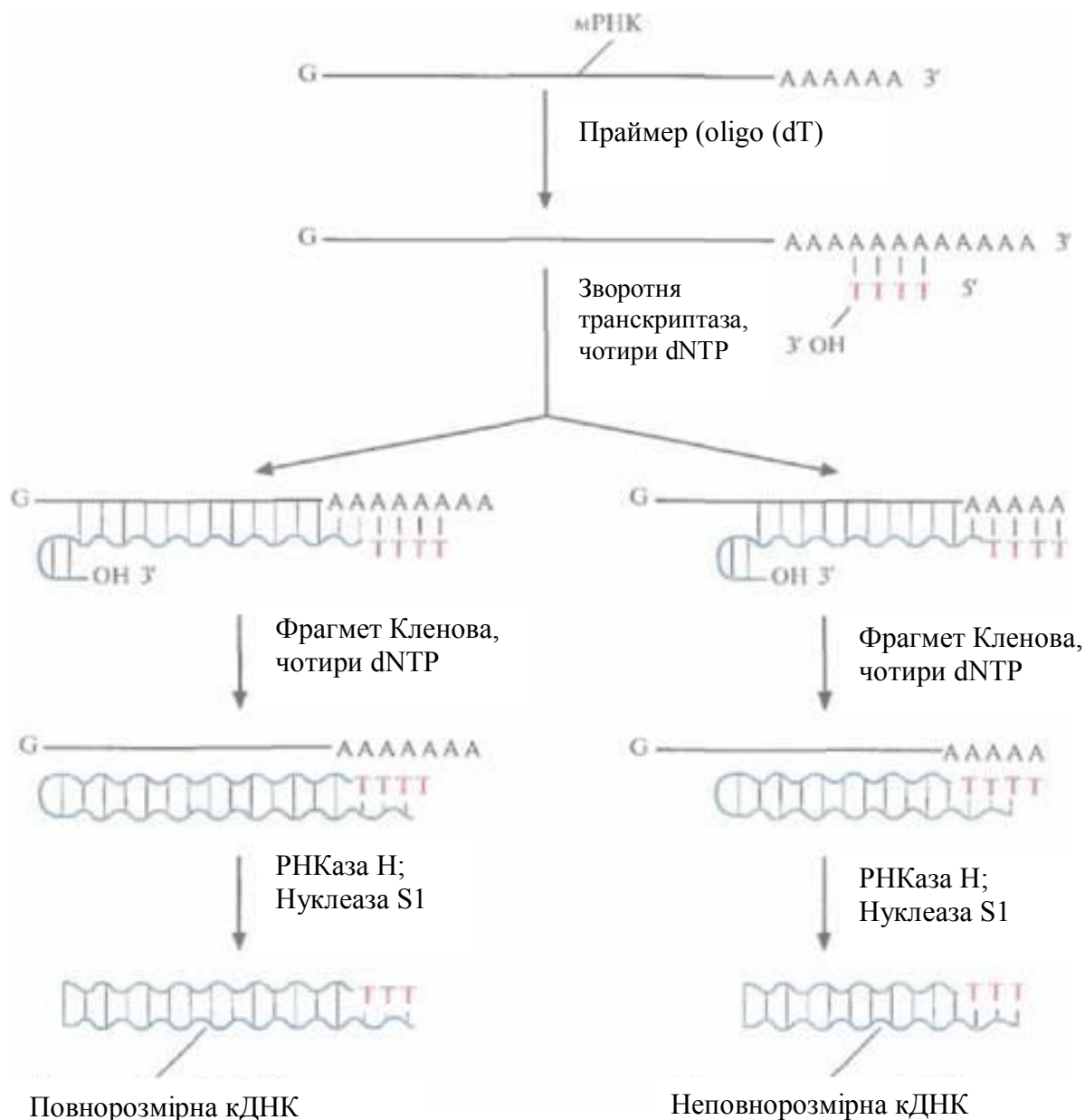


Рис. 8.1. Синтез кДНК.

До препарату очищеної мРНК додають праймер oligo (dT). Для синтезу ДНК на РНК-матриці використовують фермент зворотню транскриптазу і чотири dNTP. *In vitro* зворотна транскриптаза не забезпечує синтез повнорозмірних кДНК копії на всіх матрицях і утворює на кінці зростаючого ланцюга шпильку з вільною 3'-ОН-групою. Ця група ініціює синтез другого ланцюга ДНК за участю фрагмента Кленова. Після завершення синтезу молекули мРНК гідролізують РНКази Н, а ДНК обробляють нуклеазами S1, в результаті чого виходять лінійні молекули ДНК з тупими кінцями без шпильок.

У реакційну суміш додають фрагмент Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, який добудовує другий ланцюжок ДНК, використовуючи перший ланцюг як матрицю. Він приєднує дезоксирибонуклеотиди до зростаючого ланцюга, починаючи з 3'-ОН-кінця шпильки. Після закінчення синтезу препарат

обробляють ферментом РНКазою Н, яка руйнує молекули мРНК, і нуклеазами SI, відщеплюються одноланцюгові кінці ДНК. Отриманий препарат являє собою суміш частково і повністю дволанцюжкових комплементарних ДНК-копій (кДНК) мРНК, що переважає в початковому зразку.

Різні кДНК можна вбудувати в плазмідний вектор і отримати кДНК-бібліотеки. Для скринінгу кДНК-бібліотеки з метою ідентифікації клонів, які несуть специфічні гібридні плазміди, можна використовувати метод гібридизації або імунологічні методи. В останньому випадку кДНК повинна бути вбудована в сайт, що знаходиться під контролем бактеріального промотора, що забезпечує транскрипцію. Однак практично жоден вектор не гарантує, що у вбудованій кДНК збережеться правильна рамка зчитування і синтезується правильний поліпептидний ланцюг. Проте всі позитивні клони, виявлені тим чи іншим методом, необхідно піддати подальшій перевірці і ідентифікувати ті з них, які несуть повнорозмірну нуклеотидну послідовність, що кодує білок-мішень.

Щоб мати можливість клонувати цілий ген, донорну ДНК розщеплюють лише частково. При цьому виходять фрагменти різної довжини, з яких потім створюють геномні бібліотеки. Для клонування великих фрагментів ДНК були сконструйовані вектори на основі бактеріофагів X і P₁, а також плазміди P.

Космідні бібліотеки генів складаються з меншого числа клонів, ніж бібліотеки на основі векторних фагів. Однак останні все ж краще в тих випадках, коли не потрібні фрагменти розміром більше 20 тпн. Це пов'язано з деякими технічними складнощами, що виникають при конструюванні бібліотек генів на основі косміди. Так, виявилось, що при цьому відбувається лігування векторів один з одним, що дає високий фон клонів, які містять вставки чужорідної ДНК. Крім того, скринінг великої кількості колоній бактерій проводити складніше, ніж фагових бляшок. Клоновані великі фрагменти в складі ДНК фага більш стабільні, ніж в космідах, оскільки реплікон фага адаптований до підтримки молекул великого розміру. Важливо відзначити, що для запобігання вмонтування в космідний вектор кількох несусідніх на геномі фрагментів необхідно проводити фракціонування клонованої ДНК або дефосфорилювання, як і в разі отримання бібліотек генів на основі фага Я.

Сучасна геноміка була б неможливою без розвитку систем клонування великих фрагментів геному в спеціальних векторах, здатних реплікуватися в клітинах разом з вбудованими в них фрагментами. До таких векторів відносяться, зокрема, штучні дріжджові хромосоми (YA), поява яких стала можливим завдяки розвитку молекулярної генетики дріжджів. В результаті їх

появи геном вдалося розбити на фрагменти довжиною приблизно 10 пар основ, які в складі YA знаходяться в бібліотеках генів. Кожен фрагмент в цій бібліотеці картований, тобто приписаний до певної ділянки хромосом. Це створює передумови для швидкого виділення потрібного фрагмента геному для роботи *in vitro* як для структурного, так і для функціонального аналізу. Наявність бібліотек фрагментів лежить в основі визначення первинної структури всього генома.

Однак всі ці вектори і векторні системи мають істотний недолік. Оскільки проведення подібних делеційних процедур вимагає використання спеціальних штамів *E. coli* і вельми складної схеми їх вирощування, це служить деякою перешкодою до їх широкого використання. Іншими негативними моментами, особливо для векторів, розрахованих на клонування великих фрагментів ДНК, є деяка нестабільність вставки, труднощі в її реорієнтації, викликані необхідністю читати інший ланцюг ДНК. Також для більшості транспозонів характерним є зосередження місць їх впровадження у дистального кінця вставки в порівнянні зі значно меншою частотою даних подій в центральній і проксимальній частинах табл. 3.

Таблиця 3

Типи векторних систем, що застосовуються у молекулярному клонуванні та їх характеристика:

Вектор	Величина клонованої послідовності (кілобази)	Опис	Недоліки
Плазміди	до 20	Невеликі кільцеві молекули ДНК, що існують в природі, як правило насамперед, у бактеріальних клітинах, і реплікуються автономно у клітині	Величина клонованої послідовності менша, за довжину еукаріотичних генів. Зі збільшення величини вставки падає ефективність лігування та трансформації клітин
Фаг лямбда	~15		
Косміди	45	Гібриди плазмід з вірусними векторами	
P1 фаг	100		
Штучні хромосоми	300-1000		Часті делеції послідовностей всередині вектора та вставки

Плазмідні вектори та вектори-бактеріофаги можуть акцептувати донорну ДНК розміром до 30 тис.п.н. Однак, у багатьох експериментах необхідні довші вставки донорної ДНК, для клонування яких були сконструйовані спеціальні вектори. Загальною їх властивістю є те, що після попадання у бактерію вони здатні реплікуватися як великі плазміди. Такими є косміди, фагміди, фазміди та інші вектори для клонування великих фрагментів ДНК (рис. 8.2).

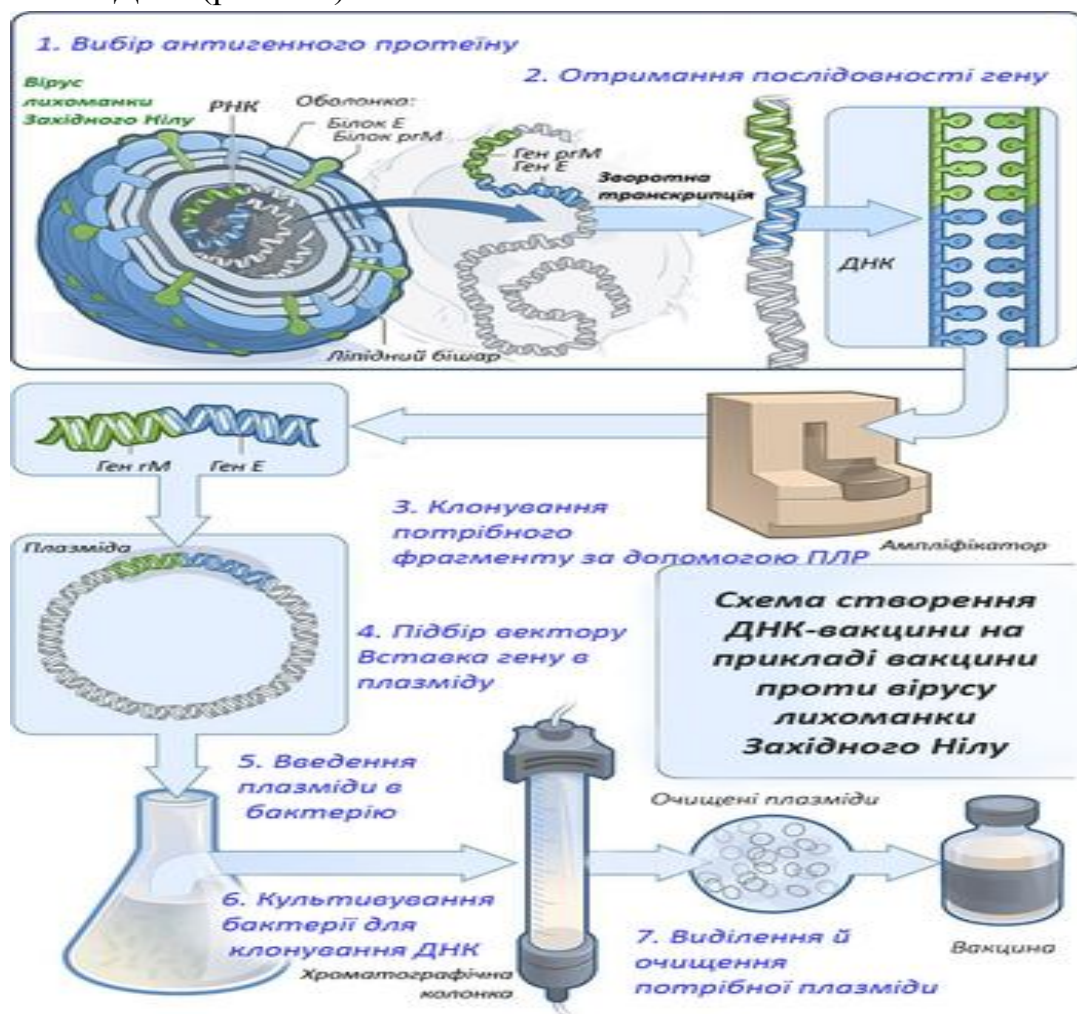


Рис. 8.2. Клонування рекомбінантних ДНК

Косміди – це плазмідні вектори, що містять *cos*-сайти фага для ефективної упаковки *in vitro*. Це вектори, які можуть нести вставки довжиною 35-45 тис.п.н. Вони представляють собою гібриди ДНК фага і бактеріальної плазмідної ДНК. Косміди упаковуються у частинки фага, які доставляють їх у реципієнтні клітини *E.coli*. Плазмідний компонент косміди забезпечує послідовність, необхідну для реплікації косміди. Потрапивши одного разу до клітини косміди формують кільцеві молекули, які здатні, як і плазміди, до автономної реплікації. Косміди призначені для конструювання банків генів.

Фагміди – це плазмідні вектори, які вміщують *ori*-сайт нитковидних фагів. У присутності фагів f_1 або M_{13} фагміди, використовуючи сайт *ori*(+), починають реплікуватися як фагові ДНК і утворюють однопіткові копії плазмід, причому вибір нитки для копіювання залежить від орієнтації *ori*-сайту. Однолагцюгові ДНК, що утворилися, можуть упаковуватися *in vivo* в капсулу і одночасно з фагом-помічником покидати природним шляхом клітину.

Фазміди – є справжніми гібридами між плазмідами і фагом. Це лінійні дуплексні молекули ДНК, кінці яких представляють собою фрагменти ДНК фага, які містять всі гени, необхідні для літичної інфекції. Середня частина фазміди є плазмідною у лінійному стані. Такий вектор містить декілька тандемних повторів плазмідного компонента, що забезпечує необхідний розмір для упаковки ДНК у фагову головку. Ці повтори можуть бути замінені на чужорідні фрагменти ДНК. Рекомбінантні ДНК на основі фазмід здатні упаковуватися у фагові головки з наступним інфікуванням клітин *E.coli*. В клітинах фазміди можуть реплікуватися як фагові ДНК і здійснювати свій подальший розвиток літичним шляхом. Якщо ж вектор містить ген, який кодує репресор фага, то тоді фазміда реплікується як плазміда, а не як фаг. Штучна хромосома P_1 (PAC) – це вектор, подібний до космід, але створений при поєднанні ДНК бактеріофага P_1 та бактеріальної плазмідної ДНК. Геном бактеріофага P_1 більший за геном фага, тому PAC може акцептувати вставки 80-100 тис.п.н.

Штучна хромосома бактерій (BAC) – вектор, що походить від F-плазмід бактерій, може нести вставки довжиною 150-300 тис.п.н. BAC, яка вміщує вставку донорної ДНК, вводиться у бактерію шляхом специфічної трансформації. BAC-вектори використовуються для природного клонування в великомасштабних проектах із геномного секвенування.

Штучна хромосома дріжджів (YAC) – еукаріотична векторна система для клонування вставок донорної ДНК довжиною більше, ніж 300 тис.п.н. Прикладом такої вставки може служити ген людини, який викликає спадкове захворювання – м'язову дистрофію Дюшена і має довжину більше, ніж 1000 тис.п.н. Штучна хромосома дріжджів представляє собою плазмиду бактеріального походження, якій надана лінійна форма і до якої приєднана хромосомна центромера дріжджів, теломерна ДНК дріжджів і орієнтація реплікації дріжджів (“послідовності, що автономно реплікуються”). YAC створюються, зазвичай, на основі ДНК дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і поводять себе у мітозі і мейозі як невеликі дріжджові хромосоми. Інші вектори, які використовуються для дріжджів, будуть розглянуті в розділі, присвяченому генетичній інженерії грибів.

Човникові вектори. Плазміди і бактеріофаги часто реплікуються в клітинах лише одного чи невеликої кількості видів. Створені човникові вектори, які здатні реплікуватися в клітинах різних видів. Човникові вектори містять дві ділянки ініціації реплікації *ori*, що відповідають кожному з двох видів організмів. Такі вектори для різних цілей конструюють за допомогою методів створення рекомбінантних ДНК. Одні з них здатні існувати поперемінно в клітинах різних видів прокаріот, інші – в прокаріотичних (звичайно в *E.coli*) і еукаріотичних клітинах (дріжджових, рослинних чи тваринних). Більшість створених еукаріотичних векторів є човниковими. Основне призначення човникових векторів полягає в тому, що в клітинах прокаріотів здійснюється розмноження (клонування) ДНК, після чого вони переводяться в еукаріотичні клітини, де забезпечується їх функціонування. Різноманітність векторів обумовлена їх специфічністю по відношенню до певних видів організмів.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалюйте схему синтезу кДНК.
3. Надайте характеристику типам векторних систем, що застосовуються у молекулярному клонуванні.
4. Наведіть приклади клонування рекомбінантних ДНК

Контрольні питання:

1. Які вектори використовуються для клонування великих фрагментів ДНК?
2. Що таке космідні бібліотеки генів?
3. Які типи векторних систем застосовуються у молекулярному клонуванні?
4. Що означає термін – косміда?
5. Що означає термін – фагміда?
6. Що означає термін – фазміда?
7. Що таке човникові вектори?

Лабораторна робота №9

Тема: Вектори на основі бактеріофага

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомлення з типами векторних систем, що застосовуються у молекулярному клонуванні, з методами синтезу кДНК; опанування методу клонування рекомбінантних ДНК

Фагові вектори створюють на базі ДНК бактеріофагів таким чином, щоб зберігалася інформація, яка забезпечує збірку віріонів *in vivo*.

Відмінності між плазмідними та фаговими векторами:

1) при використанні фагових векторів життєздатним продуктом, що містить рекомбінантну ДНК, є популяція віріонів бактеріофага;

2) не потрібно проводити клонування і відбір клітин, які містять вектор, – рекомбінантний фаговий геном можна клонувати безпосередньо (на газоні чутливих клітин утворюються бляшки);

3) рекомбінантні фагові геноми можна внести в клітини пермісивного хазяїна шляхом трансфекції (ізолюваної ДНК) чи інфекції (у складі реконструйованих вірусних часток);

4) фагові вектори більш ефективні, ніж плазмідні для клонування великих вставок;

5) виявляти потрібну вставку з негативних колоній фага легше, ніж із бактеріальних колоній.

Для клонування в клітинах ДНК *E.coli* переважно використовуються вектори на основі бактеріофагів λ та M13.

9.1. Вектори на основі бактеріофага λ

Фаг λ можна вважати природним вектором перенесення чужорідної ДНК. Геном фага складається з 48502 п.о. Приблизно третина генома між 20 та 38 т.п.н. містить гени, необхідні для лізогенізації клітини, але не важливі для літичної інфекції. Ця ділянка в природних умовах може заміщатися бактеріальними генами при утворенні трансдукуючих фагів. Неістотною також є ділянка *pin* розміром близько 3,5 т.п.н., розташована між генами *P* і *Q*.

Стратегія створення λ -векторів полягає в тому, що центральна область, несуттєва для літичного циклу, замінюється вставкою.

Для λ -векторів, як і для переважної більшості векторів на основі вірусів, існують верхня і нижня межі розміру фрагмента-вставки, що визначається розміром нуклеїнової кислоти, яка може запакуватися в капсид. Для фага λ максимальний розмір ДНК, що може запакуватися в головку, становить 52 т.п.н., а мінімальний – 38 т.п.н. Гени, необхідні для літичного розвитку фага λ , займають – близько 29 т.п.н. Отже, максимальна можлива ємність λ -вектора становить 23 т.п.н. Пакування *in vitro* рекомбінантної ДНК у капсид

можна проводити з використанням культур *E. coli*, інфікованих двома різними мутантними штамми фага λ . Перший штам має мутацію в гені одного з білків термінази, а другий – у гені білка головки. Обидві культури містять велику кількість інших вірусних білків, але не здатні утворювати зрілі віріони. Рекombінантну ДНК змішують з сумішшю екстрактів клітин обох культур, яка містить усі необхідні компоненти для збірки вібріонів.

Фагові вектори поділяють на:

* вектори включення – несуть один сайт для обраної рестриктази і їх довжини дорівнюють сумі довжин вектора і вставки (вектор λ_{gt} , наведений на рис. 9.1.);

* вектори заміщення – несуть два сайти для обраної рестриктази; фрагмент ДНК, який клонується, вбудовується замість обмеженого цими сайтами буферного (баластного) фрагмента (вектор λ_{781} , наведений на рис. 9.1.).

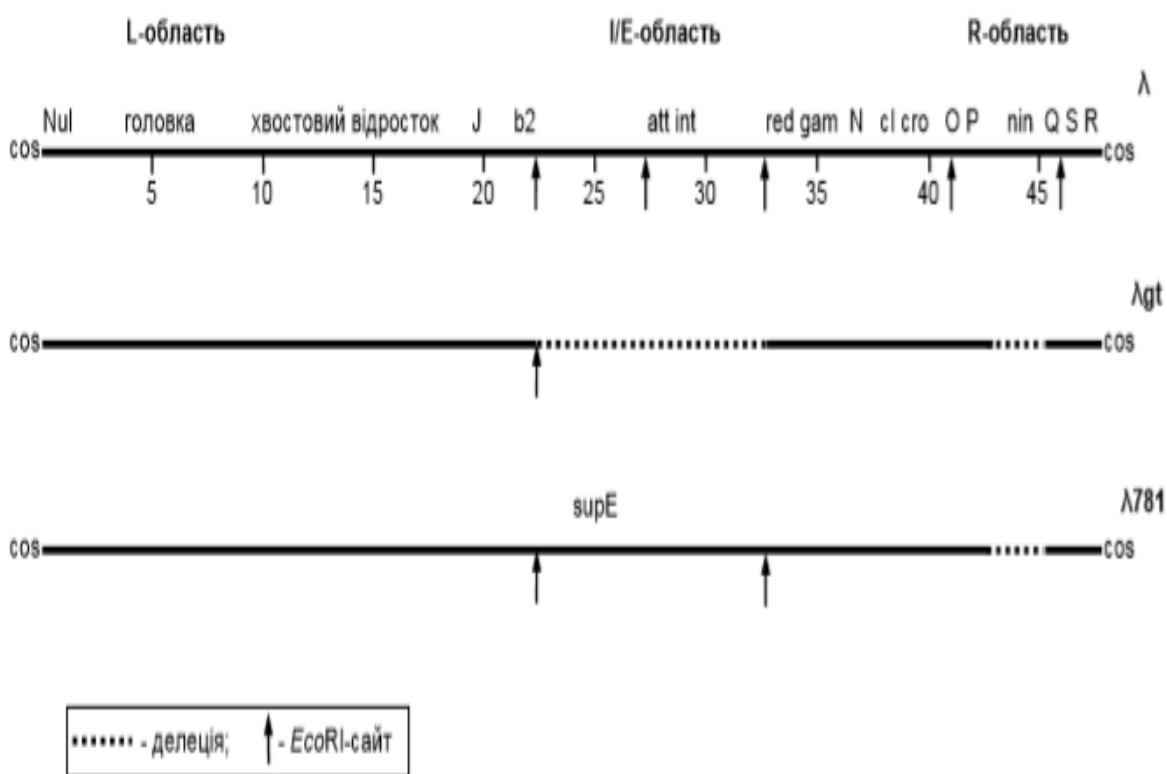


Рис. 9.1. Генетична карта фага λ та деяких векторів, створених на його основі

У будь-якому випадку вектори включають *L*- та *R*-області, на кінцях яких розташовуються *cos*-сайти. При створенні рекombінантної ДНК спочатку під дією лігази сполучаються *cos*-сайти, потім векторні молекули реагують зі вставкою. У векторів серії λ_{gt} (general transduction, див. рис. 9.1.) відсутня центральна ділянка довжиною 10,3 т.п.н. між першим і третім *EcoRI*-сайтами та невелика ділянка 2,8 т.п.н. між генами *P* і *Q*, а два останні *EcoRI*-сайти змінені. Отже, довжина ДНК λ_{gt} 35,4 т.п.н. недостатня для

пакування в головку фага, що дозволяє проводити прямий відбір рекомбінантних ДНК з негативних колоній у вигляді вірусних часток..

