

**ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені ІВАНА ФРАНКА**

Галина Клепач

МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Дрогобич, 2017

УДК 57.02
К 48

Рекомендовано до друку вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка посібник
(протокол № 17 від 19.10. 2017 р.)

Рецензенти:

Цайтлер Мирон Йосипович, кандидат біологічних наук, доцент кафедри екології та географії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка;

Кузьмак Микола Іванович, доктор біологічних наук, професор кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Відповідальний за випуск:

Монастирська Світлана Семенівна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Клепач Г. М.

К 48 Молекулярна біотехнологія : методичні рекомендації до практичних занять [для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальностей 091 “Біологія” та 014 “Середня освіта” (Біологія)] / **Галина Миколаївна Клепач**. – Дрогобич : Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка, 2017 – 108 с.

Методичні рекомендації є навчальним посібником, написаним відповідно до програми навчальної дисципліни “Молекулярна біотехнологія” для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальностей 091 “Біологія” та 014 “Середня освіта” (Біологія), затвердженої вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (протокол № 11 від 20.12.2016 р.). Посібник містить методичні поради до проведення практичних занять, практичні заняття з короткими теоретичними відомостями і завданнями до самостійного опрацювання та підвищеної складності, словник термінів, додатки.

ВСТУП

Молекулярна біотехнологія сформувалася у кінці 1970-х рр. на межі технології рекомбінантних ДНК і традиційної промислової мікробіології.

Молекулярна біотехнологія базується на переносі одиниць спадковості (генів) з одного організму в іншій за допомогою методів генної інженерії (технологія рекомбінантних ДНК). Метою такого переносу є створення нового чи отримання уже відомого продукту у промислових масштабах. Перша рекомбінантна ДНК була отримана у 1972 р. групою дослідників у Станфордському університеті (США) під керівництвом Пола Берга. Вона складалася з повних геномів бактеріофага λ , що містив галактозний оперон *Escherihia coli*, та вірусу приматів SV40. Цей рік вважається роком народження генної інженерії та молекулярної біотехнології.

Молекулярна біотехнологія базується на теорії і методах молекулярної біології, мікробіології, біохімії, генетики, хімічної інженерії і клітинної біології. Особливу роль у становленні молекулярної біотехнології має генна інженерія. Генна інженерія як складова молекулярної біотехнології, визначає стрімкий розвиток цієї науки. Методи генної інженерії дають змогу не тільки глибше вивчати структуру і функціонування генів, що визначають розвиток будь-якого організму, але й створювати у поєднанні з методами клітинної, метаболічної та ембріональної інженерії нові форми живих організмів, що є основою синтетичної біології.

Предметом молекулярної біотехнології є вивчення традиційних й інноваційних технологій та методів, скеровані на конструювання нових чи удосконалення існуючих біологічних систем, на отримання речовин та продуктів, створення діагностичних та аналітичних систем.

Молекулярна біотехнологія ознайомлює з основними завданнями, напрямками і досягненнями генної, метаболічної, білкової і клітинної інженерії, з методами і досягненнями молекулярної і клітинної селекції, підходами до конструювання синтетичних біологічних систем, з економічними і соціальними аспектами промислової та новітньої біотехнології.

Важливими завданнями курсу “Молекулярної біотехнології” є:

- формування знань про наукові напрями молекулярної біотехнології;
- поглиблення знань про експериментальні відкриття, факти, явища, які є основою становлення та розвитку молекулярної біотехнології;
- вивчення методів генно-інженерного конструювання рекомбінантних ДНК та їхнє використання у біотехнологічній індустрії;
- формування уявлення про нові методологічні підходи до конструювання трансгенних форм тварин і рослин;
- одержання та узагальнення нових знань про молекулярно-біотехнологічні підходи, скеровані на розв’язання глобальних проблем сучасної цивілізації: забезпечення людства необхідними речовинами і матеріалами, енергією, продуктами і ліками, збереження фізіологічного та генетичного здоров’я, поліпшення стану довкілля;

– формування уявлення про соціально-економічні та етичні проблеми трансгенозу живих систем.

Значна увага при викладанні запропонованого курсу приділяється застосуванню новітніх рекомбінантних технологій із метою поліпшення добробуту та здоров'я людей, екології довколишнього середовища. Розглянуто використання генетично-модифікованих мікроорганізмів для отримання біопалива, харчових продуктів і біоматеріалів, у сільському господарстві, у переробці відходів.

На практичних заняттях студенти ознайомлюються з біотехнологічними процесами отримання низькомолекулярних біологічно активних сполук, білків і ферментів із використанням генетично модифікованих організмів, основними галузями біотехнології для виробництва енергії, бактерійних добрив і засобів захисту рослин, вакцин, діагностичних і лікувальних медичних препаратів, при добуванні корисних копалин, а також беруть участь в обговоренні екологічних та етичних проблем сучасної біотехнології.

Викладання курсу “Молекулярна біотехнологія” базується на отриманих раніше студентами знаннях із “Мікробіології і вірусології”, де вони ознайомилися із розмаїттям світу мікроорганізмів, особливостями їхньої життєдіяльності, “Біохімії”, де опанували перебіг метаболічних процесів у клітині, “Генетиці з основами селекції”, де вивчили механізми передачі та реалізації генетичної інформації на клітинному й організменому рівнях, “Біотехнології”, де ознайомились із сучасними напрямками

Мета посібника – сприяти студентам у засвоєнні нових знань і навичок, закріпити набуті теоретичні знання, розширити і поглибити їх.

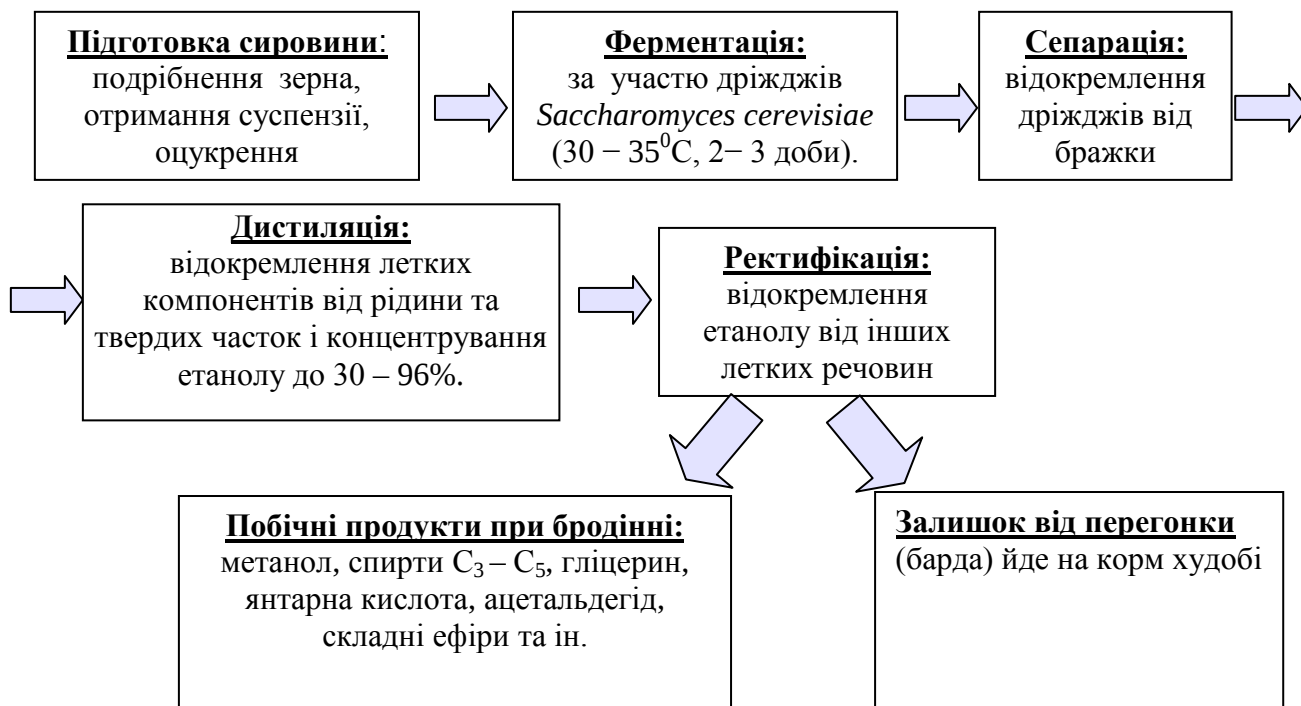
У посібнику наводяться методичні поради до виконання практичних занять та короткі теоретичні відомості до них, завдання підвищеної складності, а також словник термінів та додатки.

Автор висловлює подяку за консультування при підготовці цього посібника викладачам кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка.

МЕТОДИЧНІ ПОРАДИ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Кожне практичне заняття передбачає глибоке і різнобічне знання матеріалу, відповідно до якого укладені завдання різних типів.

У завданнях одного типу потрібно зобразити етапи технологічної схеми отримання деяких речовин (наприклад, отримання етанолу). Для цього студент має попередньо ознайомитися із біотехнологічними процесами й продуцентами, задіяними у цьому процесі, та подати відповідь у такому вигляді:



Завдання іншого типу потребують від студента заповнити таблицю чи схему на основі вивченої та опрацьованої ним самостійно теми. Наприклад, у наведеній схемі треба вписати галузі народного господарства, у яких використовується культура тваринних клітин:



чи необхідно заповнити таблицю, у якій вказати методи, їх принцип й особливості застосування. Наприклад:

Методи введення ДНК у клітини рослин	Принцип методу
Трансформація Ti-плазмідною <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ti-плазмід <i>Agrobacterium tumefaciens</i> обумовлюють перенесення Т-ДНК, яка інтегрується у геном клітини рослин і викликає пухлини. На основі Ti-плазмід сконструйовані Ti-вектори.
Векторні системи на основі Ti-плазмід	Ti-вектори позбавлені генів, що визначають синтез фітогормонів, опінів та генів <i>vir</i> . Вони не можуть самостійно переміщатися у рослинні клітини і зумовлювати інтеграцію чужорідних генів у геном рослин. У вектори включено ділянки <i>ori</i> , що визначають їхню реплікацію в <i>E. coli</i> ; правий кінцевий повтор Т-ДНК, необхідний для інтеграції Т-ДНК у геном рослини (деякі вектори містять обидва повтори); полілінкер для клонування генів у Т-ДНК; маркерні гени для бактерійних та рослинних клітин. Є бінарна і коінтегративна векторні системи.
Бомбардування мікрочастинками	Клітини бомбардують хімічно інертними частинками золота діаметром 0,6 – 3 мкм, на які адсорбують молекули ДНК. Цими частинками заряджають генну пушку, після вистрілу частинки пробивають клітинні стінки, ДНК потрапляє всередину клітини і в результаті – у ядро (чи пластиди). Через годину після бомбардування у тканинах рослини може бути виявлена експресія трансгена, проте стабільна інтеграція плазмідної ДНК спостерігається лише у невеликій кількості клітин.