Вектор $\lambda 781$ містить між першим і третім *EcoRI*-сайтами буферний фрагмент з бактеріальним геном *supE* – супресором амбер-мутації в гені *lac* реципієнтних клітин. Таким чином, рекомбінантний вірус відбирають за відсутністю забарвлення негативних колоній на середовищі з ШТГ та *X-Gal*.

Сучасні λ -вектори переважно належать до векторів заміщення, буферний фрагмент яких може містити різноманітні гени бактерій та інших вірусів, часто зберігаються гени *red* і *gam* фага λ . Баластний фрагмент таких векторів фланкований множинними сайтами клонування – полілінкерами. Через гени *red* і *gam* векторні фаги не можуть розвиватися в лізогенних за фагом *P2* штаммах клітин. Після заміщення буферного фрагмента, як правило, ці гени видаляються, і рекомбінантні фаги відбираються прямо з негативних колоній, які утворюються на культурах, лізогенізованих *P2*.

Деякі λ -вектори, залежно від стану *att*-сайта та гена *int*, здатні лізогенізувати реципієнтні клітини.

9.2. Вектори на основі бактеріофага *M13*

Нитковидні бактеріофаги *M13* та споріднені з ним *fd* і *fl* придатні для клонування одноланцюгових ДНК, які можуть бути безпосередньо використані для визначення нуклеотидної послідовності.

Геном фага *M13* складається з 6407 нуклеотидів і містить 10 генів, 7 з яких залучені до морфогенезу капсиду (рис. 9.2).

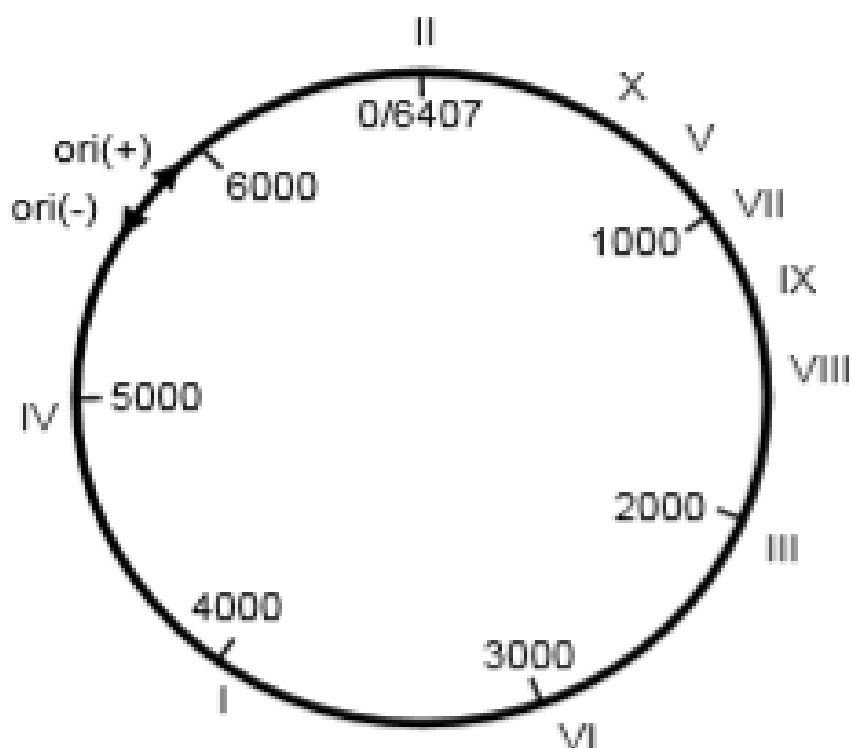


Рис. 9.2. Генетична карта фага *M13*

Віріон фага – білкова трубка розміром 1000×6 нм, побудована з білка *VIII*, всередині якої знаходиться молекула кільцевої одноланцюгової ДНК. Білок-лоцман – *pIII* – 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. 9.2.) знаходиться спейсер, на якому розташовано сайт *pac*, 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 колій 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:

- 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^{12} 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.

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

Широкого розповсюдження набули вектори серії *M13mp*, в яких селективною ознакою є ефект α -комплементції. На рис. 9.3. наведено генетичну карту фрагмента векторів *M13mp* 18/19, які відрізняються між собою лише розташуванням сайтів рестрикції у полілінкері (рис. 9.4).



Рис. 9.3. Генетична карта фрагмента, інтегрованого у спейсер векторів *M13mp 18/19*

Ген *Iac I* кодує білок-репресор лактозного оперона *E.coli*. Послідовність $P_{lac}O_{lac}$ містить промотор гена *Iac Z'* та його оператор. Полілінкер (див. рис 9.4.) не перериває рамку зчитування гена *Iac Z'*. Якщо в середовищі присутній індуктор *Iac*-оперона ППТГ, відбувається явище α -комплементації, за яким можна виявити клітини, що містять векторну ДНК. При введенні в полілінкер фрагмента, який передбачається клонувати, відбувається розрив кодуєчої послідовності гена *Iac Z'* і, як наслідок, α -комплементації не відбувається. Продукт гена *Iac I*, приєднуючись до оператора O_{lac} здатен запобігати експресії клонованого гена у випадку, якщо вона небажана.

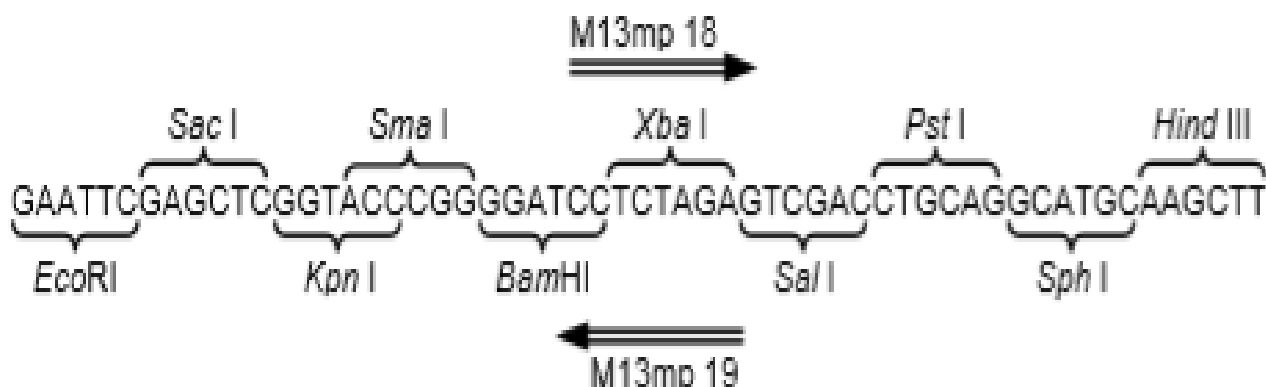


Рис. 9.4. Послідовність основ полілінкера, інтегрованого і ген *Iac Z'* багатьох векторів, у яких маркерною ознакою є ефект α -комплементації, зокрема *M13mp 18* і *M13mp19*

Введення в бактеріальні клітини векторної ДНК здійснюється трансфекцією клітин, при цьому дволанцюгова ДНК трансфікується ефективніше за одноланцюгову.

На основі споріднених з *M13* фагів *fd* і *fl* (гомологія близько 97%) також створено ряд векторів для клітин *E.coli*. Використані при цьому методичні підходи в цілому збігаються з такими для фага *M13*.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Складіть схему відмінностей плазмідних і фагових фекторів.
3. Охарактеризуйте групи фагових векторів.

4. Замалюйте генетичну карту фага λ та деяких векторів, створених на його основі.
5. Охарактеризуйте переваги та недоліки фага *M13*.
6. Замалюйте генетичну карту фага *M13*.
7. Замалюйте генетичну карту фрагмента, інтегрованого у спейсер векторів *M13mp 18/19* та дайте його характеристики.
8. Замалюйте послідовність основ полілінкера, інтегрованого і ген *Iac Z'* багатьох векторів та дайте його характеристики.

Контрольні питання:

1. Назвіть відмінності між плазмідними і фаговими векторами.
2. Чому для більшості вірусних векторів існують обмеження у розмірі вставки?
3. У чому полягає стратегія створення λ -векторів? Які гени вірусу несуттєві для функціонування вектора?
4. Які особливості мають вектори, створені на основі фагу *M13*?

Лабораторна робота № 10

Тема: Перенесення ДНК в *E. Coli*

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомлення з методами перенесення ДНК *E. Coli*

Трансформація – це процес введення вільної ДНК в бактеріальну клітину. *E. coli* використовується в якості організму-господаря при роботі з багатьма рекомбінантними ДНК, і щоб забезпечити проникнення в клітини плазмідної ДНК, їх обробляють крижаним розчином CaCl_2 , а потім витримують при 42°C протягом 1,5 хв. Мабуть, в результаті такої обробки відбувається локальне руйнування клітинної стінки. Цей метод дає максимальну частоту трансформації, приблизно 10^{-3} , тобто на кожну 1000 клітин припадає одна трансформована. Ефективність трансформації, яка визначається як число трансформантів на 1 мкг доданої ДНК, становить приблизно 10^7 - 10^8 . Частота трансформації ніколи не буває 100-відсотковою, але цей недолік компенсується застосуванням схем відбору, що дозволяють швидко ідентифікувати трансформовані клітини.

Клітини, здатні поглинати чужорідну ДНК, називаються компетентними. Компетентність *E. coli* необхідно індукувати, а деякі інші бактерії володіють цією властивістю спочатку. Частку компетентних клітин можна підвищити, використовуючи спеціальне живильне середовище або умови культивування. Для бактерій, стійких до хімічних індукторам компетентності або які мають природну компетентність, застосовуються інші системи доставки ДНК.

Електропорація

Для збільшення проникності клітинних мембран на них впливають електричним струмом. Ця процедура називається Електропорацією. Умови її проведення розрізняються для різних видів бактерій. При роботі з *E. coli* клітинну суспензію (~ 50 мкл) і ДНК поміщають в посудину з зануреними в нього електродами і подають одиничний імпульс струму тривалістю ~ 4,5 мс (ємність конденсатора 25 мкФ, напруга 2,5 кВ, опір 200 Ом). Після такої обробки ефективність трансформації підвищується до 10^9 для коротких плазмід (приблизно 3 т. п. н.) і до 10^6 для великих (приблизно 135 т. п. н.). Аналогічні умови можна використовувати для введення в *E. coli* вектора ВАС. Таким чином, електропорація є ефективним методом трансформації *E. coli* плазмідами, що містять вставки довше 100 т. п. н. Є підстави вважати, що відповідні умови електропорації будуть розроблені для всіх видів бактерій, тоді ця процедура може стати стандартним методом трансформації.

Про механізм проникнення в клітину ДНК в процесі електропорації відомо дуже мало. Мабуть, як і при хімічно індукованій трансформації, в результаті електрошоку в клітинній стінці утворюються тимчасові пори, через які ДНК і проходить в клітку.

Кон'югація

Рекомбінантна ДНК проникає в клітини бактерій, що характеризуються низькою частотою трансформації, таким же чином, як плазмідна ДНК з донорської клітини в клітину-реципієнта в природних умовах. Деякі плазміди мають здатність створювати міжклітинні контакти, через які вони і переходять з однієї клітини в іншу. Утворення контактів між донорською і реципієнтною клітинами забезпечується кон'югативними властивостями плазмід, а саме перенесення ДНК – мобілізаційними. Більшість плазмід, які використовуються в роботах з рекомбінантними ДНК, не володіють кон'югативними функціями і тому не можуть переходити в клітини-реципієнти шляхом кон'югації. Однак проникнення в клітину деяких плазмідних векторів все-таки відбувається при наявності в цій клітці другої плазміди, що володіє кон'югативними властивостями. Таким чином, ввівши в клітку, яка несе мобілізований плазмідний вектор, плазмиду з кон'югативними функціями, можна трансформувати клітини-реципієнти, які не піддаються трансформації іншими способами.

Опишемо в загальних рисах використовувану для цього стандартну експериментальну процедуру. Змішують клітини трьох різних штамів. Коли клітини виявляються в безпосередній близькості один від одного, кон'югативна плазміда, яка в даному випадку має також мобілізаційні властивості, сама переходить в клітину, що містить мобілізований плазмідний вектор, а потім забезпечує перенесення векторної ДНК в клітину-реципієнта. У такій системі реалізуються всі можливі шляхи перенесення, але подібні штами і плазміди повинні мати такі генетичні властивості, щоб можна було відібрати реципієнтну клітину, що отримала даний плазмідний вектор.

Припустимо, що ми маємо три штами:

- 1) штам А, який несе кон'югативну мобілізовану плазмиду, але не може рости на мінімальному поживному середовищі і чутливий до антибіотика Х;
- 2) штам В, який також не може рости на мінімальному живильному середовищі і несе некон'югативний плазмідний вектор, який має ген резистентності до антибіотика Х;
- 3) штам С – реципієнтна клітина-мішень, яка може рости на мінімальному середовищі, не має несумісних плазмід і чутлива до антибіотика Х.

Після кон'югації клітини нетривалий час вирощують на повноцінному середовищі без антибіотика Х, а потім переносять їх на мінімальне середовище з антибіотиком. У цих умовах можуть рости тільки реципієнтні клітини-мішені, які набули плазмідний вектор. Іноді клітина-мішень отримує обидві плазміди, однак цей рідкісний випадок можна виявити, якщо

перенести клітини шляхом передруку на мінімальному середовищі і відібрати транскон'югантів, які здатні рости в присутності антибіотика X, але не можуть рости при наявності гена резистентності до іншого антибіотика (наприклад, до антибіотика Y), який є в кон'югативних плазмідах штаму A. Оскільки для перенесення плазмідної ДНК повинна відбутися кон'югація між трьома бактеріальними штамми, ця процедура отримала назву потрійного схрещування.

Методи генної інженерії дозволяють не тільки здійснювати різноманітні операції з нуклеїновими кислотами, а й отримувати практично будь-які білки у великих кількостях. Ген, що кодує даний білок, можна клонувати, вбудувати (наприклад, у бактеріальну плазмиду) і змусити бактеріальну культуру продукувати цей білок. Виділення та очищення білка з культури біохімічними методами не є принциповою проблемою, зважаючи на його велику кількість.

Одну з найпростіших схем експресії білка в *E. coli* зображено на рис. 10.1. Зрозуміло, що еукаріотичний ген не має сенсу вводити у прокаріотичну клітину - прокаріоти не мають системи сплайсингу. Тому беруть лише кодуючу частину гена, яку можна отримати з бібліотеки клонів кДНК. Використовуючи придатну рестриктазу та лігазу, потрібну кДНК вбудовують у плазмідний вектор для експресії поряд із промотором – наприклад, лактозного оперона. Здійснюють трансформацію рекомбінантної плазміди в бактеріальні клітини, до бактеріальної культури додають синтетичний індуктор *lac*-оперона IPTG. Промотор активується, після чого здійснюється транскрипція гена та трансляція білка.



Рис. 10.1. Експресія білка в бактеріальній клітині

Більш ефективна двоступенева система експресії використовує промотор РНК-полімерази бактеріофага T7. У бактеріальному геномі ані таких полімераз, ані відповідних промоторів немає. У клітину вводяться два

плазмідні вектори: один містить *lac*-промотор і ген РНК-полімерази Т7, інший – сильний промотор полімерази Т7 разом із геном білка, що має бути експресований. IPTG індукує експресію полімерази, яка зв'язується тільки з промотором у складі другої плазміди (інших промоторів немає) і забезпечує синтез великої кількості білка.

Велика кількість білків, у тому числі ферменти, що використовуються у рекомбінантних технологіях, виробляються сьогодні шляхом експресії в бактеріальних клітинах. Поряд із прокаріотичними розробляються та використовуються також системи експресії рекомбінантних білків в еукаріотичних клітинах. Особливо важливими еукаріотичні системи експресії є для еукаріотичних білків, що не можуть бути синтезовані бактеріальною клітиною в активній формі. Зокрема, це стосується білків, що піддаються суттєвим посттрансляційним модифікаціям – наприклад, глікопротеїдів. Найпростішим для використання еукаріотичним "біореактором" є дріжджі, маніпулювати якими так само легко й так само дешево, як і бактеріями. Як дріжджові експресуючі вектори використовують плазміди або штучні хромосоми YAC.

Крім того, часто буває доцільним вбудовування гена-мішені, що кодує бажаний білок, у хромосому клітини-хазяїна: клітина позбавляється при цьому зайвих витрат на реплікацію плазміди та синтез зайвих білків, гени яких несе плазміда. Здійснити інтеграцію можна за рахунок гомологічної рекомбінації між геномною ДНК і ділянками, що фланкують ген-мішень у плазміді (рис. 10.2).

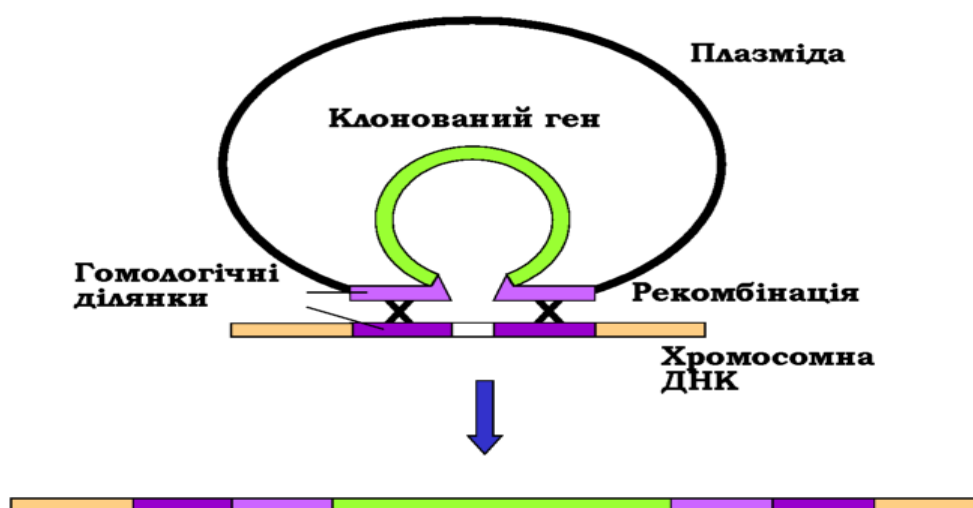


Рис. 10.2. Інтеграція гена у хромосомну ДНК

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Опишіть методи трансформації, електропорації, кон'югації.

3. Замалюйте схему та опишіть процес експресії білка в бактеріальній клітині.
4. Замалюйте схему та опишіть процес інтеграції гена у хромосомну ДНК.

Контрольні запитання.

1. Що таке компетентні клітини?
2. Що таке трансформація та для яких клітин та при яких умовах вона застосовується?
3. Що таке електропорація та для яких клітин та при яких умовах вона застосовується?
4. Що таке кон'югація та для яких клітин та при яких умовах вона застосовується?
5. Навіщо рестрикційну плазмідну ДНК перед лігуванням часто обробляють лужною фосфатазою?
6. Охарактеризуйте способи введення рекомбінантних плазмід в грамнегативну бактерію, наприклад в *E. Coli*.

Лабораторна робота № 11

Тема: Методи секвенування ДНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: опанувати методи секвенування ДНК (метод Сангера, піросеквенування, метод Саузерна, фингерпринтинг ДНК, Нозерн-блотинг, метод ДНК-мікроареїв).

Клонований або ампліфікований фрагмент ДНК можна дослідити різними способами, але найбільш вичерпну інформацію дає встановлення нуклеотидної послідовності (sequence) фрагмента – секвенування.

На рис. 11.1. показано схему найпопулярнішого сьогодні методу Сангера (Frederick Sanger). До одноланцюгової ДНК-матриці додається радіоактивно мічений праймер, повний набір дезоксинуклеозидтри-фосфатів (dNTP), ДНК-полімераза й невелика кількість дидезоксинуклеозидтрифосфату одного з чотирьох типів (наприклад, ddATP). Дидезоксинуклеотид відрізняється тим, що містить атом Н замість ОН-групи не тільки при 2'-, а також і при 3'-атомі пентози (див. рис. 11.1). Відповідно, включення такого нуклеотиду в ланцюг, що синтезується, зупинить подальше зростання ланцюга внаслідок відсутності 3' ОН-групи на його кінці. Оскільки ddATP присутній у невеликій кількості, така подія буде відбуватися в різних точках ланцюга – в усіх, де стоїть аденін напроти тиміну в складі матриці. Денатурація продуктів реакції дасть набір мічених одноланцюгових фрагментів від праймера до кінцевого аденіну, довжина цих фрагментів у нуклеотидах дасть порядковий номер аденіну в складі ланцюга.