ПРАКТИЧНІ ЗАНЯТТЯ

Практичне заняття № 1

Ферменти і методи генної інженерії

Мета : ознайомитися з різноманітністю ферментів, що використовуються у генній інженерії, їх властивостями й особливостями застосування, а також методами, у яких вони використовуються.

Теоретичні відомості

Технологія рекомбінантних ДНК (її називають також молекулярним клонуванням, чи генною інженерією) – це сукупність експериментальних процедур, які дають змогу здійснити перенесення генетичного матеріалу з одного організму до іншого. Роком народження генної інженерії вважають **1972 р.**, коли група дослідників у Станфордському університеті (США) під керівництвом **П. Берга** отримала **першу штучно створену рекомбінантну молекулу ДНК in vitro**, що складалася із фрагментів двох різних молекул ДНК: вірусної (мавпячого вірусу SV40) і фагової *λdvgal* (фага λ) з галактозним опероном *Escherichia coli*. Стратегія переносу функціональної одиниці спадковості (гена) з одного організму в інший була розроблена американськими ученими Стенлі Коеном і Гербертом Бойєром у 1973 р. і є основою методу генної інженерії – **трансгенозу**.

У 1976 р. учені невеликої американської фірми Genentech розпочали дослідження, щоб отримати рекомбінантні ДНК. Через два роки були здійснені такі заходи:

- 1) виділені фрагменти гена (послідовності ДНК) людського інсуліну;
- 2) ці фрагменти перенесені у генетичні елементи (вектори), здатні реплікуватися у клітинах кишкової палички (*Escherichia coli*);
- 3) клітини *E. coli* синтезували людський інсулін за програмою введених фрагментів гена інсуліну;
- 4) отриманий інсулін очищали і використовували як лікувальний препарат для хворих на діабет, які мають алергічну реакцію на інсулін свині.

До середини 90-х років ХХ ст. на ринку появилось більше десяти нових біотехнологічних лікарських препаратів, понад 100 препаратів проходили клінічні випробування і понад 500 перебували на стадії розробки. Щорічний оборот молекулярно-біотехнологічної індустрії збільшився з 6 млн доларів у 1986 році до 60 млрд доларів в 2000 році.

Отже, генна інженерія є частиною молекулярної біотехнології та слугує основою для отримання кінцевих біотехнологічних продуктів (біополімерів, метаболітів, лікарських препаратів, вакцин, діагностичних методів, високопродуктивних і стійких сільськогосподарських рослин і тварин).

Завдання генної інженерії у рамках молекулярної біотехнології:

- 1) розробка методів точної діагностики, а також технологій профілактики і лікування інфекційних та генетичних (спадкових) захворювань;
- 2) конструювання мікроорганізмів, які продукують різні хімічні сполуки, антибіотики, полімери, амінокислоти, ферменти;
- 3) значне підвищення урожайності сільськогосподарських культур шляхом конструювання рослин, стійких до шкідників, грибкових і вірусних інфекцій і шкідливим впливам навколишнього середовища;
- 4) конструювання порід сільськогосподарських та інших тварин із поліпшеними спадковими ознаками;
- 5) переробка відходів, що забруднюють навколишнє середовище.

До найбільш важливих методів технології рекомбінантних ДНК належать (за Т.А. Єгоровою та співавт., 2003):

- 1) специфічне розщеплення ДНК рестриктазами, що прискорює виділення різних генів і маніпуляції з ними;
- 2) швидке секвенування усіх нуклеотидів в очищених фрагментах ДНК, що дає змогу визначити точні межі гена і кодованих ним амінокислотних послідовностей поліпептиду;
- 3) гібридизація нуклеїнових кислот, що дає змогу з великою точністю виявити специфічні нуклеотидні послідовності на основі їхньої здатності зв'язувати комплементарні основи;
- 4) клонування ДНК, суть якого зводиться до введення ДНК-фрагмента в самореplikативний генетичний апарат (плазмиду або вірус), який використовують для трансформації бактерій. Бактеріальна клітина після трансформації здатна відтворювати цей фрагмент у багатьох мільйонах ідентичних копіях;
- 5) генна інженерія, що дає змогу отримувати модифіковані версії генів, а потім їх вносити у клітини або організми.

Усі маніпуляції з генами *in vitro* здійснюються за участю різноманітних ферментів. До основних ферментів, які застосовуються у генетичній інженерії, належать специфічні ендонуклеази рестрикції та ДНК-лігази, а також ДНК-полімерази і зворотня транскриптаза.

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

За основними характеристиками (кількість субодиниць, потреба у кофакторах, специфічність сайтів розпізнавання) рестриктази поділяють на чотири класи.

У технології рекомбінантних ДНК використовують ендонуклеази рестрикції (ЕР) II типу. Системи рестрикції – модифікації типу II широко розповсюджені

серед бактерій. Їх можуть кодувати геноми археобактерій, фагів та віруси водоростей. Відомо більше 3500 ЕР типу II, які розпізнають понад 240 різних послідовностей ДНК. Системи РМ типу II є простими і найкраще вивченими. Рестрикційні ферменти зазвичай є гомодимерами і співіснують у клітинах з окремими білками – метилтрансферазами. Для вияву активності РЕ потребують лише Mg^{2+} . Відповідні метилтрансферази (МТ) потребують для своєї активності як кофактор S-аденозилметіонін, метилюють обидва ланцюги ДНК, формуючи залишки N6-метиладеніну, 5-метилцитозину або N4-метилцитозину. Розпізнають паліндромні послідовності по 4 – 8 п.н., паліндромні послідовності, які перервані неспецифічними нуклеотидами або частково паліндромні, чи несиметричні послідовності. РЕ типу II розпізнають специфічні послідовності ДНК і розщеплюють її в постійних позиціях – у цих послідовностях або на певній короткій віддалі від них. Утворюють фрагменти з 5'-фосфатами та 3'-гідроксилами на кінцях. Наприклад, ЕР *EcoRI* розпізнає та розщеплює у ДНК гексануклеотидну послідовність, утворюючи фрагменти з тетра-нуклеотидними 5'-липкими кінцями.

У генній інженерії РЕ типу II використовують для отримання певних фрагментів ДНК з певною структурою кінців. Із цією метою фрагменти фракціонують за розмірами за допомогою гель-електрофорезу та піддають іншим маніпуляціям, наприклад, з'єднують їх з іншими фрагментами. Далі визначають розміри фрагментів ДНК, порівнюючи їхню електрофоретичну рухливість із рухливістю маркерних фрагментів, розміри яких відомі. Розміщення сайтів розщеплення ЕР є постійною характеристикою молекули ДНК – її “**молекулярним маркером**”. Це дає змогу будувати фізичні (рестрикційні) карти геномів – схеми розміщення сайтів розщеплення ЕР. Віддаль між сайтами на картах визначають у парах нуклеотидів. Побудова рестрикційних карт є важливим методом вивчення організації геномів і передумовою дальших генно-інженерних процедур.

Серед інших нуклеаз, які використовуються у генній інженерії належать екзонуклеаза VII *E. coli* (розщеплює одноланцюгову ДНК з 5'- та 3'- кінців), λ-екзонуклеаза *E. coli* розщеплює дволанцюгову ДНК з 5'- кінців), екзонуклеаза III *E. coli* (розщеплює дволанцюгову ДНК з 3'- кінців), нуклеаза *Bal* *Alteromonas espejana* (розщеплює дволанцюгову ДНК 5'- та 3'- кінців), нуклеаза S1 з *Aspergillus oryzae* (розщеплює одониткову ДНК та РНК, руйнуючи одониткові кінці, що виступають одониткові петлі та одониткові ділянки навпроти прогалин, “шпилькові” структури) (див. додаток В).

ДНК-лігази – ферменти, що каталізують утворення фосфодіестерного зв'язку між 3'-ОН гідроксилем дезоксирибози і 5'-фосфатом сусідніх нуклеотидів у одноланцюговому розриві полі-нуклеотидного ланцюга ДНК. Уперше ДНК-лігазу було виділено у 1966 р. Б. Вейссоном і К. Річардсоном. У генній інженерії використовуються 2 типи ДНК-лігаз, що відрізняються потребами у кофакторах і способом дії. ДНК-лігаза *E. coli* в якості кофактора використовує дифосфопіридиннуклеотид, а лігаза фага Т4 – АТФ за наявності Mg^{2+} . Лігаза фага Т4 більш універсальна, а тому використовується частіше.

Вона здатна поєднувати фрагменти ДНК і з “тупими” кінцями, тобто повністю дволанцюгові.

Полімерази – ферменти бактерійного походження, здатні проводити синтез нуклеїнових кислот у напрямку $5' \rightarrow 3'$. Серед полімераз найчастіше використовуються:

ДНК-полімераза I *E. coli*, якій характерна $5' \rightarrow 3'$ -полімеразна активність і $5' \rightarrow 3'$ та $3' \rightarrow 5'$ -екзонуклеазна активність. ДНК-полімераза I не може ініціювати синтезу нового ланцюга. Вона каталізує приєднання нуклеотидів, які комплементарні нуклеотидам матриці, до $3'OH$ -кінця уже існуючого полінуклеотидного ланцюга (праймера).

Фрагмент Кленова – великий (76 кДа) С-кінцевий субфрагмент ДНК-полімерази I *E. coli*, має полімеразну та $3' \rightarrow 5'$ -екзонуклеазу активності. Цей фрагмент називають Кленов (Klenow)-фрагментом на честь Ганса Кленова, який вперше виділив його.

ДНК-полімераза бактеріофага T4 *E. coli*.

ДНК-полімераза бактеріофага T7 *E. coli*.