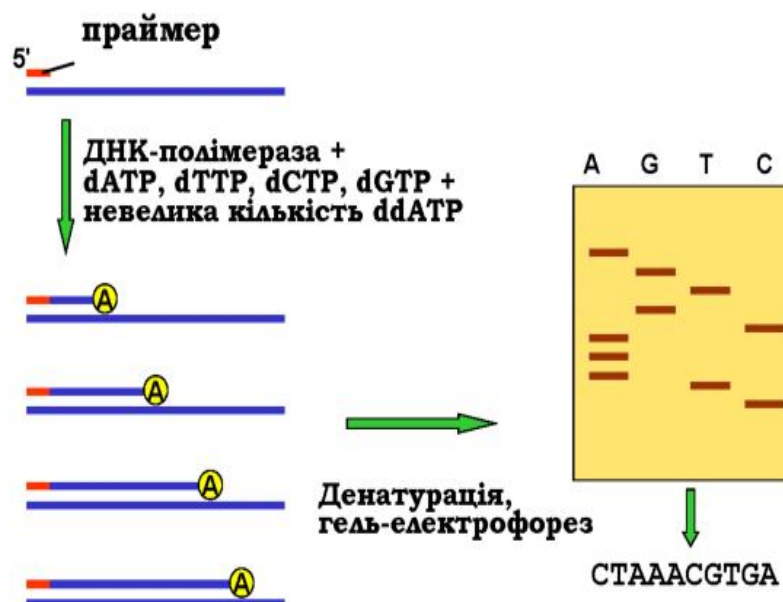


Рис. 11.1. Секвенування ДНК за Сангером: схема синтезу ДНК у присутності дидезоксиАТР (ліворуч). Аналогічна процедура для інших трьох дидезоксинуклеотидів дає набір одноланцюгових фрагментів, що аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в денатуруючих умовах (праворуч) - розподіл смуг дозволяє прочитати послідовність (праворуч внизу)

На лунки геля наносять також продукти синтезу в присутності інших дидезоксинуклеотидів. Як показано на рис. 11.1., після електрофорезу та візуалізації смуг із такого геля можна прочитати нуклеотидну послідовність.

Інший сучасний підхід у секвенуванні (так зване *піросеквенування*), який реалізується на автоматизованих секвенаторах, дозволяє встановити послідовність значно швидше, дешевше й при цьому не потребує ані клонування ДНК, ані електрофорезу. Одноланцюгові фрагменти, отримані з невеликої кількості геномної ДНК, пришиваються своїми 5'-кінцями до мікрокульок (один фрагмент на кульку) і піддаються ампліфікації за допомогою ПЛР. Кожна кулька з пришитими до неї ампліфікованими ідентичними фрагментами розміщується в мікрореакторі, де здійснюється ДНК-полімеразна реакція. Нуклеозидтрифосфати подаються в реакційну суміш імпульсно один за одним. Якщо нуклеотид певного типу виявляється комплементарним матриці та включається у зростаючий ланцюг, пірофосфат, що при цьому звільняється, залучається до низки хімічних реакцій, де остання реакція супроводжується випромінюванням світла (хемілюмінесценція). Світловий сигнал фіксується оптичною системою, і послідовність таких сигналів читається як нуклеотидна послідовність. Реакція здійснюється паралельно у 200 тис. мікрореакторів (для 200 тис. фрагментів, які перекриваються), що дозволяє встановити послідовність приблизно 200 млн пар основ за 4,5 години.

Зрозуміло, що далеко не завжди є потреба у визначенні послідовності ДНК, із якою має справу дослідник. Потужним засобом аналізу складних сумішей ДНК щодо наявності там специфічних елементів послідовності є *блот-гібридація на нітроцелюлозних фільтрах за Саузерном* (Edward Southern). Назва процедури, яку схематично зображено на рис. 11.2., походить від слова blotting (промакування): фрагменти ДНК розділюються за допомогою гель-електрофорезу (залишаючись невидимими в гелі), після чого на гель накладають нітроцелюлозний фільтр, а під та над цим "сендвічем" розміщують фільтрувальний папір і занурюють нижній шар паперу в лужний розчин. Під дією капілярних сил розчин піднімається до верхнього шару паперу, "захоплюючи" при цьому ДНК і переносячи її з гелю на нітроцелюлозу. Одночасно при цьому ДНК денатурується лугом. У результаті одноланцюгова ДНК опиняється на фільтрі – середовищі, придатному для подальшої гібридації, а сам фільтр є точною реплікою вихідного гелю. Далі проводять обробку фільтра зондом – одноланцюговим фрагментом.

ДНК певної послідовності, який містить радіоактивну мітку. Зонд гібридується з комплементарною ДНК у певних досі невидимих смугах, що можна зафіксувати за допомогою авторадіографії.

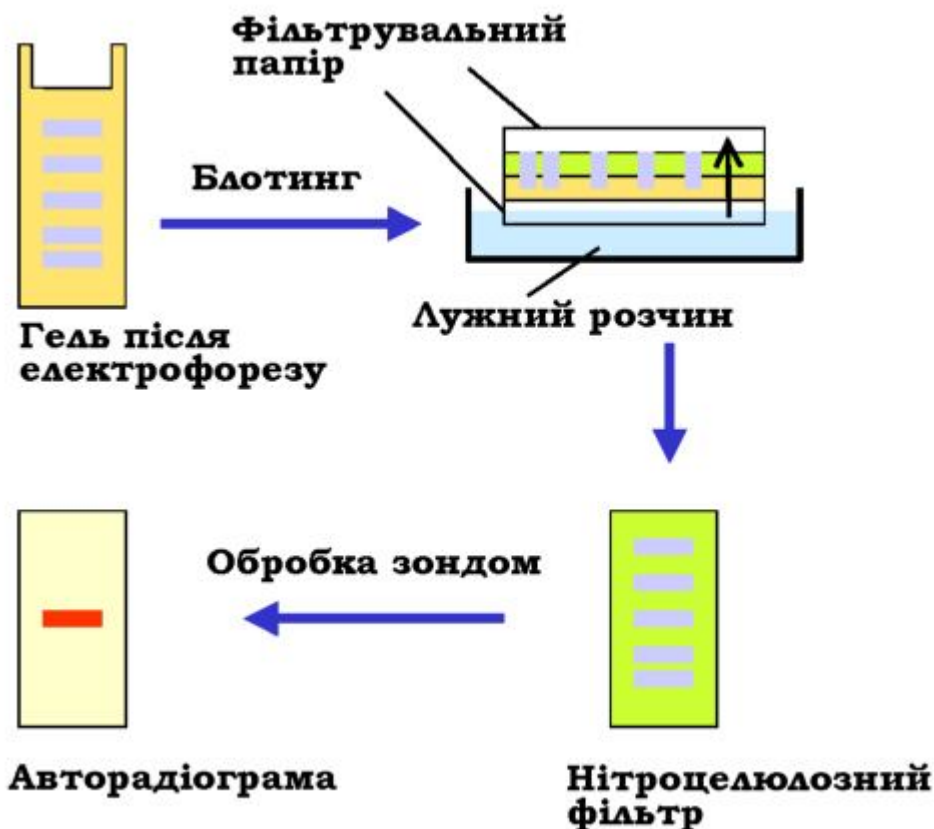


Рис. 11.2. Блот-гібридизація

У такий спосіб можна встановити, наприклад, присутність специфічних послідовностей ДНК у препаратах; наявність у геномі додаткових копій послідовності, що є гомологічними до вже відомої; присутність у невивченому геномі генів, гомологічних відомим генам тощо. Прикладом одного з численних застосувань Саузерн-блотингу є метод *фінгерпринтингу ДНК* (DNA fingerprinting). Метод базується на факті наявності в еукаріотичних геномах мінісателітних повторів – невеликих елементів послідовності, які тандемно повторюються в різних місцях геному кілька разів. Розподіл локусів за кількістю повторів є індивідуальним – так само, як відбитки пальців. З метою ідентифікації особи (чи особи – у криміналістиці, судових справах тощо) геномну ДНК обробляють рестриктазою, яка не має своїх сайтів усередині повтору. Фрагменти розділюються шляхом електрофорезу, здійснюється блотинг і гібридизація з радіоактивно міченим елементом послідовності мінісателіта. У результаті на авторадіограмі представлено специфічний для особи набір фрагментів різної довжини, тобто різної кількості повторів мінісателіта – своєрідний молекулярний відбиток (DNA fingerprint).

Нозерн-блотинг відрізняється від описаної процедури блотингу за Саузерном (назва nothern є просто жартівливою аналогією з буквальним значенням прізвища Саузерна) лише тим, що на гель для електрофорезу наноситься сумарний препарат виділеної мРНК. Гібридизація з міченим

фрагментом ДНК (наприклад, кДНК із бібліотеки клонів) дозволяє встановити наявність певної мРНК, тобто активність гена, у клітинах певного типу після дії активуючих/репресуючих факторів тощо, а також оцінити рівень цієї активності (концентрацію мРНК) за інтенсивністю забарвлення смуги на авторадіограмі.

Проаналізувати повну програму активності генів організму чи клітин певного типу за певних фізіологічних умов або у процесі розвитку, а також виконувати інші завдання, пов'язані з вивченням функціонування цілого геному, дозволяють методи, що базуються на використанні *ДНК-мікроарей* (DNA-microarrays) або ДНК-чипів (DNA-microchips).

Фрагмент ДНК довжиною до 1 тис. пар основ, для якого відомо його розташування в геномі, ампліфікується, і одноланцюгові продукти ампліфікації пришиваються до невеликої зони на поверхні предметного скла мікроскопа. Скло розміром 2 x 2 см – ДНК-мікроарей – покрито сіткою із приблизно 6 тис. таких мікроплям, кожна з яких містить ДНК певної геномної ділянки.

Одну з типових схем використання мікроарея зображено на рис. 11.3. Сумарна мРНК, отримана з клітин певного типу, використовується як матриця в реакції зворотної транскрипції. Поряд зі звичайними, до реакційної суміші додається флуоресцентний аналог одного з NTP. У результаті маємо препарат флуоресцентно міченої кДНК. Після гібридизації з цією кДНК мікроарей аналізують за допомогою флуоресцентного мікроскопа: наявність флуоресцентної плями свідчить про активність певного гена, інтенсивність флуоресценції – про рівень цієї активності.

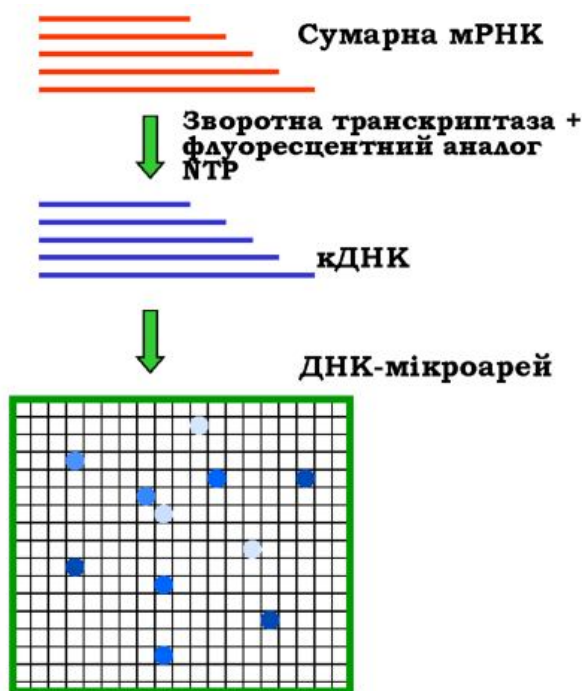


Рис. 11.3. Аналіз сумарної м-РНК за допомогою ДНК-мікроарея

Експерименти такого типу дозволяють з'ясувати зміни загальної програми експресії генів при змінах зовнішніх умов, активність різних генів у різних тканинах багатоклітинного організму, зміни активності груп генів у процесі диференціювання клітин.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Опишіть основні принципи полімеразної ланцюгової реакції.
3. Опишіть принципову схему експресії рекомбінантних білків у бактеріальних клітинах.

Контрольні запитання:

1. Що таке гібридизація? Як здійснюється гібридизація ДНК на нітроцелюлозних фільтрах?
2. Як здійснюють секвенування ДНК за Сангером?
3. Що таке блот-гібридизація? Яка різниця між Саузерн- і нозерн-блотингом?
4. Як здійснюють фінгерпринтинг ДНК?
5. Як аналізують активність геному за допомогою ДНК-мікроареїв?
6. Назвіть продукти, які можна отримувати за допомогою генетично змінених мікроорганізмів.

Лабораторна работа №12

Тема: Отримання за допомогою ПЛР ДНК, що відповідають кінцям молекули м-РНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомити з ПЛР та методами отримання ДНК (кДНК), що відповідають кінцям молекули м-РНК

За допомогою ПЛР можна отримувати комплементарні ДНК (кДНК), що відповідають 3' або 5'-кінцевим ділянкам специфічних інформаційних РНК (мРНК). Для позначення цього методу використовується скорочення RACE – швидка ампліфікація кінців кДНК рис. 12.1.

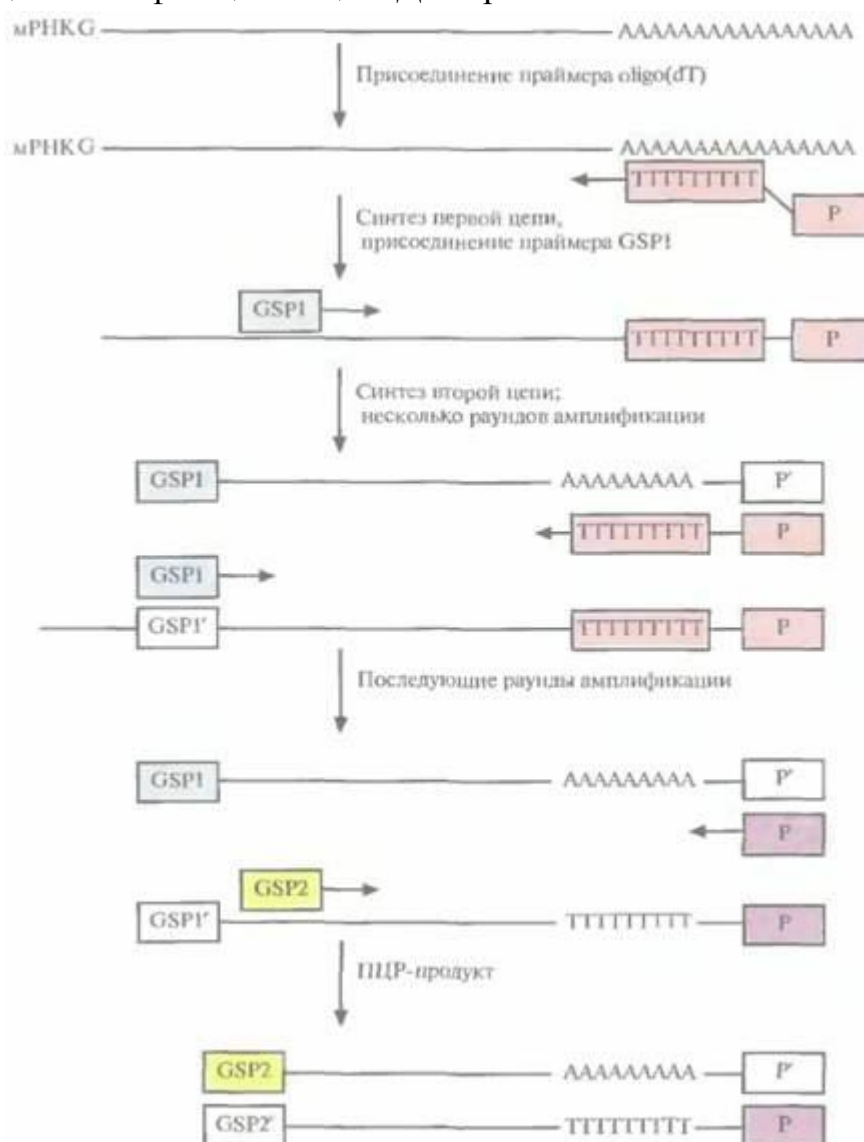


Рис. 12.1. ПЛР-ампліфікація кДНК, комплементарної 3'-концевої частини мРНК. Перший ланцюг кДНК утворюється в результаті зворотної транскрипції мРНК за участю *oligo* (dT) в якості праймера. Другий ланцюг синтезується на першому ланцюжку як на матриці за допомогою полімерази *Tag* і ген специфічного праймера (*GSP*₁). У наступних раундах ПЛР використовуються праймери *GSP*₂ і *P*.

Позначення 3'RACE і 5'RACE відносяться до ампліфікації кДНК, що відповідають відповідним кінцям мРНК. В обох випадках для проведення

ПЛР-ампліфікації потрібно знати нуклеотидну послідовність яка кодує області мРНК-мішені, щоб синтезувати генспецифічний праймер (GSP). У разі 3'RACE праймером для синтезу першого ланцюга Кднк служить oligo (dT) з приєднаним до нього другим праймером (P) (рис. 12.2). Oligo (dT) злучається з poly (A)-хвостом мРНК, і зворотна транскриптаза синтезує ланцюг, комплементарних мРНК. Другий ланцюг кДНК синтезується на першій за участю GSP, комплементарного який кодує області даної мРНК, за допомогою полімерази.

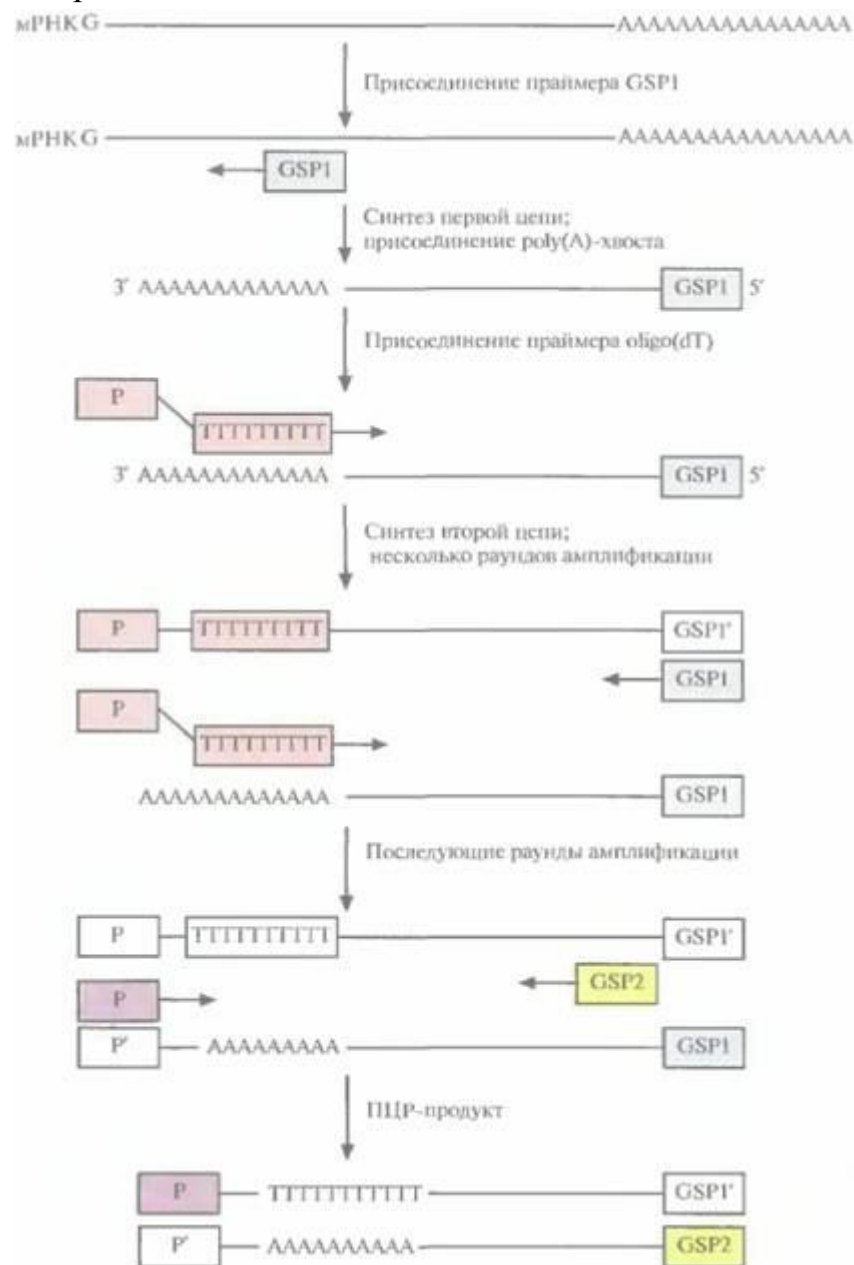


Рис. 12.2. ПЛР-ампліфікація кДНК, комплементарної 5'-кінцевій частині мРНК першого ланцюга, здійснювана зворотною транскриптазою, ініціюється праймером GSP.

Потім до цього ланцюга за допомогою кінцевої дезоксинуклеотидилтрансферази приєднується poly(A)-хвіст. Для синтезу другого ланцюга в якості праймера використовується oligo (dT). Проводять кілька раундів ампліфікації за участю зазначених праймерів, додають другі

праймери (GSP2 і Р) і отримують кДНК, що відповідає 5'-кінця мРНК рис. 12.3.

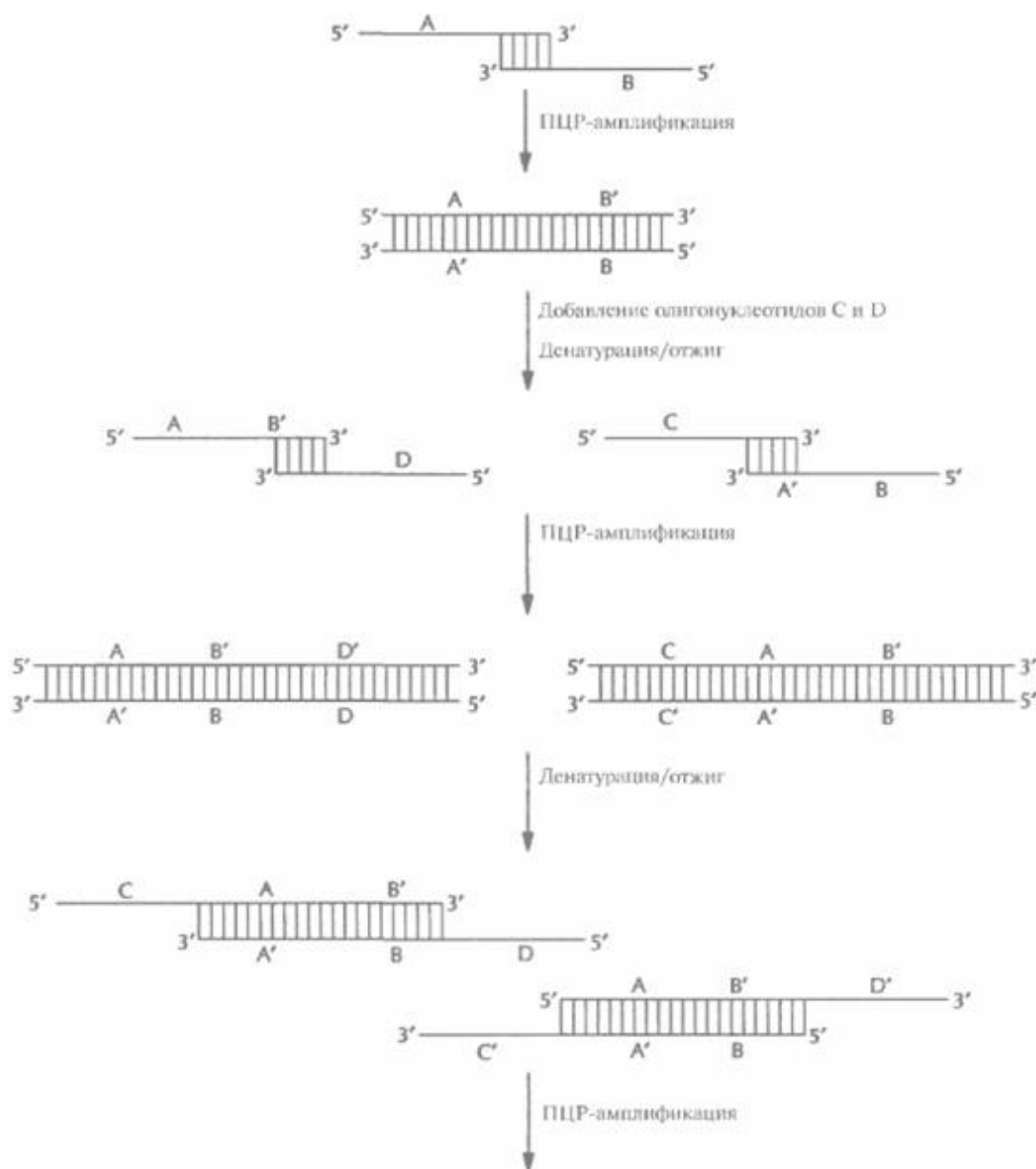


Рис. 12.3. Синтез генів за допомогою ПЛР.