ДНК-полімераза з термофільних бактерій (Taq-, Pwo- та ін.).

РНК-залежна ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза).

Полі(А)-полімераза.

РНК-полімерази фагів T3, T7 і SP6.

Усі зазначені ферменти відрізняються за ферментативними активностями, темпом, з яким проходить полімеризація ланцюга та процесивністю – здатністю ферменту безперервно приєднувати нуклеотиди до ланцюга, що росте, не від’єднуючись від матриці. Синтез ДНК *in vitro* за допомогою ДНК-полімераз найчастіше використовують для: перетворення фрагментів ДНК з “липкими” кінцями у фрагменти з “тупими” кінцями, отримання послідовностей ДНК, які мічені радіоактивними ізотопами та нерадіоактивними мітками, синтезу кДНК на матрицях РНК, синтезу копій ДНК під час секвенування ДНК методом полімеразного копіювання (методом Сенджера), селективної ампліфікації певних послідовностей ДНК – у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).

Окрім зазначених ферментів, у технології рекомбінантних ДНК можуть використовуватися різноманітні нуклеази з ендо- та екзонуклеазними активностями, термінальна дезоксинуклеотидил-трансфераза з тимусу теляти, лужні фосфатази, полінуклеотидкіназа фага та ін. Важливо зазначити, що ферменти, що застосовуються у генній інженерії, позбавлені видової специфічності, тому експериментатор може поєднувати в єдине ціле фрагменти ДНК будь-якого походження в обраній ним послідовності. Це дає змогу генній інженерії долати встановлені природою видові бар’єри і здійснювати міжвидові схрещування.

Для розуміння технології рекомбінантних ДНК потрібно знати:

- принцип комплементарності: аденін (А) відповідає тиміну (Т) (А відповідає урацилу (У) у разі РНК), гуанін (Г) відповідає цитозину (Ц);

- при підвищенні температури до $70 - 80^{\circ}C$ полінуклеотидні ланцюги ДНК розходяться (денатурація ДНК, плавлення ДНК), при поступовому охолодженні можливе відновлення двоспіральної структури за наявності

комплементарних полінуклеотидних ланцюгів – ренативація ДНК (відпал ДНК);

- на принципі комплементарності базується гібридизація – утворення гібридів ДНК-ДНК і ДНК-РНК;

- паліндромні ділянки ДНК – місце атаки рестриктаз.

Найважливішими методами технології рекомбінантних ДНК є (за Т.А. Єгоровою та співавт., 2003):

- 1) специфічне розщеплення ДНК рестриктазами, що прискорює виділення різних генів і маніпуляції з ними;

- 2) швидке секвенування усіх нуклеотидів в очищених фрагментах ДНК, що дає змогу визначити точні межі гена і кодованих ним амінокислотних послідовностей поліпептиду;

- 3) гібридизація нуклеїнових кислот, що дає змогу з великою точністю виявити специфічні нуклеотидні послідовності на основі їх здатності зв'язувати комплементарні основи;

- 4) клонування ДНК, суть якого зводиться до введення ДНК-фрагмента в самореplikативний генетичний апарат (плазмиду або вірус), який використовують для трансформації бактерій. Бактеріальна клітина після трансформації здатна відтворювати цей фрагмент у багатьох мільйонах ідентичних копіях;

- 5) генна інженерія дає змогу отримувати модифіковані версії генів, а потім їх вносити у клітини або організми.

Широке впровадження методу технології рекомбінантних ДНК потребує відповіді на низку питань, в тому числі:

1. Чи можуть організми, отримані генно-інженерним шляхом, мати шкідливий вплив на інші живі організми або навколишнє середовище?

2. Чи не призведе створення і поширення генетично модифікованих організмів до зменшення природного генетичного різноманіття?

3. Чи маємо ми право змінювати генетичну природу людини, використовуючи генно-інженерні методи?

4. Чи не завдасть молекулярна біотехнологія шкоди традиційному сільському господарству?

5. Які віддалені ефекти використання генетично модифікованої їжі?

Ці та багато інших питань потребують державної регламентації наукових і виробничих робіт із використанням технологій рекомбінантних ДНК.

План заняття

1. Дайте характеристику ендонуклеазам рестрикції II типу – ферментам генної інженерії. Наведіть приклади.

2. Охарактеризуйте методи генної інженерії, у яких застосовують ендонуклеази рестрикції: рестриктазний, рестриктазно-лігазний, фізичне картування ДНК, геномний фінгерпринт.

3. Охарактеризуйте ДНК-полімерази, які використовуються у генній інженерії.

4. Назвіть методи генної інженерії, у яких застосовують ДНК-полімерази: синтез кДНК на матрицях РНК, метод нік-трансляції, випадкових гексануклеотидних праймерів, полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР).

5. Охарактеризуйте властивості векторів, які застосовують у генній інженерії та метод векторної трансформації.

6. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

6.1. _____ розрізають дволанцюгову спіраль ДНК за специфічними послідовностями, які складаються із чотирьох – восьми нуклеотидів (паліндроми), розділяючи її на фрагменти чітких розмірів, які називаються _____.

6.2. У 1970 р. – _____ відкрили зворотну транскрипцію – процес переписування генетичної інформації з РНК на ДНК та РНК-залежну ДНК-полімеразу (зворотну транскриптазу), за що отримали Нобелівську премію.