Олігонуклеотиди які перекриваються (А і В) віджигають і добудовують утворений дуплекс з заглибленими 3'-гідроксильними кінцями. Дволанцюжкові молекули денатурують, додають в реакційну суміш другу пару олігонуклеотидів (С і D), що перекриваються з продуктами першого раунду ПЛР, і віджигають. Здійснюють другий раунд ПЛР, додають наступну пару олігонуклеотидів (Е і F), здійснюють третій раунд ПЛР і т. д. В результаті утворюється дволанцюжкова ДНК, ідентична шуканому гену. Однаковими буквами зі штрихом або без (А' і А, В і В' і т. д.) позначені комплементарні ділянки ДНК. Нуклеотидна послідовність кожного олігонуклеотида відповідає послідовності певних сегментів ДНК. *Tag*. По завершенні кількох раундів ПЛР, в яких використовувалися зазначені вище праймери, додають другу пару праймерів, які зв'язуються по сусідству з двома першими. Такі тісно розташовані праймери називаються внутрішніми.

Друга пара праймерів необхідна, оскільки без них не можна ампліфікувати повнорозмірну молекулу-мішень. Кінцевим ПЛР-продуктом є кДНК, відповідна 3'-кінця шуканої мРНК рис. 12.4.

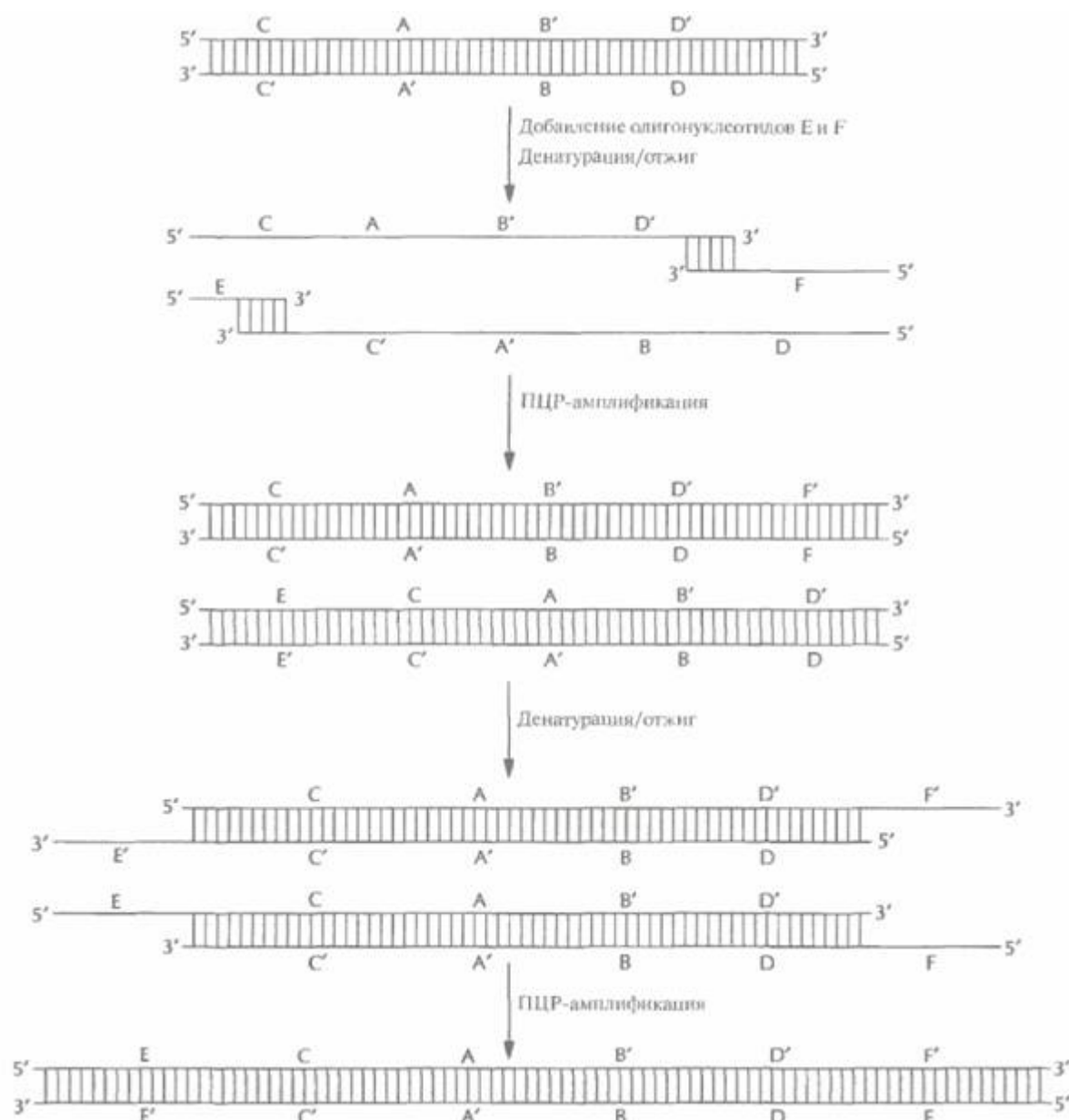


Рис.12.4. Синтез генів за допомогою ПЛР.

У разі 5'RACE праймером для синтезу першого ланцюга кДНК служить GSP (рис. 3). Новосинтезований ланцюг обробляють кінцевий дезоксирибонуклеотидилтрансферазою в присутності dATP. Цей фермент випадковим чином приєднує дезоксирибонуклеотиди до 3'-кінця ланцюга. Оскільки в даному випадку в реакційній суміші присутній тільки dATP, на цьому кінці з'являється ланцюжок аденінових залишків – poly(A)-хвіст. З ним злучається праймер P-oligo (dT) ініціює синтез другого ланцюга. Проводять обмежене число раундів ПЛР з зазначеними праймерами, а потім додають другі праймери і ампліфікують кДНК, що відповідає 5'-кінця мРНК.

RACE-метод широко застосовується по ряду причин. Зазвичай буває дуже важко виявити кДНК, відповідну мРНК, яка присутня в даній тканині в маленькій концентрації. За допомогою RACE-методу можна швидко отримати кДНК, що відповідає кінцевим ділянкам цієї мРНК, і при необхідності використовувати їх в якості зондів для скринінгу кДНК- і геномних бібліотек. Крім того, оскільки неповнорозмірні 3'-кінцеві фрагменти кДНК значно переважають над повнорозмірними, 5'RACE може заповнити відсутні 5'-кінцеві сегменти.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Опишіть ферменти, які беруть участь в отриманні ДНК (кДНК).
3. Опишіть методи отримання ДНК (кДНК), що відповідають кінцям молекули м-РНК

Контрольні питання:

1. Припустимо, що ваш новий ДНК-синтезатор має середню ефективність приєднання нуклеотидів 98,5%. Яким буде вихід продукту, якщо ви синтезуєте гібридаційний зонд довжиною 50 нуклеотидів?
2. Які дві стратегії хімічного синтезу гена довжиною 0,5 т. п. н. ви можете запропонувати? Якій з них ви віддаєте перевагу?
3. Що таке лінкер? Де він використовується?
4. Що таке дезоксинуклеотиди? Як з їх допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК?
5. Чому можна визначити нуклеотидну послідовність тільки одноланцюгової ДНК?
6. Як визначають нуклеотидну послідовність клонованої ДНК за допомогою векторної системи на основі фага M13?
7. Що таке «довга матриця», «коротка матриця», як змінюється співвідношення між ними зі збільшенням числа ПЛР-раундів?
8. Як синтезують гени за допомогою ПЛР?
9. Як «перетворити» кінці молекули мРНК в кДНК?

Лабораторна робота № 13

Тема: Отримання рекомбінантних бакуловірусів

МЕТА ЗАВДАННЯ: ознайомитися з великими ДНК-вмісними вірусами

13.1. Створення бакуловірусних векторів

Бакуловіруси – великі ДНК-вмісні віруси, що уражують безхребетних. В інфікованих клітинах бакуловіруси утворюють дві форми вірусного «потомства» (див. рис. 13.1):

- 1) віріони, здатні вивільнятися назовні її інфікувати інші клітини;
- 2) поліедри – білкові включення, в яких містяться вірусні частки.

Основою поліедрів є поліедрин – вірусний білок з молекулярною масою 29 кДа. Ген поліедрину контролюється дуже сильним промотором, його експресія розпочинається через 36-48 год. після зараження і продовжується до загибелі клітини-хазяїна (4-5 днів).



Рис. 13.1 Життєвий цикл бакуловірусів

Найчастіше для створення бакуловірусних векторних систем використовується вірус множинного ядерного поліедрозу *Autographa californica* (AcMNPV). Геномі цього вірусу – кільцева дволанцюгова ДНК розміром близько 128 т.п.н. Вірус здатен уражувати понад 30 видів комах. При роботі з рекомбінантним AcMNPV зазвичай використовують культуру клітин, отриману з гусениць *Spodoptera frugiperda*.

Експресійні бакуловірусні вектори створюються шляхом заміни гена поліедрину, від якого цикл розвитку вірусу не залежить, трансгеном. При створенні рекомбінантного вірусу безпосередньо з вірусним геномом, через його великий розмір, маніпуляції *in vitro* не проводяться. Конструювання рекомбінантного AcMNPV можна розділити на такі етапи:

1. Створення транспортного плазмідного вектора *E. coli* (див. рис. 13.2)
2. Трансфекція культури клітин комах ДНК AcMNPV.
3. Трансфекція культури клітин комах транспортним вектором.
4. Ідентифікація рекомбінантного вірусу.



Рис. 13.2 Фрагмент генетичної карти (експресійна касета) транспортного вектора для конструювання рекомбінантних бакуловірусів

Експресійна касета транспортного вектора містить промотор (P_{RH}) і термінатор (t_{RH}) транскрипції поліедрину і фланкована двома послідовностями ДНК AcMNPV, що в геномі вірусу знаходяться по обидва боки від цього гена. В клітині між транспортним вектором і вірусною ДНК може відбутися рекомбінація (подвійний кросингвер), в результаті якої ген поліедрину буде заміщений трансгеном. Кількість отриманого таким чином рекомбінантного вірусу в зонах лізису клітин не перевищує 1%. Збільшити частку рекомбінантного вірусу можна лінеаризацією генома AcMNPV в межах гена поліедрину перед трансфекцією, що зменшує його інфекційність. Кільцева форма відтворюється після рекомбінації

Для досягнення максимальної частоти отримання рекомбінантного вірусу (до 99%) застосовується методика з модифікованим геном вірусу, наведена на рис. 13.3.

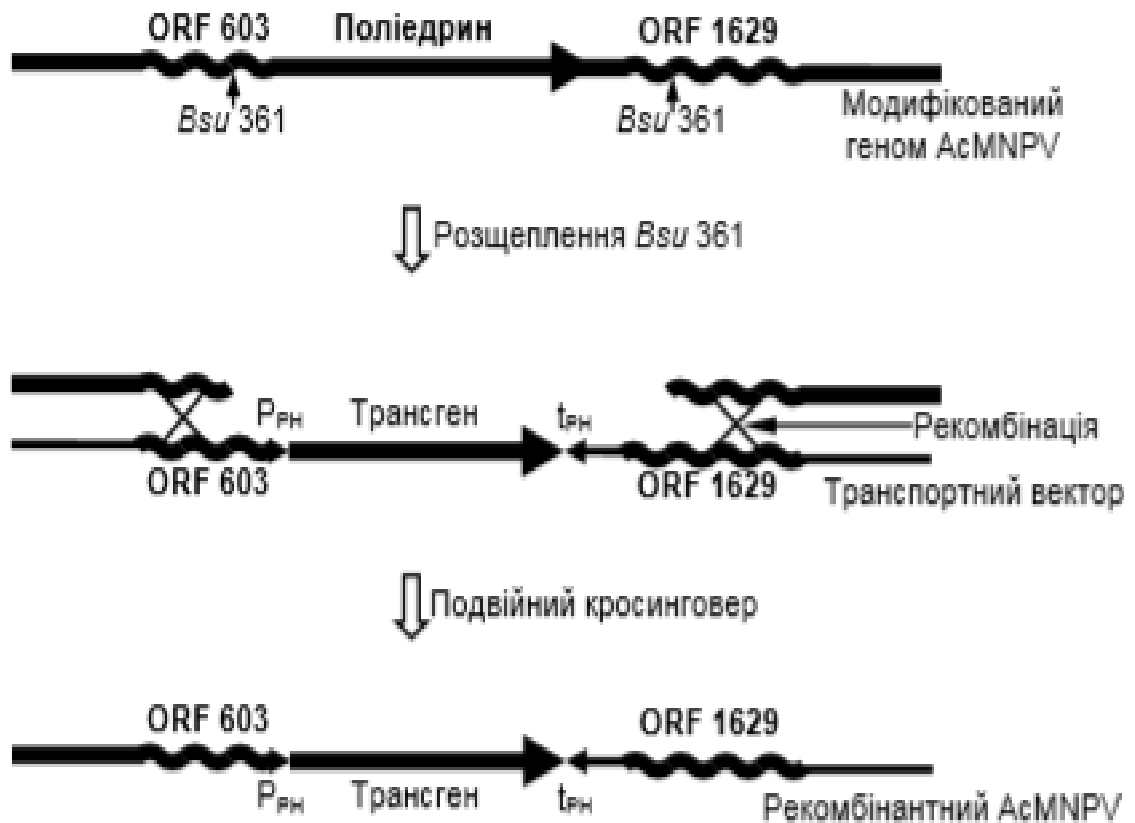


Рис. 13.3 Новітня технологія отримання рекомбінантного бакуловірусу

В геном AcMNPV дикого типу, без порушення рамки зчитування, по боках гена поліедрину введено два унікальних сайти для ендонуклеази *Bsu* 361. Один з них розташований у межах гена 603 (*ORF* 603), інший – в одному з генів групи 1629 (*ORF* 1629), необхідних для реплікації вірусу. Після видалення фрагмента, обмеженого сайтами рестрикції *Bsu* 361, відновлення реплікативних властивостей проходить після рекомбінації (подвійного кросинговера) з транспортним вектором, що містить повний ген 603 і всю групу 1629. При цьому вставка може містити окрім трансгена (під контролем регуляторів транскрипції поліедрину) у разі потреби ще й маркерний ген (на рис. 13.3 – не наведений).

Відмінність бакуловірусних від інших експресійних векторних систем:

1. Високий рівень експресії гетерологічних генів порівняно з іншими еукаріотичними системами експресії, особливо для внутрішньоклітинних білків. У багатьох, випадках рекомбінантні білки є розчинними та легко репродукуються в клітинах комах на пізніх стадіях інфекції, коли синтез білків клітини-хазяїна є пригніченим.

2. Можна досягти експресії гетероолігомерних білкових комплексів одночасним інфікуванням клітин двома або більше вірусами, також інфікуванням клітин рекомбінантними вірусами, що містять дві чи більше експресійні вставки.

3. Бакуловіруси мають вузьке коло організмів-хазяїна, обмежене видами безхребетних. Ці віруси є більш безпечними при використанні порівняно з вірусами ссавців, адже вони неінфекційні для хребетних. Більшість чутливих клітинних ліній комах не трансформуються під дією патогенних або інфекційних вірусів та можуть зберігатися при мінімальних умовах утримання.

4. Не виникає необхідності у використанні допоміжних (хелперних) ліній клітин або допоміжних (хелперних) вірусів, оскільки геном бакуловірусів містить генетичну інформацію, необхідну для розмноження у багатьох клітинних лініях та личинках різних видів комах.

5. Клітинні лінії, які зазвичай використовують для трансформації бакуловірусними векторами, (наприклад, *Spodoptera frugiperda*), добре зростають у суспензійних культурах, що дає можливість отримувати рекомбінантний білок у великій кількості (у великомасштабних біореакторах).

13.2. Створення гібридних векторів на основі бакуловірусів і плазмід

Для полегшення роботи з геномами бакуловірусів було створено гібридний вектор, усі генно-інженерні операції з яким можна проводити на *E.coli*.

Бакміда – човниковий вектор для *E.coli* і клітин комах, створений на основі генома бакуловірусів.

Створення бакміди методично мало відрізняється від отримання рекомбінантного вірусу (див, рис. 13.4). Ген поліедрину в результаті подвійного кросинговера заміщується фрагментом плазмід *E.coli*.

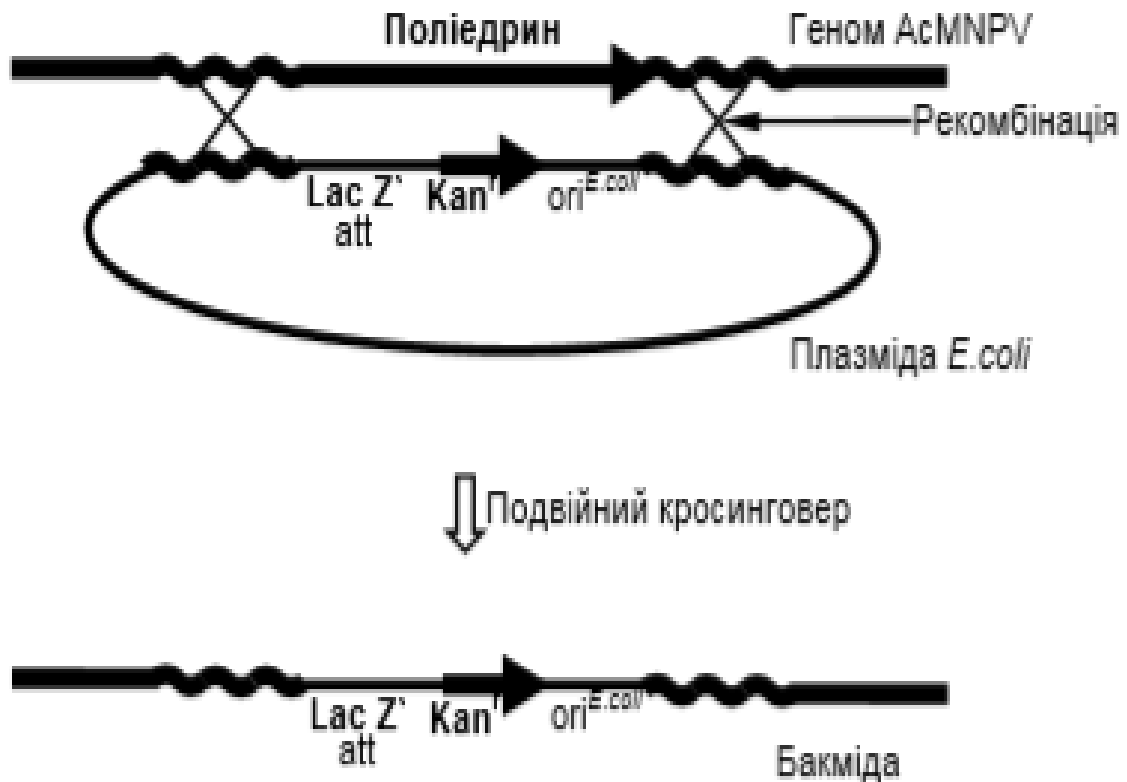


Рис. 13.4 Конструювання бакмідного вектора

Бакміда, схему конструювання якої наведено на рис. 13.4, містить фрагмент невеликої плазмід, що включає ген *Lac Z'*, з інтегрованим без порушення рамки зчитування сайтом рекомбінації (*att*), маркерний ген резистентності до канаміцину (*Kan^r*) і сайт ініціації реплікації *E.coli* (*ori^{E.coli}*). Система експресії за використання наведеної бакміди має назву *Vac-to-Vac*.

Отримання рекомбінантної бакміди в системі *Vac-to-Vac* базується на сайт-специфічній транспозиції експресійної касети з порушенням гена *Lac Z'* (рис. 13.5).

Культуру бактеріальних клітин, яка містить бакміду трансформують двома плазмідами: донорською і допоміжною. Донорська плазмід містить маркерний ген *Amp^r* і обмежений правим та лівим *att*-сайтами (*attR* і *attL*) фрагмент, що включає трансген під контролем регуляторів транскрипції поліедрину (*Ppн* і *tpн'*), а також ще один маркер *Gm^r*. Допоміжна плазмід має

маркерний ген *Tet^r*. Двічі трансформовані (обомі плазмідами) клітини відбирають за стійкістю одночасно до ампіциліну і тетрацикліну.

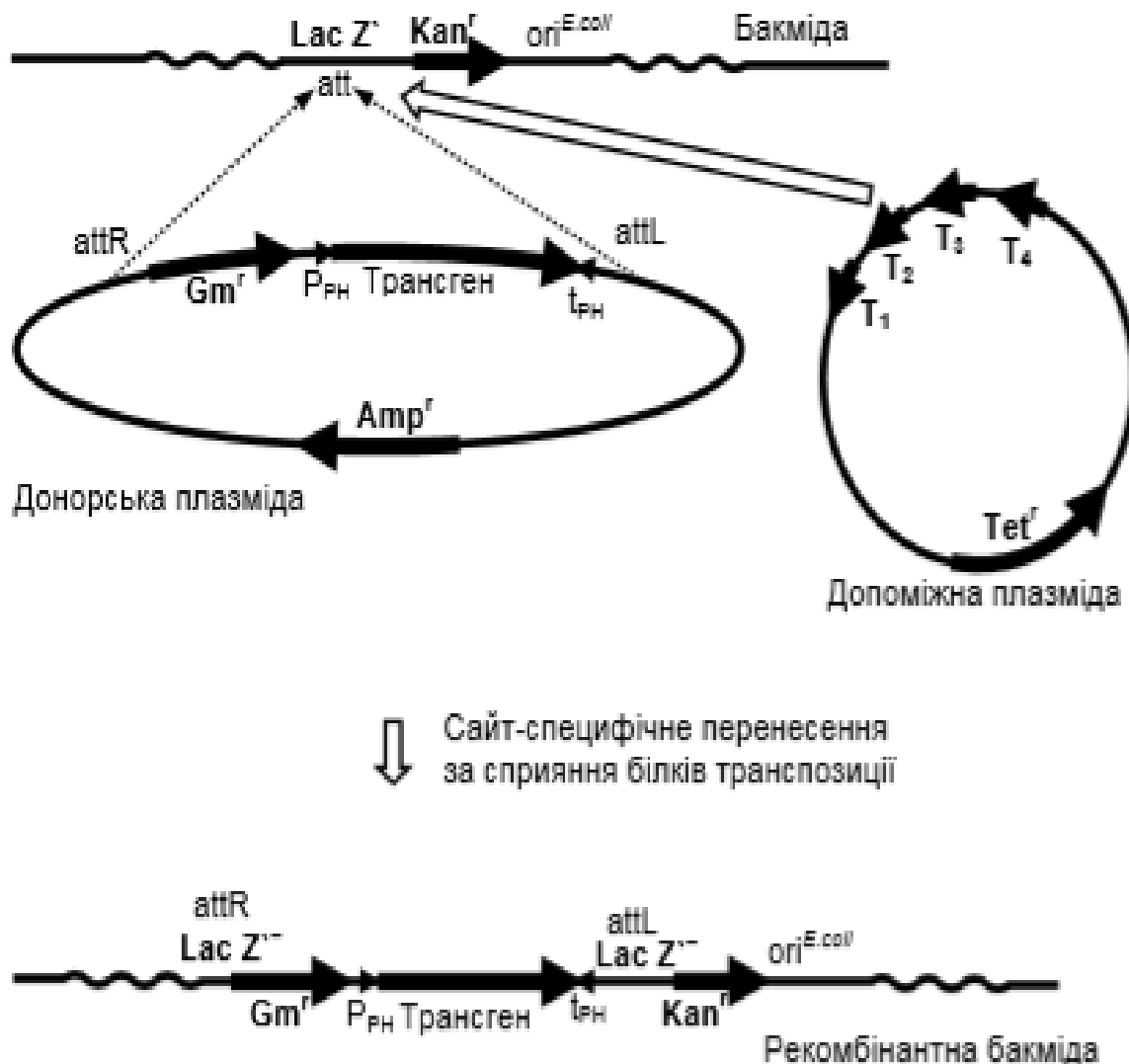


Рис. 13.5 Отримання рекомбінантної ДНК

Інтеграція фрагмента донорської плазміди відбувається за сприяння білків транспозиції, що кодуються допоміжною плазмідом (гени *T1-T4*). Селективний відбір клітин, які містять рекомбінантні бакміди, можна проводити на середовищі з гентаміцином, ПТГ та X-Gal за порушенням ефекту α -комплементації в гені *Z lac*-оперона *E.coli*.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте схему життєвого циклу бакуловірусів.
3. Опишіть етапи створення рекомбінантного AcMNPV.
4. Замалуйте фрагмент генетичної карти транспортного вектора для конструювання рекомбінантних бакуловірусів.