6.3. Рестриктази, які розпізнають однакові послідовності, але по різному їх розщеплюють, називають _____.

6.4. Дволанцюгові ДНК-копії еукаріотичних мРНК, отримані за допомогою зворотної транскриптази, можуть бути вбудовані у вектори клонування для створення _____, яка може використовуватися для виявлення окремих клонів, що відповідають окремим мРНК.

6.5. ДНК кожного виду після розщеплення рестриктазами має відмінний набір фрагментів різної довжини і, відповідно, індивідуальну картину розподілу фрагментів після електрофорезу – названий _____. Цей метод використовують для встановлення видової належності певного організму.

7. Виберіть правильну відповідь:

7.1. У генно-інженерних експериментах ДНК-лігазу застосовують для:

- а) каталізу утворення водневих зв'язків у дуплексах ДНК;
- б) об'єднання хімічно синтезованих фрагментів ДНК;
- в) об'єднання вектора та фрагмента ДНК в єдину молекулу ;
- г) з'єднання одно- з дволанцюговими фрагментами ДНК;
- д) з'єднання одноланцюгових фрагментів ДНК.

Правильна відповідь: _____.

7.2. Фермент генної інженерії нуклеаза S1:

- а) здійснює полімеризацію нуклеотидів;
- б) руйнує ділянки у 2SDНК навпроти прогалин;
- в) розпізнає паліндромні послідовності у ДНК і гідролізує їх;
- г) гідролізує «шпилькові» структури у складі ДНК та РНК;
- д) розщеплює 2SDНК з 5' та 3'-кінців.

Правильна відповідь: _____.

7.3. Скільки фрагментів утвориться після дії ендонуклеази рестрикції на лінійну молекулу ДНК, яка містить три сайти рестрикції:

- а) 1;
- б) 2;
- в) 3;

г) 4?

Правильна відповідь: _____

7.4. Синтетичні олігонуклеотиди ДНК (праймери) можна отримати за допомогою методу:

- а) полімеразна ланцюгова реакція;
- б) молекулярного клонування;
- в) ампліфікації ДНК;
- г) секвенування;
- д) хіміко-ферментативного.

Правильна відповідь: _____

7.5. Визначити, що залишається на кінцях молекули ДНК після дії на неї рестриктазою:

- а) вільні одноланцюгові 5'-кінці;
- б) вільні одноланцюгові 3'-кінці;
- в) не залишається вільних одноланцюгових кінців;
- г) реалізуються усі можливості залежно від типу рестриктази.

Правильна відповідь: _____.

8. Розв'яжіть задачу.

8.1. Ендонуклеаза рестрикції HindIII розщеплює ДНК у послідовності AAGCTT, тоді як HpaII – CCGG. Якою є середня відстань (у т.п.н.) між сайтами розщеплення ДНК цими ендонуклеазами розщеплення?

8.2. Ендонуклеаза рестрикції EcoRI діє на послідовність 5'GAATCC3', а PstI – на послідовність 5'CTGCAG3'. Визначте ймовірну кількість сайтів дії цих ензимів у хромосомі фага, яка має розмір 48,5 т.п.н. Насправді у цій хромосомі є 5 EcoRI- і 28 PstI-сайтів. Як це пояснити?

Питання для самостійного опрацювання

1. Рестриктази та лігази, які використовуються у генетичній інженерії.
2. Характеристика ДНК-полімераз, зворотної транскриптази.
3. Характеристика методів генної інженерії, у яких застосовуються ДНК-полімерази.
4. Метод векторної трансформації. Основні етапи методу та ферменти, задіяні у ньому.
5. Отримання клонотек (бібліотек) генів.
6. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), використання ПЛР.
7. Метод хімічної модифікації і термінуючих аналогів у секвенуванні ДНК.
8. Сучасні методи секвенування ДНК: принцип “секвенуючого гелю” (“драбинки”).
9. Методи секвенування ДНК нового покоління: Roche/454 Life Sciences, Illumina/Solexa, Applied Biosystems/SOLiD, одномолекулярне секвенування Helicos Biosciences, одномолекулярне секвенування у реальному часі Pacific Biosciences, Ion Torrent секвенування, нанопорове секвенування.
10. Розв'яжіть задачу:

А. Препарат лінійної вірусної ДНК обробили вказаними у таблиці ендонуклеазами рестрикції та їх комбінаціями.

Фермент	Розміри фрагментів (т.п.н.)
BglII	5 та 10
HpaII	5 та 10
SmaI	2 та 13
BglII, HpaII	5
BglII, SmaI	2,5 та 8
HpaII, SmaI	2,3 та 10

Отримані набори фрагментів піддали електрофорезу і визначили їхні розміри. Використавши наведені у таблиці дані, побудуйте рестрикційну карту вірусної ДНК.

Б. Ділянка ДНК 5'CGAACATATGGAGT3' (наведено послідовність одного з ланцюгів) містить сайт ендонуклеаза рестрикції класу II, яка розпізнає послідовність із шести нуклеотидів. Яка найбільш ймовірна послідовність цього сайту?