5. Замалюйте схему та дайте пояснення новітньої технології рекомбінантного бакуловіруса.
6. Замалюйте схему та дайте пояснення конструювання бакмідного вектора.
7. Замалюйте схему та дайте пояснення отримання рекомбінантної бакміди.

Контрольні питання:

1. Назвіть відмінності векторів, створених на основі бакуловірусів від інших експресійних векторів.
2. Перелічить етапи створення рекомбінантного бакуловірусу.
3. Як можна досягти максимальної частоти отримання рекомбінантного бакуловірусу?
4. У чому «універсальність» бакмідних векторів?
5. Яким чином отримують рекомбінантні бакміди?

Лабораторна робота № 14

Тема: Експресивні вектори для роботи з клітинами ссавців

МЕТА ЗАНЯТТЯ: вивчити застосування векторів для роботи з клітинами ссавців

Отримання рекомбінантних білків з використанням генетично модифікованих культур клітин ссавців доцільне лише в тому випадку, якщо біосинтез аутентичного білка можливий виключно у цих клітинах. В інших випадках варто використовувати дешевші системи експресії.

14.1. Конструювання векторів на основі вірусу SV40

SV40 (*Simian virus 40*) – це невеликий поліомавірус, здатний реплікуватися в культурі клітин нирки мавпи, продукуючи 10^4 - 10^5 віріонів на клітину. Інші культури клітин, зокрема гризунів (мишей пацюків), цей вірус може онкотрансформувати.

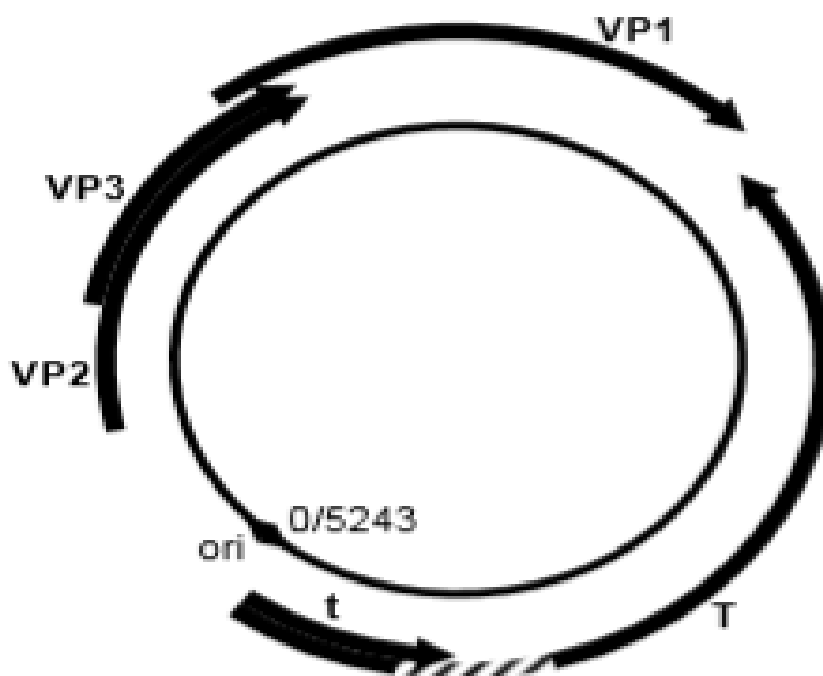


Рис. 14.1 Експресійна карта генома SV40

Геном вірусу – кільцева дволанцюгова ДНК розміром 5243 п.н. (див. рис. 14.1) кодує два ранні білки – великий (*T*) і малий (*t*) Т-антигени – та три пізні структурні білки (*VP1*, *VP2*, *VP3*). Однією з функцій великого Т-антигену є ініціація реплікації ДНК SV40.

На основі SV40 сконструйовано три типи векторів:

1) трансдукуючі SV40 вектори – реплікуються в клітинах-хазяях (культура клітин нирки африканської зеленої мартишки – (*Cercopithecus aethiops*) і пакуються у віріони;

2) плазмідні SV40 вектори – реплікуються в клітинах-хазяях, але не здатні пакуватися у віріони;

3) пасивні трансформуючі SV40 вектори – нездатні ні реплікуватися, ні пакуватися у віріони; це молекули ДНК, до складу яких введено невеликі сегменти генома SV40, що сприяють експресії генів.

При створенні трансдукуючих векторів необхідно виконати такі умови:

1) вектор повинен містити сегмент розміром близько 300 п.н., який має в собі *ori*-сайт;

2) сумарна довжина векторної ДНК мусить становити 3,9-5,3 т.п.н;

3) у клітині мають бути присутні Т-антиген та структурні білки *VP1*, *VP2*, *VP3*

Ємність трансдукуючих векторів не перевищує 2,5 т.п.н. Їх створюють шляхом заміщення або ранніх або пізніх генів. Білковий продукт втраченого гена постачається хелперним вірусом чи самою клітиною-хазяїном.

У першому випадку культура клітин трансфікується ДНК рекомбінантного вірусу і заражається вірусом-помічником. Після лізису клітин рекомбінантний вірус виділяється із суміші.

Використання хелперних культур клітин не потребує додаткового розділення рекомбінантного вірусу і помічника. Як допоміжні використовуються COS-клітини, які походять від культури клітин CV-1 нирки африканської зеленої мартишки і містять в геномі ген *A SV40*. У COS-клітинах може реплікуватися будь-яка кільцева ДНК, що містить *ori*-сайт SV40. Це відкриття започаткувало створення плазмідних SV40 векторів.

Підґрунтям існування плазмідних векторів є:

1) наявність фрагмента розміром близько 300 п.н., який містить *ori*-сайт SV40;

2) у клітині мусить бути присутній Т-антиген.

Плазмідні SV40 вектори не мають обмеження в розмірі вставки, і в більшості випадків це човникові вектори. Всі генно-інженерні маніпуляції з ними здійснюють у клітинах *E.coli*, а клітини ссавців, переважно мавп, використовуються для отримання білкового продукту трансгена. У клітині накопичується понад 10^5 копій рекомбінантної плазміди, проте плазмідні вектори нестабільні, нездатні довго зберігатися в трансфікованих клітинах. Тому ці вектори використовують для спостереження тимчасової експресії.

З частотою 10^{-5} - 10^{-3} плазмідні SV40 вектори можуть інтегруватися в геном хазяїна, зумовлюючи стабільну трансформацію.

Плазмідні SV40 вектори (див. рис. 14.2) містять фрагмент плазміди *E.coli*, часто pBR322, що несе прокаріотичний репліатор (*Ori^{E.coli}*) і селективний маркер (*Amp^r*), при цьому необхідно враховувати, що область 2063-2533 pBR322 вміщує «отруйну» послідовність, яка перешкоджає реплікації човникових векторів у клітинах ссавців.

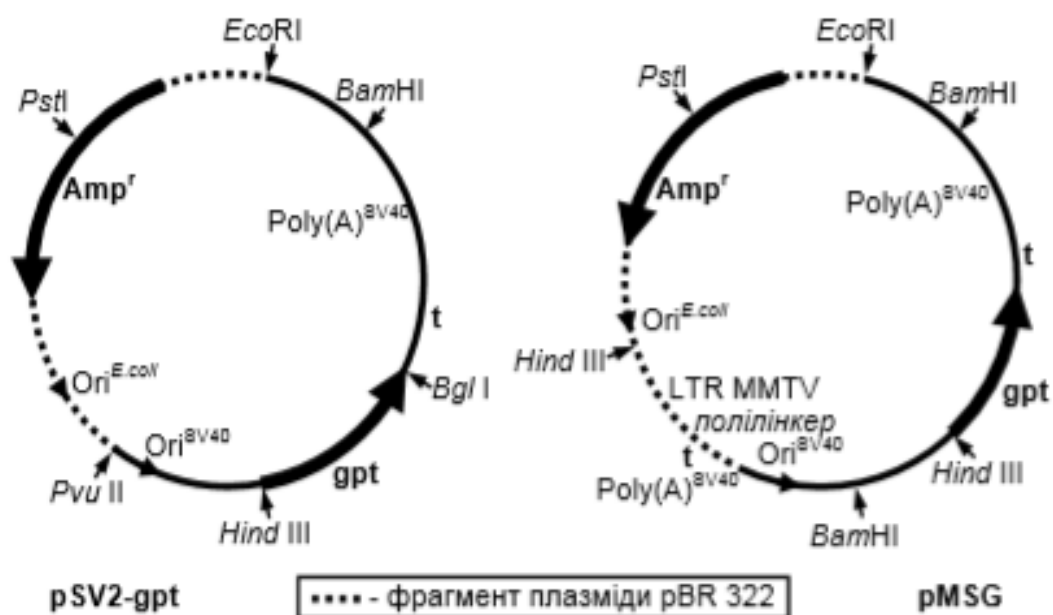


Рис 14.2 Генетичні карти плазмідних SV40 векторів pSV2 (5,2 т.п.н) та pMSG (7.63 т.п.н.)

Фрагмент вірусного генома плазмідного SV40 вектора містить, як правило, ранню експресійну касету SV40, яка включає промотор гена *A*, розташований поруч з еукаріотичним реплікатором (Ori^{SV40}), малий т-інтрон (*t*) і термінатор транскрипції ($Poly(A)^{SV40}$). Як еукаріотичні маркери переважно використовуються гени *gpt* і *neo*.

Найпростішим плазмідним вектором є pSV2, наведений на рис. 14.2, здатний реплікуватися, окрім *E.coli*, лише в COS-клітинах. Його варіант pSV3 містить нуклеотидну послідовність, що несе інформацію про Т-антиген, і тому здатен реплікуватися в будь-яких клітинах мавпи.

Для отримання активного рекомбінантного білка зручно використовувати вектор з додатковою експресійною касетою, такий як pMSG, наведений на рис. 14.2. Додаткова експресійна касета складається з кінцевого повтору, включаючи промотор, вірусу пухлини молочної залози миші (*LTR MMTV*): полілінкера, т-інтрона (*t*) і термінатора транскрипції ($Poly(A)^{SV40}$).

І пасивні трансформуючі, і плазмідні вектори є переважно човниковими. Суттєвих відмінностей між векторами цих типів не існує. Навіть якщо вектор містить реплікатор SV40, реплікація не відбудеться за відсутності в клітині Т-антигену. Плазмідний вектор pSV2 у будь-якій культурі клітин, за винятком COS, можна розглядати як пасивний, реплікація і спадкова передача його можлива лише за умови інтеграції в геном хазяїна.

Інший тип пасивних трансформуючих векторів – вектори, позбавлені еукаріотичного реплікатора. У таких векторах промотор SV40 заміщується іншим, наприклад, сильнішим промотором вірусу саркоми Рауса, локалізованим в його *LTR*.

Маркерні гени, що використовуються у векторах такого типу: *gpt*, *neo*, *tk*-ген тимідинкінази вірусу герпесу.

14.2. Створення векторів на основі вірусу папіломи великої рогатої худоби

Паліломавіруси - це високоспецифічні ДНК-вмісні віруси хребетних, включаючи людину, що викликають утворення доброякісних пухлин епітеліальної тканини.

Геном вірусу папіломи великої рогатої худоби (ВРХ) – це кільцева дволанцюгова молекула ДНК розміром 7954 т.п.н. (див. рис. 14.3), яка містить гени онкотрансформації, пізні гени структурних білків та невелику некодуючу ділянку.

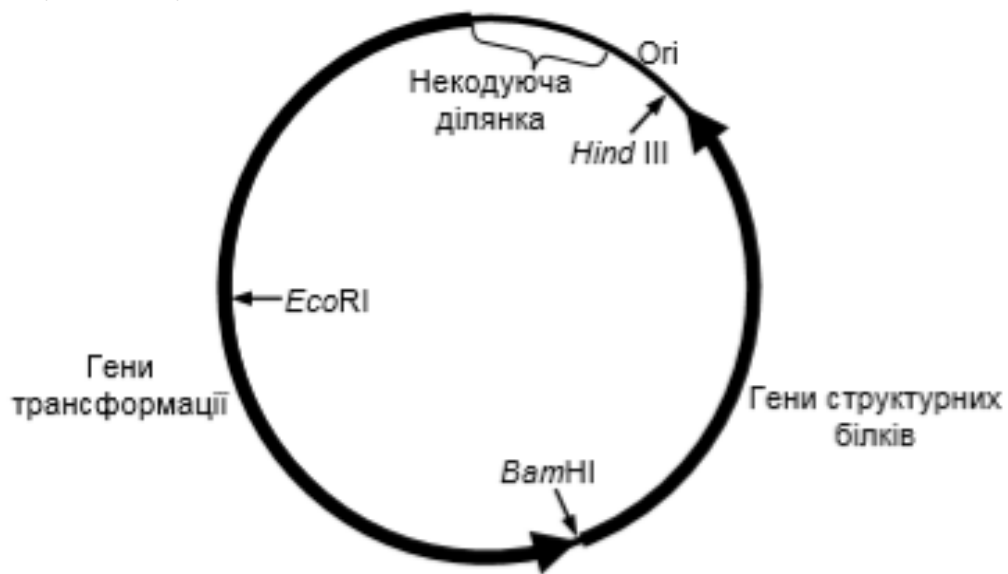


Рис. 14.3 Схематичне зображення генетичної карти вірусу папіломи великої рогатої худоби

Вектори, створені на основі ВРВ, мають ряд ознак пов'язаних з особливістю самого вірусу:

1) векторна ДНК реплікується у вигляді стабільної плазміди в клітинах гризунів і багатьох клітинах великої рогатої худоби (близько 10^2 копій на клітину);

2) віріони не утворюються через те, що синтез капсидного білка відбувається лише у термінально диференційованих епідермальних клітинах;

3) інфіковані клітини не гинуть, а вектор може передаватися дочірнім клітинам;

4) вектори здатні трансформувати клітину, якщо збережені гени трансформації; трансформовані клітини утворюють фокуси (колонії клітин, які здіймаються над моношаром);

5) стабільна трансформація клітини не пов'язана з інтеграцією вектора в геном.

Створюють вектори шляхом заміщення генів структурних білків вставкою. Човникові BPV вектори містять фрагмент плазмиди pBR 322 з релікатором (*Ori^{E.coli}*) і маркерним геном (*Amp^r*) (див. рис 14 4), який перед трансфекцією еукаріотичних клітин може бути вирізаний за допомогою рестриктази *Hind* III. Це сприяє видаленню «отруйної» послідовності.

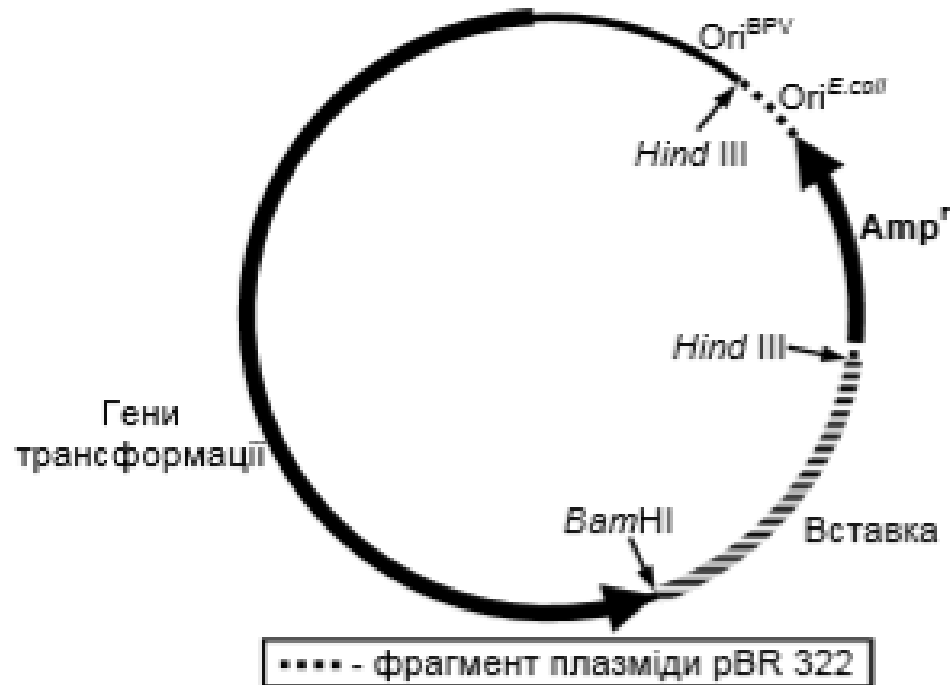


Рис. 14.4 Схематичне зображення генетичної карти плазмідного вектора, створеного на основі вірусу папіломи великої рогатої худоби

Розмір вставки необмежений. Вона містить стандартну експресійну касету і може містити стандартний еукаріотичний селективний маркер: *gpt*, *neo* тощо. Присутність маркера спрощує процес ідентифікації трансформантів.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте експресійну карту генома SV40.
3. Опишіть і дайте пояснення векторам створених на основі SV40.
4. Замалуйте схему та дайте пояснення генетичних карт плазмідних SV40 векторів pSV2 та pMSG.
5. Замалуйте схему та дайте пояснення генетичної карти вірусу папіломи великої рогатої худоби.
6. Опишіть ознаки векторів, що створені на основі вірусу BPV.
7. Замалуйте схему та дайте пояснення генетичної карти плазмідного вектора, створеного на основі вірусу папіломи великої рогатої худоби

Контрольні питання:

1. В яких випадках експресію трансгена доцільно проводити в клітинах ссавців?

2. Яким чином створюються трансдукуючі SV40 вектори?
3. Охарактеризуйте плазмідні SV40 вектори.
4. Які ознаки мають пасивні трансформуючі SV40 вектори?
5. Назвіть особливості векторів, створених на основі вірусу папіломи великої рогатої худоби.

Лабораторна робота № 15

Тема: Кількісний аналіз експресії мРНК певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі

МЕТА ЗАНЯТТЯ: визначити рівень експресії певного гена за допомогою ПЛР у реальному часі.

Матеріали та реактиви. Виділені препарати нуклеїнових кислот, складові комерційних наборів для синтезу кДНК і ПЛР, $3\text{MCH}_3\text{COONa}$, 96 % етанол.

Обладнання. Самплери від 2 до 20 мкл та від 20 мкл до 200 мкл, одноразові еппендорфи на 1,5 мл та «наконечники», штативи для еппендорфів, перманентний маркер, ПЛР-бокс під УФ-лампю (бажано), центрифуга для еппендорфів, стріпи (специфічні, з'єднані одна з одною мікропробірки з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР), програмований детектуючий ампліфікатор (термоциклер), комп'ютер із входом до мережі інтернет, одноразові рукавички без пудри, посудини для скидання відпрацьованих «наконечників» та еппендорфів.

Хід роботи. Перед кількісним аналізом експресії мРНК певного гена з а допомогою ПЛР у реальному часі необхідно підібрати праймери, які будуть специфічними до послідовності гена, який буде аналізуватися.

При підборі оптимальної пари праймерів (прямого й зворотного) зручно використовувати програмне забезпечення, наприклад, «GeneRunner» від «Hastings Software Inc.», «Primer-BLAST» (також за її допомогою можна перевірити специфічність обраної пари праймерів до заданої послідовності), доступний на сайті NCBI. Дуже хороші праймери підбирає програма «Primer Express» («Applied Biosystems»), якщо ставити температуру плавлення $58\text{--}60^\circ\text{C}$. Однак ця програма задає дуже високі критерії пошуку, в результаті чого вона часто не може підібрати жодної пари до заданої послідовності. Гарні результати виходять також із праймерами, підібраними за допомогою «Vector NTI».

Однак працювати має сенс тільки з праймерами, яким програма присвоює максимальний рейтинг (при стандартних умовах пошуку він 143 дорівнює 171). Програму «Primer3» використовувати не рекомендується – у неї занадто м'які критерії відбору. Підбір послідовностей праймерів для кількісного аналізу експресії мРНК гена *Ptgs2* (COX2 – циклооксигеназа 2) за допомогою ПЛР у реальному часі. Перш за все, на сайті NCBI знайти послідовність гена *Ptgs2* для щура (*Rattus norvegicus*).

Кількісна ПЛР у реальному часі. Кількісну ПЛР у реальному часі проводити за допомогою комерційного набору. Вийняти реактиви (окрім ферментів – дотримуватись правил зберігання) із морозильної камери (-20°C),

помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати. У стерильний еппендорф (у ньому буде стоковий розчин) послідовно додати на льоду наступні компоненти (кількість кожного з них помножити на кількість різних проб РНК, що будуть у ЗТ-ПЛР, наприклад, якщо 4 проби, кожен компонент множити на 4): 10,5 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 12,5 мкл (2X) суміші, яка містить буферний розчин для ПЛР як із KCl (100 mM трис-НСl, рН 8,8 при 25°C, 500 mM KCl, 0,8 % нонідет Р40), так і з $(NH_4)_2SO_4$ (750 mM трис-НСl, рН 8,8, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % твін 20), 1 од. Таq ДНК полімерази, по 200 mM кожного дНТФ, до 2,5 mM $MgCl_2$, флуоресцентний барвник – SYBR Green I, пасивний референсний барвник – ROX; по 1 мкл прямого й зворотного праймерів (0,4 мкмоль/л). 23 мкл суміші (або по 23 мкл суміші у випадку декількох проб РНК) додати в стріп/стріпи. У кожен стріп додати 2 мкл (200 нг) синтезованої кДНК (не більше 10 % від фінального об'єму реакційної суміші), а у випадку негативного контролю реакції – 2 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, обережно перемішати суспендуванням, запобігаючи утворенню бульбашок. Кінцевий об'єм реакційної суміші – 25 мкл. ЗТ-ПЛР проводити за таких, рекомендованих фірмою-виробником, 149 температурних умов: синтез кДНК 50 °C – 30 хв; ініціююча денатурація 95°C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; гібридизація праймерів 50°C – 35 с; добудова ланцюга 72°C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C – 5 хв на ампліфікаторі. Одностадійна кількісна ЗТ-ПЛР.

Синтез кДНК і кількісна ПЛР у реальному часі проводити в тій же самій пробірці за допомогою комерційного набору. Переосадити по 100 мкг (2 мкл) виділених зразків РНК (як описано вище). Вийняти реактиви (окрім ферментів – дотримуватись правил зберігання. Їх не розморозувати заздалегідь, а виймати з морозильної камери безпосередньо перед внесенням у реакційну суміш із морозильної камери (-20 °C), помістити їх на лід, розморозити й обережно перемішати.

У стерильний еппендорф (у ньому буде стоковий розчин) послідовно додати на льоду наступні компоненти (кількість кожного з них помножити на кількість різних проб РНК, що будуть у ЗТ-ПЛР, наприклад, якщо 4 проби, кожен компонент множити на 4): 7 мкл автоклавованої охолодженої H_2O dist, 12,5 мкл 2x суміші, яка містить буферний розчин для ЗТ-ПЛР, 1 од. Таq ДНК полімерази, по 1 mM кожного дНТФ, до 3 mM $MgCl_2$, флуоресцентний барвник – SYBR Green I, пасивний референсний барвник – ROX (фінальна концентрація – 500 nM); 1,25 мкл RT Enhancer (стабілізує ревертазу й підвищує її чутливість); по 1 мкл прямого й зворотного праймерів (0,4 мкмоль/л); 0,25 мкл суміші ферментів (містить ревертазу і рибонуклеазний інгібітор). 23 мкл суміші (або по 23 мкл суміші у випадку декількох проб РНК) додати в стріп/стріпи (специфічні з'єднані одна з одною мікропробірки

з оптично прозорими плоскими кришками для ЗТ-ПЛР). У кожен стріп додати 2 мкл (від 1 пг до 100 нг) певної проби РНК (у випадку негативного контролю реакції – 2 мкл автоклавованої охолодженої H₂O dist). Фінальний об'єм реакційної суміші – 25 мкл.

ПЛР у реальному часі проводити за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50°C – 30 хв, ініціююча денатурація 95°C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; 150 гібридизація праймерів 50°C – 35 с; добудова ланцюга 72°C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C – 5 хв на ампліфікаторі. У реакціях використовувати, наприклад, такі послідовності праймерів: для *Ptgs2* (COX2 – циклооксигеназа 2) прямий – TGCTGTTCCAACCCATGTCA та зворотний – TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; *Slc9a3* (NHE3 – електронейтральний натрій-водневий транспортер 3) прямий – CCTGATGGGCGAACTGAAGA та зворотний – GCAGTGACTCCCCAAAACA; для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього (ендогенного) контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Відтворюваність результатів ампліфікації перевірити в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитується флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будується крива плавлення (25–95°C) для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції.

Специфічність отриманих продуктів ПЛР також перевірити за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в 2 % агарозному гелі, в 0,5 кратному TBE буферному розчині 1,5 год при 5 В/см (див. пункт 4). Оформлення результатів експерименту: у зошиті зробити висновок про успішність отримання ПЛР-продукту (чи було отримано після реакції значення порогових циклів – СТ тощо); після аналізу кривих плавлення (відсутність додаткових піків із неспецифічною температурою плавлення) та гелелектрофорезу (відсутність неспецифічних додаткових смуг в гелі, димерів праймерів тощо) зробити висновок про специфічність отриманих продуктів ПЛР.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Ретельно проглянути інформацію стосовно гена на сторінці (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29527>)
3. Записати синтез кДНК і кількісну ПЛР у реальному часі

Контрольні питання:

1. Яке програмне забезпечення використовують при підборі оптимальної пари праймерів?
2. За яких температурних умов проводять ПЛР у реальному часі ?
3. Як перевіряють специфічність отриманих продуктів ПЛР?
4. Як перевірити відтворюваність результатів ампліфікації?

Лабораторна робота № 16

Тема: Генетична трансформація *Bacillus subtilis*

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомити з особливостями трансформації бактерій

Трансформація бактерій – процес перенесення ДНК, ізольованої із одних клітин в інші. Трансформація була відкрита Ф. Гріффітсом у 1928 році на дослідах з пневмококами.

При трансформації одна бактерія (реципієнт) поглинає ізольовану ДНК іншої бактерії (донора) (рис. 16.1).

Бактеріальна хромосома

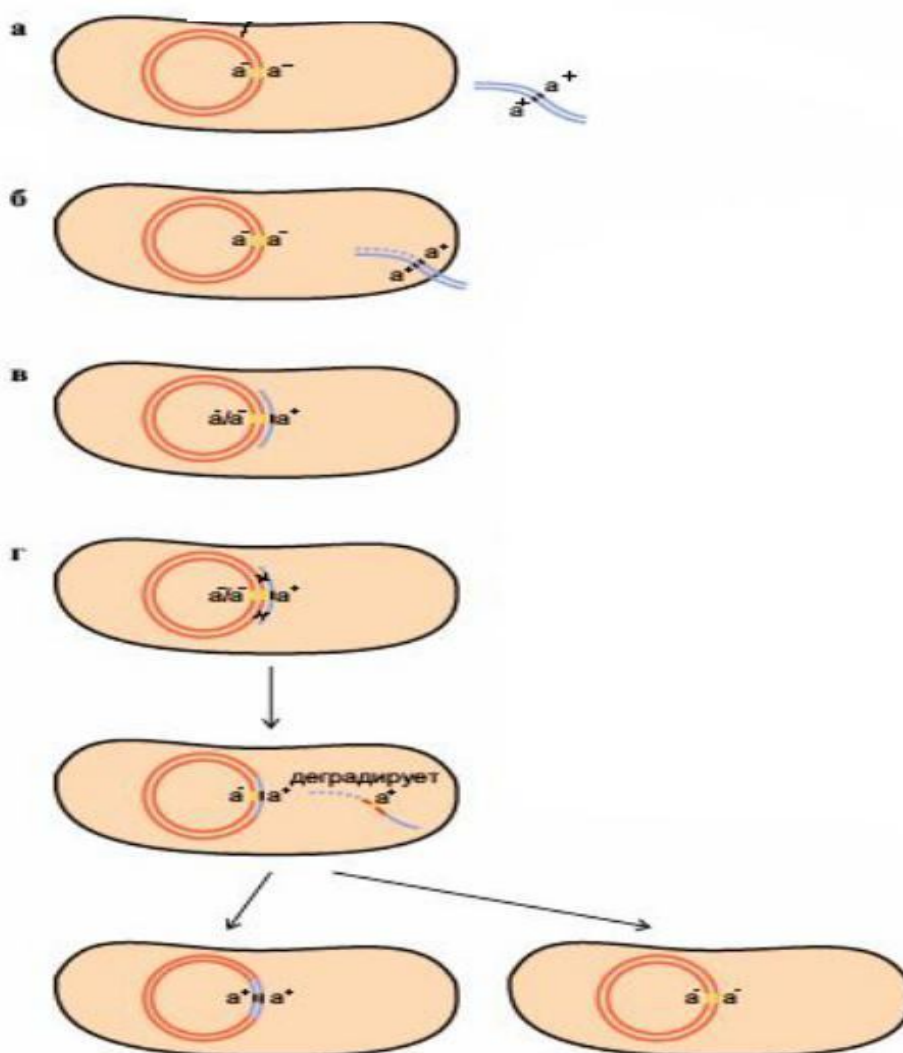


Рис. 16.1. Процес трансформації у *Bacillus subtilis*

а) Донорна дволанцюгова молекула ДНК має a^+ алель якогось гена, а реципієнтна бактерія має a^- алель гена. Трансформуюча ДНК приєднується до рецепторних сайтів на поверхні клітини-реципієнта та проникає до клітини;

б) Під впливом бактеріальних нуклеаз дволанцюгова донорна ДНК перетворюється на одностанцюгову структуру;

в) Одноланцюгова донорна ДНК спарюється з гомологічним районом хромосоми реципієнта, формуючи трьохланцюгову структуру;

г) Подвійний кросинговер продукує рекомбінантну a^+/a -молекулу ДНК – гетеродуплекс (ділянка дволанцюгової ДНК, на якій не у всіх нуклеотидних парах азотисті основи зв'язані водневими зв'язками; тобто один ланцюг власної бактеріальної ДНК + ланцюг донорної ДНК) і лінійний a -фрагмент ДНК, який руйнується. Після поділу такої клітини одна частина потомків будуть a -трансформантами, а інша половина матиме батьківський a -генотип.

Здатність клітини до трансформації можлива при особливому стані, який називають компетентністю. У компетентних клітин змінюється склад клітинної стінки і плазмолемми: стінка стає пористою, а плазмолема утворює багаточисельні впячування, на зовнішній поверхні клітинної стінки з'являються особливі антигени – фактори компетентності (зокрема, специфічні білки з низькою молекулярною масою). Збільшити компетентність клітини можна деякими хімічними агентами або дією сильного електричного поля.

Процес трансформації можна розділити на кілька стадій:

1.Зворотне приєднання молекул дволанцюгової донорної ДНК рецепторних сайтів на поверхні клітини-реципієнта. На цій стадії ДНК донора чутлива до дії ДНКази.

2.Незворотне поглинання ДНК донора. Ця та наступні стадії нечутливі до дії ДНКази.

3.Перетворення дволанцюгової ДНК донора в одноланцюгові фрагменти під дією клітинних нуклеаз.

4.Ковалентне приєднання одноланцюгової ДНК донора до хромосоми реципієнта і рекомбінація генетичного матеріалу.

5.Фенотипова експресія інтегрованого гена донора у трансформованій клітині.

Таким чином при трансформації відбувається не додавання нових генів, а заміна генів реципієнта на частково гомологічні нуклеотидні послідовності.

Частота трансформації у прокаріот залежить від властивостей трансформуючої ДНК, від її концентрації, від стану клітини-реципієнта, від виду бактерій. Максимальна частота трансформованих клітин не перевищує 1 на 100 клітин.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалювати схематично та дайте пояснення процес трансформації у *Bacillus Subtilis*.

Контрольні питання:

1. Що таке «трансформація бактерій»?
2. Під впливом якого ферменту дволанцюгова донорна ДНК перетворюється на одноланцюгову структуру?
3. З при яких умовах можлива здатність клітини до трансформації?
4. Перерахуйте стадії процесу трансформації.

Лабораторна робота № 17

Тема: Виділення плазмідної ДНК

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомити з етапами виділення плазмідної ДНК

Для виділення плазмідної ДНК користуються багатьма методами. Всі вони включають три основних етапи: ріст бактерій й ампліфікацію плазміди; збір бактерій й їхній лізис; очищення плазмідної ДНК.

Ампліфікація в середовищі

Ампліфікацію плазмід здійснюють при вирощуванні бактерії-хазяїна в середовищі в присутності хлорамфеніколу. Нічну культуру (10 мл LB з додаванням антибіотика) пересівають у свіже середовище LB (0,2 мл н.к. в 25 мл LB з антибіотиком) і інкубують поки культура не досягне пізньої логарифмічної фази ($D_{600}=0,6$). Переносять культуру у свіже середовище LB з антибіотиком (500 мл), інкубують 2,5 години (при цьому титр подвоюється), додають антибіотик до концентрації 170 мкг/мл й інкубують ще 12-16 год.

Лізис клітин

Руйнування бактерій для наступного виділення біологічно активної ДНК можна домогтися різними способами.

- Механічні. При цьому відбуваються численні розриви ДНК.
- Хімічні. У багатьох бактерій настає лізис після додавання аніонного детергенту додецилсульфату (або лаурилсульфату). Зокрема, так можна зруйнувати бактерії кишкової групи, пневмококи й гемофільні бактерії.

Додецилсульфат не тільки руйнує клітини, але й денатурує деякі білки. Однак потім він повинен бути повністю вилучений з лізату (що й досягається при наступних обробках), тому що його наявність в ДНК, яка трансформується заважає самому процесу трансформації.

Деякі грампозитивні бактерії не можна зруйнувати тільки додецилсульфатом або іншими поверхнево-активними речовинами. Спочатку потрібно видалити клітинну стінку й потім застосувати той або інший детергент. Для руйнування клітинної стінки найчастіше застосовують лізоцим.

При руйнуванні бактерій у лізаті в числі інших ферментів з'являються дезоксирибонуклеази. Вони, якщо дія їх будь-чим не блокована, можуть відразу зруйнувати ДНК. Звичайно від них захищаються, додаючи речовини, які зв'язують іони магнію, які необхідні для роботи більшості ДНК-аз.

Лізоцим і проназа, що залишаються в лізаті, самі можуть лізувати компетентні клітини. У ряді випадків від небажаних домішок, що заважають трансформації, можна позбутися за рахунок його розведення.

Для депротейнізації лізату при виділенні ДНК використовують обробку фенолом, що осаджує додецилсульфат й інактивує усі білки, у тому числі й дезоксирибонуклеази.

Очищення ДНК

У цих методах очищення так чи інакше використовують дві основних відмінності між ДНК *Escherichia coli* і плазмідною ДНК:

1) хромосома *E. Coli* за розміром набагато більша ДНК плазмід, які зазвичай використовуються як вектори;

2) основна маса ДНК *E. Coli* виділяється із клітин у вигляді фрагментованих лінійних молекул, тоді як більшість плазмідних ДНК екстрагується у вигляді ковалентно замкнутих кільцевих молекул.

Тому більшість методів очищення включають осадження, при якому із препарату видаляються переважно довгі ланцюги ДНК *E. coli*, випадково захоплені уламки лізованих клітин. Методики ці засновані також на використанні властивостей кільцевої замкнутої ДНК. Кожен з комплементарних ланцюгів плазмідної ДНК являє собою ковалентно замкнуте кільце, тому ланцюг не можна відокремити один від одного (не розірвавши один з них) у тих умовах, при яких відбувається розрив більшості водневих зв'язків у ДНК, наприклад при нагріванні або при витримуванні в помірно лужних розчинах (до рН 12,5). При охолодженні або поверненні до нейтрального рН замкнуті кільцеві молекули знову набувають нативної конформації, тоді як ДНК *E. coli* залишається денатурованою.

Плазмідна ДНК поводить ся на відміну від ДНК *E. coli* також і при рівноважному центрифугуванні в градієнті хлористого цезію, що містять який-небудь інтеркалюючий барвник що насичує концентраці, наприклад бромистий етидій або дейодистий пропідій. Ковалентно замкнуті кільцеві ДНК зв'язують менше такого барвника, ніж лінійна ДНК, і тому в градієнтах хлористого цезію, що містять інтеркалюючий агент, виявляються в зонах з більш високою щільністю. Цю методику використовують, якщо необхідний високий ступінь очищення плазмідної ДНК. Однак у міру розвитку методів роботи з рекомбінантною ДНК для багатьох цілей стало вже необов'язковим проводити очищення великих кількостей плазмідної ДНК настільки, щоб препарат був гомогенним. Наприклад, розщеплення рестрикуючими ендонуклеазами, лігування, трансформація й навіть секвенування ДНК можна проводити тепер, використовуючи відносно малоочищені препарати плазмідної ДНК, отримані з невеликих об'ємів культури (близько 10 мл). Плазмідну ДНК виділяють із великих об'ємів культури лише в тих випадках, коли потрібні значні її препарати (наприклад, у дослідах по гібридизації для добору специфічних мРНК або коли потрібно позначити 5-кінці фрагментів ДНК за допомогою полінуклеотидкінази).

Описані нижче методики можна успішно використовувати для виділення різноманітних плазмід з різних штамів бактерій. Загалом, чим менша плазміда, тим досягнені результати кращі. Зі збільшенням молекулярної маси плазмиди її властивості стають усе ближче до властивостей ДНК-хазяїна.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Опишіть процес ампліфікації плазмід у середовищі.
3. Опишіть способи руйнування бактерій.
4. Опишіть способи очищення ДНК бактерії та плазміни.

Контрольні питання:

1. Назвіть три основних етапи виділення плазмідної ДНК.
2. Який процес настає після додавання аніонного детергенту додецилсульфату (або лаурилсульфату)?
3. Який препарат використовують для руйнування клітинної стінки?
4. Що включають в себе методи очищення ?
5. В чому відмінність виділення ДНК бактерії і плазміни?
6. В яких випадках виділяють плазмідну ДНК із великих об'ємів культури ?

Лабораторна робота № 18

Тема: Конструювання препаратів-антисептиків ветеринарного та медичного призначення

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомити з розробкою лікарських препаратів ветеринарного та медичного призначення, на прикладі антисептичних препаратів

На сьогодні лікарські препарати на основі ферментів знайшли широке застосування, як в медицині і ветеринарії, так і в інших галузях. Однак використання ферментів як основної діючої речовини лікарських засобів викликає ряд труднощів і проблем, пов'язаних з вибором типу лікарського засобу (порошки, розчини, м'які лікарські форми) та з вибором допоміжних речовин.

Порошки та розчини, що представляють собою нативні протеолітичні ферменти (трипсин, хімотрипсин, террілітін тощо) мають ряд недоліків. Тому зараз все більше уваги приділяють м'яким лікарським формам (МЛФ) – мазям, гелям, пластирним та гірчичним масам та інш., що займають значне місце у номенклатурі лікарських засобів та використовуються у різних галузях медицини.

Серед МЛФ з протеолітичними ферментами найбільш популярними у виробництві і використанні є мазі. Більшість з них випускаються на гідрофобній основі, що і є їх недоліком. Тому однією з тенденцій, що відзначається при розробці сучасних біологічно активних препаратів, є отримання оптимальної мазевої основи та використання в складі ЛЗ широкого спектра допоміжних речовин, що мають різноманітне призначення – формоутворюючу, стабілізуючу, пролонгуючу дію тощо. Використання допоміжних речовин дає можливість не тільки створити зручну для застосування форму препарату, але й скорегувати та іноді й підсилити активність біологічно активної субстанції.

Таким чином, сучасні розробки м'яких лікарських форм ґрунтуються на поєднанні різних мазевих основ, що забезпечують одночасно адсорбцію діючої речовини та її подальшу дифузію у вражені тканини. У певних випадках, наприклад при використанні іммобілізації при створенні препарату, допоміжна речовина виступає також як основа (носій) біологічно активної речовини .

Практична цінність культури актиноміцету *Streptomyces recifensis var. lyticus* визначається її здатністю до синтезу комплексу ферментів (протеази, глюкозамінідази, мурамідози та ряду інших), спільна дія яких виявляється у деградації клітинної стінки широкого спектру бактерій. Бактеріолізину культури руйнують клітини *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium gravis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus*

rettgeri. Стійкішими, але такими, що піддаються лізису при використанні підвищених концентрацій ферментів, є *Streptococcus thermophilus*, *Schigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* та ряд інших бактерій.

Сучасні прийоми відбору і створення високоактивних продуцентів пов'язані з оптимізацією схеми селекції, в якій традиційні методи використовуються у модифікаціях або нових комбінаціях.

Методи селекції продуцента

Метод отримання мутантів з використанням *N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідину (НГ). Наважку мутагену розчиняють у Трисмалеїновому буфері (ТМ-буфер) до концентрації 0,1 %. Спорову суспензію *S. albus* 2435 сконцентровують до 1×10^9 клітин/мл в об'ємі 400 мкл. Суспензію розділяють на 4 порції по 100 мкл. В кожену пробірку вносять Трисмалеїновий буфер та розчин мутагену так, щоб кінцева концентрація НГ в кожній з трьох пробірок становила 1, 2 та 3 мг/мл. Остання пробірка повинна містити тільки розчин спор в буфері. Суспензію спор струшують протягом 20 хв для кращого проникнення мутагену в клітини. Відмивають дистильованою водою два рази, здійснюють десятикратні розведення і висівають на чашки з вівсяним середовищем. Культивують протягом 4 діб в термостаті при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Порівнюють кількості колоній, утворених спорами, які вижили після обробки мутагеном, з числом колоній, що виникли із необроблених спор, і визначають відсоток виживання.

Виділення мутантів культури зі зміненою стійкістю до стрептоміцину. Мутанти, стійкі до стрептоміцину, отримують шляхом висіву суспензії спор *S. albus* 2435 на середовище Беннета з різними концентраціями антибіотика. Колонії, що виростили на середовищі з антибіотиком, уколом пересівають на матричні чашки і роблять повторну перевірку їх резистентності.

Визначення стабільності ознак резистентності виділених варіантів до антибіотика проводять шляхом висіву спор після їхнього зберігання на косяках з антибіотиками та без них, та наступним пересівом репліками на середовища з відповідною концентрацією антибіотика. Штами, які виростили на середовищі з стрептоміцином після трьох пасажів через неселективні умови вважали стрептоміцин – резистентними мутантами.

Метод отримання мутантів з використанням ультрафіолетового випромінювання. Мутагенез проводять наступним чином. Спорову суспензію штаму *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М у фізіологічному розчині (1×10^8 клітин/см³), попередньо відцентрифугують для отримання однорідної суспензії (при 2 тис об/хв протягом 5 хвилин), опромінюють у чашках Петрі (10 мл суспензії) при перемішуванні. Опромінення проводять

УФ-лампю потужністю 40 Вт (довжина хвилі 254- 255 нм) на відстані 30 см впродовж 30-100 с. Розведення та пересів опроміненої суспензії проводять в затемненому місці, щоб уникнути процесу фотореактивації. Розсіваючи відповідні розведення опроміненої та вихідної суспензії на середовище Чапека № 1 визначають рівень виживання культури при різних дозах мутагену.

Метод отримання мутантів з використанням HNO_2 . Мутагенну обробку проводять зі споровою суспензією досліджуваної культури. Готують спорову суспензію у фізіологічному розчині концентрацією близько 1×10^8 клітин/см³. Відбирають 0,2 мл суспензії в пробірку з 5,6 мл стерильного ФР (контроль). В інші пробірки з 5,6 мл ацетатного буферу (0,2 М, рН 4,4-4,6) вносять по 0,2 мл спорової суспензії та 0,2 мл розчину нітриту натрію різної молярності (0,5; 1; 2; 3 М). Пробірки інкубують різні проміжки часу від 10 до 80 хв. Через зазначені проміжки часу відбирають по 0,5 мл обробленої суспензії та переносять в пробірки з 4,5 мл стерильного фосфатного буфера (0,2 М, рН 7,0) для припинення дії мутагену. Десятикратні розведення опроміненої суспензії висівають по 0,02 мл на чашки з повноцінним середовищем № 1. Засіяні чашки інкубують при 28°C протягом 5-7 діб. Визначають рівень виживання культури при різних дозах мутагену.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Охарактеризуйте та занотуйте методи селекції продуцента

Контрольні питання:

1. Значення та використання лікарських препаратів на основі ферментів?
2. Чим визначається практична цінність культури актиноміцету *Streptomyces recifensis var. lyticus*?
3. Як здійснюють визначення стабільності ознак резистентності виділених варіантів до антибіотика?