В. Препарат кільцевої плазмідної ДНК обробили ендонуклеазами рестрикції та їх комбінацією (див. нижче таблицю), а потім проаналізували фрагменти за допомогою електрофорезу у гелі

Фермент	Розміри фрагментів (т.п.н.)
XmaI	20
MboI	10
XmaI, MboI	3,7 та 10

Використовуючи ці дані, побудуйте рестрикційну карту цієї плазміди.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Федорко, Харьков, 2008. – С. 193 – 210.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 50 – 77, 88 – 102.
3. Федоренко В.О. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. 523 – 568.
4. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т.А. Компанець. – К. : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. – С. 6 – 28.
5. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 163 – 267.
6. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 7 – 79.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

Генна інженерія рекомбінантних білків

Мета: ознайомитися з генно-інженерними методами отримання рекомбінантних білків за використання прокаріотичних та еукаріотичних систем.

Теоретичні відомості

Генна інженерія пов'язана зі скерованим створенням нових комбінацій генетичного матеріалу. Суть цієї технології полягає у виділенні фрагментів ДНК, їхньому об'єднанні з векторними системами *in vitro* та наступним введенням цих нових (рекомбінантних) генетичних структур до живої клітини, де новостворений генетичний матеріал здатний розмножуватися і забезпечувати синтез кінцевих продуктів (див. додаток Е). Серед багатьох біологічних об'єктів, що переважно використовуються у ролі систем для клонування чужорідних генів, – *E. coli*, одноклітинні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і різні клітинні системи тваринного походження (комах, рослин і ссавців). Усі вони успішно використовуються для отримання рекомбінантних білків, що кодуються клонованими генами.

Функціонально активні рекомбінантні молекули ДНК мікроорганізмів уперше (у 1973 р.) були сконструйовані С. Коеном, Д. Хелінським, Г.Бойсром та їхніми співробітниками. Одночасно науковою групою С. Коена була розв'язана проблема об'єднання фрагментів ДНК різного походження з векторними молекулами ДНК (плазмід, бактеріофагів). За допомогою ферментів рестриктаз і лігаз були сконструйовані перші “химерні” плазміди, у складі яких були “зшиті” в одну кільцеву молекулу фрагменти ДНК не тільки різних видів бактерій, а й різних рослин і тварин. Відтоді створено могутню техніку генної інженерії, спеціальну апаратуру, розроблено методи виділення генів, їхньої ампліфікації, секвенування, клонування, а також підходи до їхньої експресії у гетерологічних системах – бактерійних клітинах, клітинних лініях тваринного і рослинного походження (див. додатки З – М).

Прокаріотичні системи експресії успішно використовуються для синтезу багатьох білків. Проте деякі еукаріотичні білки для перетворення їх в активну форму зазнають специфічних посттрансляційних модифікацій – глікозилювання, фосфорилування чи ацетилювання, а бактерії до цього не здатні. Тому було розроблено нову стратегію експресії клонованих генів в еукаріотичних клітинах за допомогою спеціально сконструйованих еукаріотичних експресибельних векторів. Для цього було використано дріжджі *S. cerevisiae*, геном яких добре вивчений, і до того ж їх можна вирощувати у великих ферментерах. Щоб спростити очистку білків, були сконструйовані вектори, що забезпечують їхню секрецію в *S. cerevisiae*, у результаті чого отримали багато різноманітних **ауθενтичних білків**. Проте багато рекомбінантних білків у цій системі не зазнавали посттрансляційних модифікацій, і до того ж їх вихід був невисокий. Тому пізніше було розроблено

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

На основі бакуловірусів розроблена більш досконала система експресії – **бакміда** – човниковий вектор *E. coli*/ клітини-комахи, який дає можливість проводити усі генно-інженерні маніпуляції у клітинах *E. coli*. Для цього клітини комах трансфікують рекомбінантною бакмідою тільки для отримання гетерологічного білка. За використання експресибельної системи отримують приблизно 95 % гетерологічних білків із відповідними посттрансляційними модифікаціями.

Позахромосомні експресибельні вектори ссавців здебільшого використовують для синтезу гетерологічних білків, які використовуються для наукових і медичних потреб. Вони є човниковими векторами із сайтами ініціації реплікації вірусу тварин і *E. coli*-плазміді. Регуляторні елементи транскрипції здебільшого походять від геному вірусу тварин чи ссавців. Для відбору трансфікованих клітин використовують домінантні селективні маркерні гени. Наприклад, деякі системи добору базуються на введенні у середовище зростаючої кількості цитотоксичної сполуки, яка забезпечує добір клітин із великою кількістю копій вектора, що збільшує вихід чужорідного білка.

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

Розроблений арсенал підходів дає можливість створювати трансгенні організми, штами, клітинні лінії, які володіють цінними властивостями, наприклад, бактерійні штами, здатні синтезувати еукаріотичні білки. Серед білкових продуктів, отриманих генно-інженерними методами, – гормони (інсулін, соматотропін, соматостатин тощо), інтерферони, антигени, антитіла, ферменти.

Із виникненням технології рекомбінантних ДНК стало можливим створювати нові біополімери, замінювати синтетичні продукти їх біологічними аналогами, модифікувати існуючі біополімери для поліпшення їх фізичних і структурних характеристик, збільшувати ефективність деяких промислових процесів, зменшувати їх собівартість.