Лабораторна робота № 19

Тема: Трансформація протопластів

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з процедурою введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини штамів

Для успішного використання сучасних методів генетичної інженерії у вивченні генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, у тому числі і ногаламіцину, необхідно володіти ефективними методиками введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини цих штамів. На сьогоднішній день для багатьох штамів такі методики не є достатньо успішними, що створює серйозні перешкоди як для вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотиків, так і для їхнього генно-інженерного застосування. Розробка ефективних методів введення екзогенних молекул ДНК дала б змогу подолати ці проблеми, а також повною мірою використати сучасні генетичні підходи з метою конструювання штамів актиноміцетів, зокрема і штаму *S. nogalater*.

Трансформація протопластів є найпоширенішою процедурою введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини бактерій роду *Streptomyces*. Методики отримання і трансформації протопластів розроблені для таких модельних штамів актиноміцетів, як *S. coelicolor* та *S. lividans*. Проте для більшості інших штамів вони потребують значних модифікацій.

Трансформація (англ. Transformation) – процес поглинання бактеріальною клітиною молекули ДНК із зовнішнього середовища. Для того, щоб бути здатною до трансформації, клітина повинна бути компетентною, тобто молекули ДНК повинні мати можливість проникнути в неї через клітинні покриви. Трансформація активно використовується в молекулярній біології і генетичній інженерії (рис. 19.1).

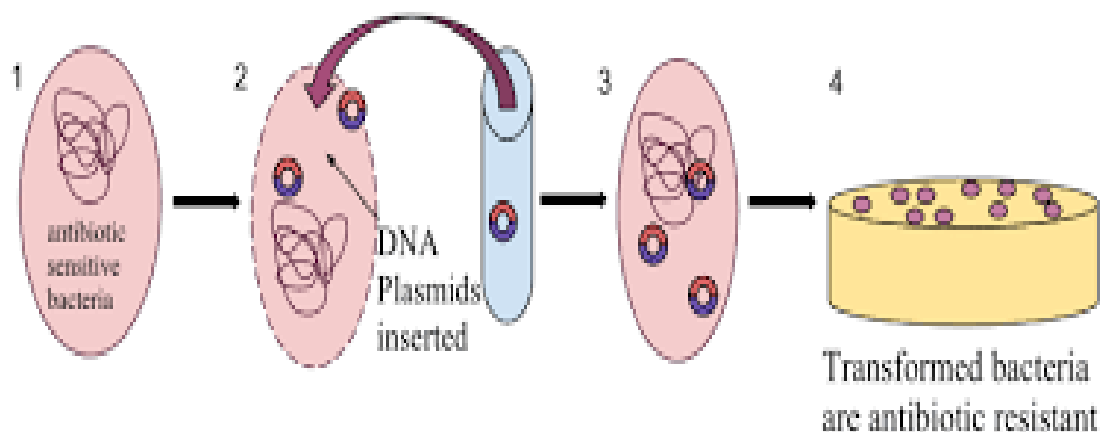


Рис. 19.1. Схема штучної трансформації

Варто зазначити, що термін «трансформація» відноситься тільки до бактеріальних клітин. Надходження чужорідної ДНК в еукаріотичні клітини називають трансфекцією.

До трансформації здатні багато бактерії, наприклад, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus*, актиноміцети, ціанобактерії та інші бактерії. Так, антигенна варіація, яка спостерігається у збудника гонореї *Neisseria gonorrhoeae*, забезпечується за рахунок трансформації, при якій клітини передають один одному гени різних варіантів пілей, за рахунок яких прикріплюються до клітин організму-господаря. У нормальному стані проникненню великих молекул ДНК всередину бактеріальних клітин заважають щільні покрити, тому, щоб бути здатною до трансформації, клітина повинна увійти в так званий стан компетентності.

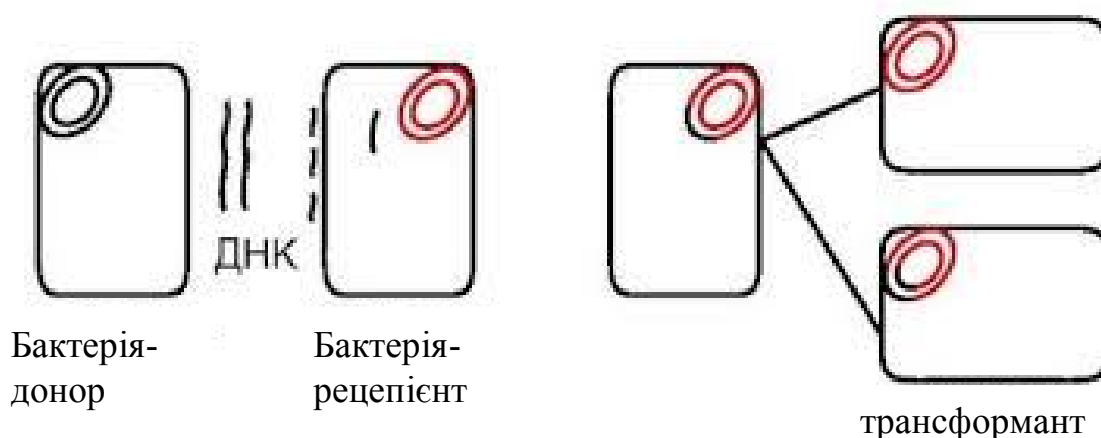


Рис. 2. Схема трансформації бактеріальної клітини

У природних умовах компетентність набуває частина культури в логарифмічній фазі росту під дією деяких білків (факторів компетентності), що діють через двокомпонентну систему. Хлорамфенікол, блокує синтез білка, не дає утворюватися і компетентним клітинам. Можливо також, що свою роль у розвиток компетентності вносить щільність бактеріальної культури, оскільки при цьому підвищується концентрація факторів компетентності. У *Streptococcus mutans* і у інших видів роду *Streptococcus* трансформація часто відбувається при формуванні біоплівки.

У *Bacillus subtilis* деякі гени, залучені в розвиток компетентності, також задіяні в споруляції. Розвиток компетентності в лог-фазі зумовлена браком поживних речовин і накопиченням значної кількості факторів компетентності. Трансформацію можуть провокувати бактеріофаги, що викликають вихід ДНК з тих, хто гине клітин, а також пошкодження бактеріальної ДНК. Придбання компетентності – надзвичайно складний фізіологічний процес, у *Bacillus subtilis* він вимагає експресії близько 40 генів.

Спочатку компетентні клітини пов'язують ДНК своєю поверхнею за допомогою особливих рецепторів, причому лінійними фрагментами клітина трансформується набагато легше, ніж кільцевими. ДНК розщеплюється нуклеазами до фрагментів з масою до 4-5 мільйонів Так, причому в клітину надходить лише одна з двох ланцюгів фрагментів. Деякі бактерії, такі як пневмококи і *Bacillus subtilis*, можуть поглинати ДНК з різноманітних джерел, а інші, такі як *Haemophilus*, можуть поглинати тільки ДНК клітин свого виду. Фрагменти, які мають масу менше 500 кДа, в клітину не потрапляють.

Після потрапляння в клітину одноланцюговий фрагмент вбудовується в геному ДНК клітини-реципієнта. Трансформація триває від 10 до 30 хвилин і у різних бактерій відбувається з частотою близько 1%

У природних умовах трансформація дає можливість бактеріям отримати ззовні гени, які можуть допомогти адаптуватися до цих умов. Таким чином, трансформація є одним з механізмів горизонтального переносу генів, поряд з кон'югацією (обміном клітинами генетичним матеріалом при фізичному контакті), і трансдукції, при якій фрагмент ДНК переноситься фагом.

Оскільки компетентність може викликатися ушкодженнями ДНК і часто відбувається під дією агентів, що вносять пошкодження в ДНК (наприклад, у *Helicobacter pylori* трансформацію індукує антибіотик ципрофлоксацин, стимулює утворення дволанцюгових розривів) то трансформація може служити адаптивним механізмом, що сприяє репарації ДНК. Отримуючи фрагмент ДНК ззовні (особливо від бактерії того ж виду), бактерія може використовувати його в якості матриці для репарації ушкоджень шляхом гомологічної рекомбінації. Трансформація стала рутинним методом молекулярної біології для напрацювання великої кількості необхідної плазмід. Щоб штучно ввести клітини в стан компетентності, існує два основних підходи: електропорація, при якій клітини поглинають ДНК після короткочасно прикладеної напруги, і хімічна трансформація, при якій на клітини діють різноманітними солями двовалентних іонів, наприклад, хлоридом кальцію.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте та поясніть схему штучної трансформації.
3. Замалуйте та поясніть схему трансформації бактеріальної клітини.

Контрольні питання:

1. Для яких штамів розроблені методики отримання і трансформації протопластів ?
2. Які бактерії здатні до трансформації ?

3. Які бактерії можуть поглинати ДНК з різноманітних джерел, та які можуть поглинати лише ДНК клітини свого виду?
4. Назвіть два основних підходи, що дозволяють штучно ввести клітину у стан комплементарності.

Лабораторна робота № 20

Тема: Використання ретровірусних векторів

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомити здобувачів вищої освіти уведення чужорідної ДНК за допомогою ретровірусних векторів

Одним із методів отримання трансгенних тварин (наприклад, мишей) є зараження передімплантованих ембріонів рекомбінантними ретровірусами. Геном ретровірусів відносно невеликий і з ним досить легко маніпулювати, вводячи до нього чужорідні гени.

Ретровіруси – сімейство еукаріотичних вірусів, генетичний матеріал яких представлений одно ланцюжковою РНК.

Віруси складаються покритих липопротеїдною оболонкою вірусних частинок діаметром 70-120 нм і внутрішньої капсули ікосаедричної форми, яка містить дві копії геномної РНК довжиною 5-10 тисяч пар нуклеотидів у формі рибонуклеопротеїни. Зовнішня оболонка вірусу є частиною цитоплазматичної мембрани клітини господаря і представлена короткими глікопротеїдами.

За своїй здатності інфікувати клітини господаря ретровіруси поділяються на екотропні і амфотропні. **Екотропні** віруси здатні репліціюватися в клітинах тільки одного або декількох близько споріднених видів тварин. Так, наприклад, вірус лейкемії миші (*MLV*) розмножується тільки в клітинах миші та щура. **Амфотропні** віруси, навпаки, мають широкий спектр господарів і здатні до розмноження в клітинах різних видів ссавців.

Геном всіх здатних до реплікації ретровірусів влаштований аналогічним чином і складається з трьох кодуєчих регіонів, які, не дивлячись на те, що мова йде про послідовності РНК, отримали назву *генів*. Ген *gag* кодує білки капсули і вірусного кора. Ген *pol* кодує вірусну реверсивну транскриптазу й інші пов'язані з вірусом нуклеази. Ген *env* кодує глікопротеїди у вірусній ліпідній оболонці.

Ретровіруси достатньо інфекційні по відношенню до клітин (майже 100% зараження), а єдина копія ретровірусного генома ДНК точно визначеним чином інтегрується із ДНК клітини-мішені. Клітини, в які потрапили поряд із вірусом чужорідні гени, здатні здійснювати їх експресію. Рівень експресії клонованих генів значно підвищується внаслідок того, що ретровіруси містять досить активні транскрипційні енансери (посилувачі) (рис.20.1).



Рис.20.1. Схема основних методів перенесення чужорідних ДНК у геном тварин

Кожна вірусна часточка містить дві копії одноланцюгового РНК-генома, а після проникнення у клітину цей геном під впливом ревертази перетворюється на лінійну дволанцюгову ДНК. Для інтеграції до генома клітини-мішені дволанцюгова лінійна ДНК віруса проникає до ядра, де набуває кільцевої форми. Інтегрована лінійна ДНК-копія ретровірусного генома (провірус) містить на обох кінцях довгі нуклеотидні повтори – LTR (від англ. long terminal repeats). До складу 5'LTR входить промотор, з якого починається транскрипція генів інтегрованого провірусу; 3'LTR – сайт поліаденілювання, де здійснюється термінація РНК-транскриптів. Існує ряд векторів на основі ретровірусного генома. У найпростіших випадках видаляють структурні гени і на їх місце вбудовують один або більше рестрикційних сайтів з метою клонування.

Інфекція починається з взаємодії ретровірусу з клітинною мембраною і зв'язування поверхневого білка ретровірусу (*env*) зі специфічним білком-рецептором. Проникнення ретровірусу в клітину відбувається за допомогою мікропіноцітоза. В одних вірусів кора, що складається з білка *gag*, РНК-залежної ДНК-полімерази (реверсивної транскриптази), інтегрази і двох копій ретровірусної РНК, переноситься в ядро, де і відбувається транскрипція, а в інших вірусів транскрипція здійснюється безпосередньо в цитоплазмі. Зворотня транскрипція вірусної РНК в двухланцюгову ДНК здійснюється за допомогою ферменту реверсивної транскриптази, що є частиною комплексу ферментів кора. У ході транскрипції відбувається дуплікація послідовностей на 5' і 3' кінцях ретровірусу. Якщо транскрипція

має місце в цитоплазмі клітини, то дволанцюгова ДНК вірусу транспортується в ядро, де відбувається її циркуляція з подальшою інтеграцією однієї або декількох копій в геном клітини. Така інтегрована ДНК клітини хазяїна форма існування вірусного геному отримала назву провірусу.

Кроки життєвого циклу ретровірусів.

Для інтеграції необхідна наявність на обох кінцях ДНК 9 пар основ, які пізнаються і відщеплюються закодованої у вірусі специфічної інтегрази, що є частиною комплексу ферментів кора. Процесу інтеграції завжди передують відщеплення двох пар основ на обох кінцях провірусу і подвоєння 3-6 пар основ (залежно від типу вірусу) послідовності ДНК клітини хазяїна. Хоча інтеграція в геном клітини господаря не є специфічною, слід відзначити, що місця інтеграції часто розташовуються в транскрипційно активних ділянках ДНК. Якщо відбувається інтеграція в геном генеративних клітин, то ретровіруси передаються у спадок нащадкам. У цьому випадку мову ведуть про ендогенні ретровіруси.

Інтегрована вірусна ДНК транскрибується з допомогою РНК-полімерази клітини-хазяїна та транляціюється як і інші клітинні гени.

Утворені в ході процесу транскрипції продукти є ідентичними вірусної РНК. Всі транскрипти містять на 5 кінці кеп-сайт, а на 3 кінці ділянку Поліаденілювання. Такі РНК служать матеріалом для синтезу білків капсиду і вірусного кора, а також білків зворотної транскриптази. Ці білки утворюють з геномної РНК вірусу комплекс-кори, після чого вірусні частинки залишають клітину через цитоплазматичну мембрану. При цьому кор бере з собою частину мембрани клітини господаря, з якої утворює оболонку. Інтеграція вірусних частинок в геном клітини господаря відбувається тільки в мітотично активні клітини.

Інфікування клітин ретровірусами найчастіше за все не позначається на їхній життєдіяльності. Однак якщо інтеграція провірусу сталася поблизу клітинних протоонкогенів, то можлива їх активація і, як наслідок, загибель клітин. Порушення життєздатності клітин. Може мати місце і в тому випадку інтеграції провірусу в діючий клітинний ген (наприклад, пухлинні гени-супресори).

Частина бластоцист може загинути, а частина нормально розвивається і у визначений час трансформується у трансгенних нащадків, які потім підлягають ретельному генетичному аналізу і можуть бути використані для створення трансгенних ліній (рис. 20.2).

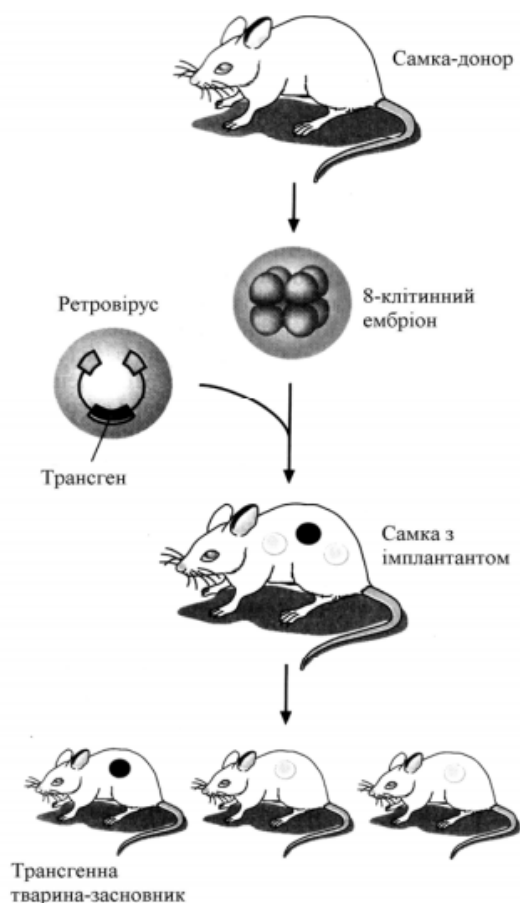


Рис. 20.2. Отримання трансгенних тварин за допомогою ретровірусів

Перевагою використання ретровірусних векторів для отримання трансгенних тварин є те, що до 100% оброблених ембріонів можуть бути успішно інфіковані ретровірусами.

Недоліком застосування ретровірусних векторів є їх обмежена ємність (розмір вставки не повинен перевищувати 8 000 п. н. Крім того, в результаті сплайсингу з ретровірусів вирізаються інтронні послідовності, які як і інші дистальні або проксимальні послідовності грають важливу роль в ефективній експресії генів у трансгенних тварин.

До недоліків лікування ретровірусними векторами слід так само віднести пригнічення експресії трансгенів *in vivo* внаслідок інактивації вірусних промоторів в клітинах, наприклад, за допомогою α -і γ -інтерферонів, що діють на вірусні *LTR*. Однак дана проблема може бути вирішена за допомогою включення в ретровірусну конструкцію внутрішніх промоторів або використанням нового покоління ретровірусів, що містять модифіковані ділянки контролю експресії, такі як внутрішній рибосомних сайт (*IRES*) і тетрациклінова регуляторна система.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.

2. Замалюйте схему та дайте пояснення основних методів перенесення чужорідних ДНК у геном тварин.
3. Замалюйте схему поясніть отримання трансгенних тварин за допомогою ретровірусів.
4. Занотуйте у вигляді таблиці переваги і недоліки використання ретровірусів.

Контрольні питання

1. Що таке ретровіруси і які вони бувають?
2. Які кодуєчі регіони містяться в ретровірусах та які ділянки вони кодують?
3. З чого починається зараження ретровірусами?
4. Вкажіть переваги та недоліки методу, що заснований на використанні ретровірусних векторів

Лабораторна робота № 21

Тема: Метод мікроін'єкції ДНК

МЕТА: Ознайомити здобувачів вищої освіти з методом мікроін'єкцій ДНК для створення трансгенних тварин

Мікроін'єкція чужорідної ДНК в запліднену яйцеклітину – зиготу, розроблена для одержання трансгенних мишей, пізніше стала застосовуватися й для одержання великих тварин – продуцентів лікарських білків людини: кролів, кіз, овець, корів.

У наш час для створення трансгенних мишей найчастіше використовують метод мікроін'єкцій ДНК. 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. 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 (рис.21.1).

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.

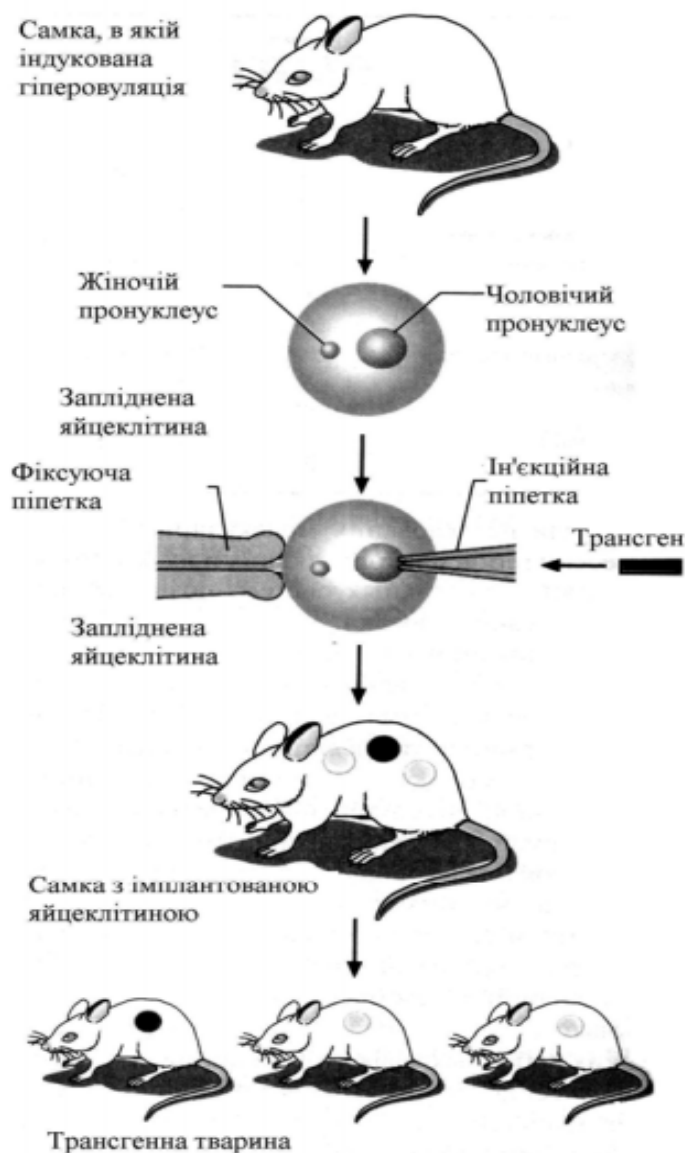


Рис.21.1. Отримання трансгенних тварин ін'єкційним методом

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. Жоден з етапів експерименту не ефективний на всі 100%, тому для мікроін'єкцій необхідно використовувати велику кількість запліднених яйцеклітин. Наприклад, за одержання трансгенних мишей після ін'єкції ДНК виживають тільки 66% запліднених яйцеклітин; мишенята розвиваються приблизно з 25% імплантованих яйцеклітин, причому трансгенними з них виявляються лише 25%.

Однак, далеко не всі тварини, що народилися з ін'єцьованих зигот, несуть чужорідний ген. А ті, які все-таки є трансгенними, звичайно,

виявляються мозаїчними за введеним геном, тобто несуть його не у всіх тканинах організму. Так що для одержання трансгенних тварин велике значення має молекулярно-генетичний аналіз народженого потомства.

За використання методу мікроін'єкції ступінь інтеграції, тобто число трансгенних тварин від загальної кількості народжених тварин, коливається в незначних межах залежно від виду тварин. Так, у мишей цей показник у середньому становить 15%, у свиней – 10-15%, у кролів – 10%, у овець, кіз і корів – 5-10%.

Найбільш важливим, з погляду витрат для одержання однієї трансгенної тварини, є показник загальної ефективності трансгенезу, що розраховується як відношення числа отриманих трансгенних тварин до загального числа пересаджених ембріонів, вираженого у відсотках. Величина цього показника також відносно постійна й становить у середньому для мишей – 2%, кролів – 1%, овець і кіз – 0,5-1%, свиней і корів – 0,5%.

Слід зазначити, що на частоту інтеграції за використання методу мікроін'єкції впливають такі фактори, як ступінь очищення ін'єкційного розчину, форма й концентрація ДНК, склад буферного розчину для мікроін'єкції, якість ембріонів, а також спосіб пересадження ембріонів реципієнтам (нехірургічний, хірургічний, лапароскопічний).

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Опишіть послідовність дій при використанні методу мікроін'єкцій створення транс генних тварин.
3. Замалюйте схему та опишіть процес отримання трансгенних тварин ін'єкційним методом.
4. Занотуйте у вигляді таблиці переваги і недоліки використання методу мікроін'єкцій.

Контрольні питання:

1. Що таке метод мікроін'єкції?
2. Яких умов необхідно дотримуватися при використанні методу мікроін'єкцій?
3. Охарактеризуйте чоловічий пронуклеус і ядро яйцеклітини. Як вони існують?
4. Як проводять ідентифікацію трансгенних тварин?
5. Назвіть фактори, які впливають на частоту інтеграції при використанні методу мікроін'єкцій.

Лабораторна робота № 22

Тема: Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин

МЕТА: Ознайомити здобувачів вищої освіти з історією та використанням ЕС-клітин

1. Історія створення лінії ЕСК
2. Доцільне використання ембріональних стовбурових клітин для створення трансгенних тварин

Уперше лінія ембріональних стовбурних клітин (ЕСК) була отримана із бластоцист миші М. Евансом, М. Кауфманом і Г. Мартіном у 1981 році. Клітини, виділені з ембріонів мишей на стадії бластоцисти, можуть проліферувати (рости і розмножуватися) у культурі. Ці клітини є поліпотентними (або плюріпотентними), 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.

Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) утворюються з внутрішньої клітинної маси на ранній стадії розвитку зародка – бластоцисти. Зародок людини досягає стадії бластоцисти на стадії 4-5 днів після запліднення, бластоцист людини складається з 50-150 клітин.

Ембріональні стовбурові клітини є плюріпотентними. Це означає, що вони можуть диференціюватися в усі три первинні зародкові листки: ектодерму, ентодерму і мезодерму. Таким чином утворюються більш 220 видів клітин. Властивість плюріпотентності відрізняє ембріональні стовбурові клітини від поліпотентних клітин, які можуть дати початок лише обмеженій кількості видів клітин. У відсутність стимулів до диференціації *in vitro*, ембріональні стовбурові клітини можуть підтримувати плюріпотентність протягом багатьох клітинних поділів.

Тотіпотентність – здатність утворювати будь-яку з приблизно 350 типів клітин організму (у ссавців).

Хоумінг – здатність стовбурових клітин, при введенні їх в організм, знаходити зону пошкодження і фіксуватися там, виконуючи втрачену функцію.

Фактори, які визначають унікальність стовбурових клітин, знаходяться не в ядрі, а в цитоплазмі. Це надлишок мРНК всіх 3 тисяч генів, які відповідають за ранній розвиток зародка.

ЕС-клітини – це клітини-нащадки 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 перевірають, і деякі з їх утворюють початок лінії ембріональних стовбурових клітин. У 1984 році було показано, що 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. 22.1 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.

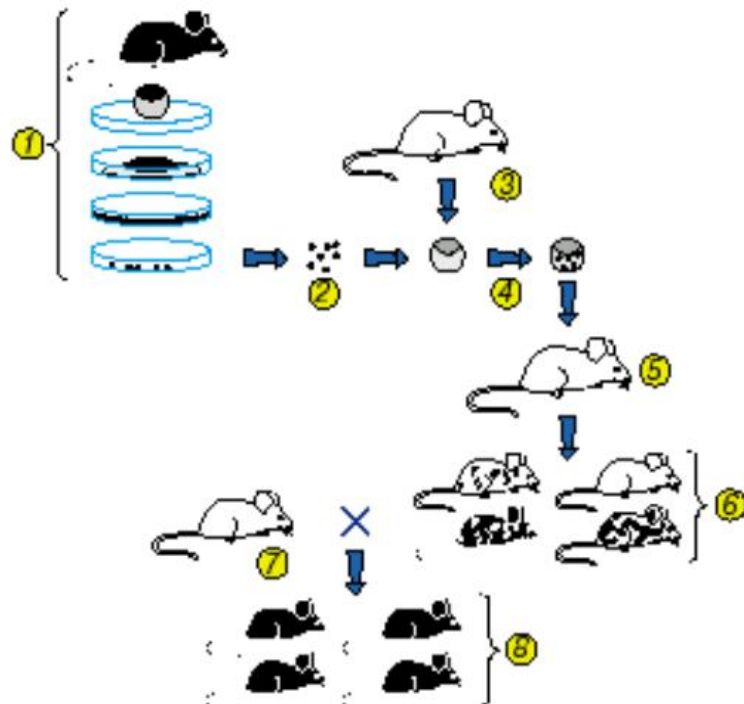


Рис. 22.1. Схема отримання трансгенних тварин шляхом реконструкції ембріонів із використанням ембріональних стовбурових клітин

Схема отримання трансгенних тварин

- 1 – отримання культури ЕСК;
- 2 – уведення 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 уводять 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.

У наш час цю технологію найчастіше використовують для одержання трансгенних мишей, тому що донедавна існували тільки лінії ЕСК миші. Однак, за останні кілька років такі клітинні лінії були отримані із бластоцист багатьох інших ссавців. Список цих видів постійно поповнюється: золотавий хом'ячок (1988), свиня (1990), вівця (1990), корова (1992), кролик (1993), пацюк (1994), норка (1992), мавпа (1995) і навіть людина (1994). Схема одержання трансгенних тварин вигідна ще й тим, що в цьому разі використовуються не зиготи, як для мікроін'єкцій, а бластоцисти, які легко вимиваються із статевих шляхів самок великих видів ссавців нехірургічним шляхом. Для всіх видів сільськогосподарських тварин розроблено методики тривалого зберігання ембріонів на стадії бластоцисти в рідкому азоті й методи нехірургічної трансплантації їх сурогатним матерям.

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.

Використання для одержання трансгенних тварин трансформованих ЕСК дає можливість у ряді випадків проводити оцінку експресії трансгенів, що має важливе значення. При мікроін'єкції трансгени навмання інтегруються в будьяку частину генома. Це означає, що вони можуть руйнувати досить істотні гени (інсерційні мутації) або розміщуватися в тих частинах хромосоми, які недоступні для транскрипції.

Тестування експресії в культурі уможливить використання для пересадження ядер, а отже й для одержання трансгенних тварин тільки тих клітинних ліній, у яких трансгени є транскрипційно й трансляційно активними. У 1997 році надійшло повідомлення щодо виведення трансгенних овець за допомогою пересадження ядер стабільно трансформованих первинних фетальних фібробластів. Ступінь трансгенності за використання даного методу становила 100%, у той час як застосування методу мікроін'єкції в тій же лабораторії дозволяло одержати лише 4,35% трансгенних нащадків від числа народжених тварин.

ЕСК відкрили нові можливості для створення тварин як з додатково введеними генами, так і з генами, що виключенні. Виключення у тварини певного гена називають **генним нокаутом** або **генним таргетингом**. Нормальний ген в ЕСК замінюється на «зламану» копію, що містить вставку – послідовність, що кодує білок неоміцинтрансферазу.

У результаті такої транслокації в клітині відбуваються дві події: по-перше, через вставку зрушується рамка зчитування й білок, що кодується за цим геном, не синтезується, а, по-друге, експресія вставленого гена неоміцинтрансферази робить клітину стійкою до впливу неоміцину. При здійсненні нокауту в культурі ЕСК відсоток клітин із транслокацією дуже низький, але тільки вони виживають у селективному середовищі, що містить антибіотик неоміцин.

У першу чергу технологія таргетингу зробила суттєвий внесок у генетику миші та аналіз різних аспектів функції генів *in vivo*. Внаслідок використання таргетингу генів були створені чисельні трансгенні миші із різноманітними цілеспрямованими змінами генів, починаючи від точкових мутацій і закінчуючи хромосомними перебудовами

Таким чином, генний нокаут, як і перенесення генів, мітохондрій і цілих хромосом, дозволяє не тільки визначати функцію гена, а й модулювати деякі патології людини. У наш час цей прийом стає одним із ключових у молекулярній генетиці. Його надзвичайна важливість на даному етапі досліджень визначається масовим переходом від досліджень щодо структурної генетики до функціональної генетики.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Замалуйте та опишіть схему отримання трансгенних тварин.
3. Занотуйте у вигляді таблиці переваги і недоліки використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин.

Контрольні питання

1. Коли були отримані перші стовбурові клітини?
2. Що таке плюрипотентність, тітопотентність, хоумінг?
3. В чому перевага одержання трансгенних тварин за допомогою ембріональних стовбурних клітин?
4. Що називають генним нокаутом?
5. Який внесок у генетику технології таргетингу?
6. Який прийом дозволяє не лише визначити функцію гена, а й моделювати патології людини?

Лабораторна робота № 23

Тема: Клонування коренеспецифічного та світлозалежного промоторів генів рослин

МЕТА: ознайомити здобувачів вищої освіти з клонування органоспецифічних промоторів генів рослин.

Вперше Льошиною Л.Г. отримані трансгенні рослини тютюну з коренеспецифічною та світлозалежною експресією гена металотіонеїну із *Neurospora crassa*. Автором показано збільшення толерантності рослин в умовах підвищеної концентрації іонів кадмію та міді в живильному середовищі, методика наведена нижче.

Для пошуку й добору промоторних послідовностей ДНК тютюну було використано метод клонування фрагментів ДНК перед маркерним геном, попередньо позбавленим власного промотору.

Клонування ядерної ДНК *N.tabacum* здійснюється в плазміді *pDN* (4,5 т.п.н.), яка несе гени стійкості до ампіциліну й канаміцину, має ділянку початку реплікації плазмиди *pBR322* і не містить послідовностей, що блокують її реплікацію в клітинах еукаріот. Плазміда послідовно гідролізується рестриктазами *BglII* і *EcoRI*, виділяється довший фрагмент який лігують із фрагментами ядерної ДНК тютюну, також обробленими рестриктазами *BglII* і *EcoRI*. Замість вилюченого промотору в геном неоміцинфосфотрансферази (*npt-II*) вбудовуються різні послідовності ДНК тютюну у довільній орієнтації.

Сумішшю після процесу лігування трансформуються клітини *E.coli*, скориставшись тим, що у гібридних генах була збережена послідовність Шайна-Дельгарно, яка повинна забезпечити трансляцію гена в бактеріальних клітинах. У результаті трансформації можна відібрати колонію бактерій, стійку до ампіциліну й канаміцину. Цей клон містить плазмиду, що була названа *pDNt23* і мала промоторну вставку 500 п.н. перед геном *npt-II*.

Після сиквенування отриманої послідовності, її порівнюють із ядерною та хлоропластною ДНК тютюну. Автором визначено, що фрагмент довжиною 470 п.о., введений в *pDNt23*, має 100% гомологію з фрагментом 3'-частини хлоропластного гена рибосомного білка *S12*.

Надалі, клонований фрагмент промотороподібної ДНК був досліджений на наявність потенційних сайтів зв'язування для різних факторів транскрипції. Виявилось, що фрагмент, по-перше, містить послідовності, подібні по структурі до прокаріотичних промоторів (ТАТА/ГАТГ), а саме до промотору гена тирозинової тРНК *E.Coli* – (ТАТГАТГ). Має послідовність, подібну до послідовності Шайна-Дельгарно, що пояснює функціонування фрагмента як промотора в бактеріальних клітинах. І по-друге, послідовність

містить в собі райони, які можуть потенційно регулювати експресію генів в еукаріотах.

Ділянка GGTТАА є суттєвою для фотохромної відповіді, але показана далі відсутність в дослідах світлозалежної експресії, обумовлена, скоріш за все, тим, що світлочутливі елементи направляють експресію генів тільки в комбінації *cis*-регуляторних послідовностей і їх активність є результатом синергічної взаємодії між ними, їх факторами і, у деяких випадках, відповідними ко-факторами. Необхідна для коренеспецифічної експресії GT-багата послідовність, в фрагменті це GAGGTG та GATA-мотиви, розташовані на відстані 439 п.о. на відстані 207 п.о. відповідно.

Аналіз нуклеотидної послідовності перед точками ініціації транскрипції показав, що найближча послідовність, що нагадує ТАТА-бокс, знаходиться від точки початку синтезу м-РНК на відстані 130 п.о. Таким чином, організація досліджуваної регуляторної послідовності відрізняється від організації більшості вже відомих промоторів еукаріот, у яких ТАТА-бокс розташований на відстані 10-30 п.о. від сайту ініціації транскрипції. У той же час існує цілий ряд еукаріотичних генів, промотори яких не містять ТАТА-боксу). Очевидно, що досліджуваний фрагмент відноситься саме до таких регуляторних послідовностей.

Для клонування світлозалежного промотору ампліфікують промоторний фрагмент гена *rbcS-3A* томату, використовуючи синтезовані праймери, що фланкують вибрану ділянку ДНК. За допомогою комп'ютерної програми OLIGO, підбирають олігонуклеотиди, що мають вигляд:



Як результат того, що мультигенна родина РДФК генів має схожі нуклеотидні послідовності, автори отримали на агарозному гелі набір фрагментів різної довжини. Щоб одержати промотор саме *rbcS-3A* продять доампліфікацію з внутрішніми праймерами цієї нуклеотидної послідовності



При цьому піднімають температуру гібридизації до 58°C, та збільшують кількість циклів до 40. В результаті дістають фрагмент довжиною до 1000 п.н., придатний для сиквенсу та клонування.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Знайдіть та замалюйте плазмиду *pDN* (4,5 т.п.н.),
3. Описати картування 5'-кінців транскриптів, що синтезуються в клітинах тютюну *E.coli*.

Контрольні питання:

1. Ким вперше були отримані трансгенні рослини тютюну з коренеспецифічною та світлозалежною експресією гена?
2. В якій плазміді здійснювали клонування ядерної ДНК *N.tabacum* ?
3. З чого складається послідовність Шайна-Дельгарно?
4. Що необхідно для здійснення клонування світлозалежного промотору?
5. За яких умов можна одержати гібридизацію промотора *rbcS-3A*?

Лабораторна робота № 24

ТЕМА: Контроль досліджень у галузі молекулярної біології

МЕТА: ознайомити здобувачів вищої освіти з методами контролю досліджень в галузі молекулярної біотехнології

Молекулярна біотехнологія – галузь біології, що вивчає біологічні процеси на рівні біополімерів – нуклеїнових кислот і білків та їх надмолекулярних структур.

Для біотехнології фундаментальне значення мають такі досягнення цього розділу, як встановлення механізмів реалізації генетичної інформації, біосинтезу білків, мембранного транспортування, ферментного каталізу, а також вивчення регуляторних механізмів цих процесів.

Молекулярна біологія разом з молекулярною генетикою стали фундаментом для клітинної інженерії, мета якої – створення нових клітин та отримання тканин, органів й організмів з клітинного матеріалу, що потребує контролю досліджень пов'язаних з рекомбінантними ДНК.

У 1976 р Національні інститути охорони здоров'я (NIFU від National Institutes of Health), провідне дослідне відомство США, що виділяє кошти на роботи в області медицини і охорони здоров'я, розробили директиву, яка регламентує проведення всіх субсидованих ними експериментів з рекомбінантними ДНК. У ній жорстко обговорювалися умови роботи з рекомбінантними ДНК в лабораторії і висувалася вимога, щоб в якості господарів для чужорідних ДНК використовувалися тільки мікроорганізми, нездатні розмножуватися поза стінами лабораторії і передавати свою ДНК іншим мікроорганізмам.

Для експериментів з відомими патогенними організмами, наприклад, було рекомендовано використовувати спеціально сконструйовані, що знаходяться під постійним контролем ізольовані бокси, в яких підтримується негативний тиск, і роботи з менш небезпечними організмами можна було проводити в приміщеннях, обладнаних високоефективними системами фільтрації. Незважаючи на те що директиви НІН не мали правового статусу, більшість компаній, що приступають до робіт із застосуванням технології рекомбінантних ДНК, добровільно виконували всі зазначені вимоги.

Після того як вимоги до заходів безпеки для більшості рутинних експериментів були пом'якшені, технологія рекомбінантних ДНК стала швидко розвиватися. Розроблені НІН-РАС і НІН правила частково зняли існували раніше побоювання. Однак залишилися дві важливих проблеми. По-перше, як контролювати виробництво і споживання харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми або отримані з їх використанням?

По-друге, як встежити за навмисним вивільненням ГМО в навколишнє середовище?

Третю можливу проблему вдалося вирішити, коли контролюючі органи прийшли до висновку, що лікарські препарати, отримані за допомогою технології рекомбінантних ДНК, аналогічні препаратам, отриманим традиційними методами.

Контроль за виробництвом і споживанням харчових продуктів і харчових добавок

Безпека харчових продуктів і харчових інгредієнтів, в тому числі добавок, які надають продуктам специфічний смак і запах, повинна бути гарантована ще до отримання ліцензії, що дозволяє їх введення в товарообіг і підтверджує, що такі продукти можна вживати в їжу. FDA в своїй діяльності керується багаторазовою апробацією, але не в повній мірі в законеною системою сертифікації нових харчових продуктів і харчових компонентів.

Нові харчові продукти зазвичай піддаються численним перевіркам. Однак, щоб спростити процедуру тестування та знизити собівартість продукту, при ліцензуванні враховується схожість нового продукту з відомим, який і передбачається замінити на ринку. Наприклад, FDA затвердила до застосування фермент химозин, отриманий за допомогою технології рекомбінантних ДНК і призначений для виробництва сирів, хоча відповідні випробування не були проведені в повному обсязі. Химозин, один з ключових ферментів сичуга жуйних тварин, що зброжує молоко протеолітичними ферментами, який гідролізує κ -казеїн. В результаті такого гідролізу в молоці утворюється згусток, який в свою чергу ферментує з утворенням сиру. Зазвичай зброджує молоко агент, який використовується при виробництві сиру, отримують з четвертого відділу шлунка жуйних тварин (сичуга); він являє собою суміш речовин, відомих під загальною назвою «сичужний фермент».

Щоб забезпечити надійний, зручний і по можливості найбільш дешевий промисловий спосіб отримання химозина, що кодує його ген клонували і експресували в *E. coli K-12*. Готовий продукт був виділений з бактеріальних клітин, і в FDA було направлено запит дати дозвіл на комерційне використання рекомбінантного химозина для промислового виробництва сирів.

Ідентичність клонованого і природного генів химозина була підтверджена рестрикційними картуванням, ДНК-гібридизацією і секвенуванням ДНК. Більш того, було показано, що рекомбінантний химозин мав таку саму молекулярну масу, що і природний очищений химозин теляти, і однаковою з ним біологічною активністю.

Далі, необхідно було показати, що рекомбінантний химозин безпечний для застосування. Компанія представила дані, які підтверджують, що кінцевий препарат, екстрагований з бактеріальних клітин і пройшов усі необхідні етапи очищення, не забруднений цілими бактеріальними клітинами, клітинним дебрисом і іншими домішками, в тому числі нуклеїновими кислотами. Крім того, численні дослідження показали, що штам *E. coli K-12* нетоксичний і непатогенний для людини. Результати тестування на тваринах не виявили ніяких побічних ефектів препарату, що свідчило про відсутність у ньому токсинів. Після вивчення всієї отриманої інформації FDA прийшла до висновку, що рекомбінантний химозин може бути дозволений для комерційного використання.

Контрольоване вивільнення генетично модифікованих організмів у навколишнє середовище

Так, до 1982 стало зрозуміло, що має сенс розробити правила проведення відкритого тестування в польових умовах організмів, отриманих за допомогою методів генної інженерії, з тим щоб мати можливість контролювати їх вивільнення у навколишнє середовище.

У 1982 р в NIH-RAC надійшли три заявки на проведення польових випробувань ГМО. Дві з них відносилися до генетично модифікованих рослин (кукурудзи та тютюну), а третя стосувалася тестування генетично модифікованого штаму мікроорганізму *Pseudomonas syringae*. Потрібно було визначити, чи здатний такий штам знижувати рівень пошкодження рослин при заморозках. Цей прецедент став поворотним моментом в регламентуванні процедур, покликаних контролювати вивільнення ГМО в навколишнє середовище.

Зрештою в 1987 р на спеціально обраних ділянках в шт. Каліфорнія були проведені польові випробування зазначених бактерій. Результати показали, що ці бактерії не поширюються за межі ділянок, де проводилося тестування, і не персистують на їх території. На одній з ділянок утворення кристалів льоду на рослинах відбувалося при температурі, на 1 °С нижчою в порівнянні зі звичайною температурою. Зараз «антифризні» бактерії практично не використовуються для захисту сільськогосподарських рослин від пошкоджень при заморозках.

З моменту першого тестування бактерій, про які йшла мова вище, було проведено безліч відкритих польових випробувань інших ГМО. Вони показали, що, як правило, внесені в навколишнє середовище ГМО не поширюються за межі ділянки, де проводиться тестування, які не персистують, залишають поза передачею свої гени природнім мікроорганізмам і виявляють подібну біологічну активність як в

лабораторних, так і в природних умовах. Оскільки з кожним ГМО можуть бути пов'язані різні побічні ефекти, при винесенні остаточного рішення про польові випробування кожен випадок розглядався окремо. Подібного роду випробування проводилися в США, Великобританії, Австралії та інших країнах.

ЗАВДАННЯ:

1. Випишіть та вивчіть нові терміни.
2. Використовуючі різні джерела інформації знайдіть інші приклади контролю досліджень у галузі молекулярної біології.

Контрольні питання:

1. Де і коли вперше була розроблена директива, яка регламентує проведення всіх субсидованих експериментів з рекомбінантними ДНК?
2. Які проблеми виникають при експериментах з рекомбінантними ДНК?
3. Як здійснюється контроль за виробництвом і споживанням харчових продуктів і харчових добавок?
4. Як здійснюється контроль за вивільнення генетично модифікованих організмів у навколишнє середовище?

ЛІТЕРАТУРА

1. Біотехнологія : Підручник / [В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.]. – К. : Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
3. Компанець Т. А. Віруси як вектори / Т. А. Компанець. – К., 2007. – 84 с.
4. Огурцов А. Н. Молекулярная биотехнология микробиологических систем / А. Н. Огурцов. – Х. : НТУ «ХПИ», 2012. – 142 с.
5. Сучасні проблеми молекулярної біотехнології / [С. І. Дубінін, В. О. Пілюгін, В.А. Ваценко та ін.]. – Полтава, 2016. – 395 с.
6. Тарасюк С. І. Лабораторний практикум: «Молекулярна біотехнологія» / С. І. Тарасюк, О. А. Васильченко, Ю. М. Глушко. – К. : НАУ, 2016. – 56 с.
7. Трохимчук І. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник / І. Трохимчук, Н. Плюта, І. Логвиненко, Р. Сачук. – К. : Видавничій дім Кондор, 2019. – 304 с.
8. Якупов Т. Р. Молекулярная биотехнология / Т. Р. Якупов, Т. Х. Фаизов. – Казань : ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, 2018. – 280 с

Навчальне видання

МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації
для виконання лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти
СВО «Магістр» освітньої спеціальності 162 – «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми навчання

Укладач: **Каратєєва** Олена Іванівна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 1,69
Тираж 25 прим. Зам. № __

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54029, м. Миколаїв, вул. Г. Гонгадзе, 9

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