План заняття

1. Ознайомтеся з біологічними об'єктами і особливостями їх застосування у молекулярній біотехнології для отримання рекомбінантних білків та дайте відповіді на запитання:

1.1. Які біологічні об'єкти використовуються у молекулярній біотехнології для отримання рекомбінантних білків?

1.2. Які основні властивості *E. coli* дають змогу проводити у її клітинах клонування генів?

1.3. Назвіть методи введення рекомбінантних плазмід до клітин *E. coli*.

1.4. Які причини визначили вибір *S. cerevisiae* як об'єкта для клонування генів?

1.5. Що таке селективні маркерні гени? Наведіть приклади.

2. Зарисуйте та охарактеризуйте схему клонування гена інсуліну людини за використання *E. coli* та опишіть стратегію скринінгу інсулін-продукуючих клонів.

3. Ознайомтеся з підходами для оптимізації експресії генів, які клоновані у прокаріотичні системи, та дайте відповіді на запитання:

3.1. Як можна вплинути на експресію генів, що клоновані у прокаріотичні організми?

3.2. Чому плазмідний вектор із максимально сильним промотором не завжди є найкращим експресибельним вектором?

3.3. Що таке химерні білки? Іноді стратегія синтезу білка-мішені включає отримання цільового білка у складі химерного продукту. У чому перевага такого підходу?

3.4. У чому перевага локалізації чужорідних білків на поверхні клітин? Які підходи використовуються для того, щоб зробити рекомбінантні білки секреторними?

3.5. Послідовність-мішень може бути вбудована у хромосомну ДНК двома способами: сама собою, або у складі плазмиди, що несе цю послідовність. Охарактеризуйте кожен із цих процесів. Які переваги чи недоліки має інтеграція плазмідного вектора у ДНК клітини-господаря?

4. Ознайомтеся з підходами для отримання рекомбінантних білків за допомогою еукаріотичних систем та дайте відповіді на запитання:

4.1. Чому для отримання білків, які використовуються у медицині, кращими є еукаріотичні, а не прокаріотичні системи?

4.2. Які переваги і недоліки мають різні типи дріжджових векторів, призначені для отримання певного рекомбінантного продукту?

4.3. Зазначте основні властивості інтегративної векторної системи *P. pastoris*, що володіє високим рівнем експресії.

4.4. Що таке бакуловіруси? бакміда?

4.6. Що таке афінна мітка? Вкажіть її призначення.

4.7. Назвіть основні властивості позахромосомного експресибельного вектора ссавців.

4.8. Опишіть хоча б дві селективні системи, які використовуються у випадку експресибельних векторів ссавців.

4.9. Опишіть різні підходи до створення систем синтезу двох рекомбінантних білків в одній клітині ссавця.

4.10. Якими критеріями керуються при виборі системи експресії генів гетерологічних білків (дріжджі, система експресії на основі бакуловірусів, клітини ссавців)?

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

5.1. Щоб з'ясувати, чи містить цей клон ДНК, що кодує раніше охарактеризований білок, часто проводять _____, тобто клонувану ДНК використовують для того, щоб відібрати відповідну мРНК, продукт трансляції якої можна потім порівняти з відомим білком.

5.2. Новий гібридний ген, який кодує _____, може бути утворений шляхом з'єднання частин кодуючих послідовностей двох різних генів.

5.3. У клітинах зародкової лінії у _____ мишей наявні хромосоми зі стабільними змінами, які виникли у результаті інтеграції клонованої ДНК.

5.4. Колонія клітин, яка походить від однієї клітини, називається _____.

5.5. Окрема колонія бактерій, яка містить плазмиду із включеним у неї фрагментом ДНК людини, називається _____; набір таких бактерій, які містять увесь геном людини, складає _____.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. Синтетичні олігонуклеотиди ДНК (праймери) можна отримати за допомогою методу:

- а) полімеразна ланцюгова реакція;
- б) молекулярного клонування;
- в) ампліфікації ДНК;
- г) секвенування;
- д) хіміко-ферментативного.

Правильна відповідь: _____.

6.2. Оберіть організми, для яких сконструйовані експресибельні вектори на основі ДНК бакуловірусів для експресії білків:

- а) бактерії;
- б) дріжджі;
- в) клітини комах;
- г) клітини ссавців.

Правильна відповідь: _____.

6.3. Імуноферментний ELISA-тест використовують для ідентифікації:

- а) мієлоїдних клітин;
- б) антитіл;
- в) ДНК;
- г) РНК;
- д) антигенів.

Правильна відповідь: _____.

6.4. Вкажіть дві найголовніші з перерахованих проблем експресії еукаріотичних білків у бактерійних клітинах:

- а) наявність у бактерій хроматинових структур;
- б) наявність у бактерій еукаріотичної системи поліаденілювання мРНК;
- в) відсутність у бактерій еукаріотичної системи сплайсингу мРНК;
- г) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій.

Правильна відповідь: _____.

6.5. Визначте, які з перерахованих проблем експресії еукаріотичних білків притаманні бактерійним клітинам:

- а) наявність у бактерій хроматинових структур;
- б) наявність у бактерій еукаріотичної системи поліаденілювання мРНК;
- в) відсутність у бактерій еукаріотичної системи кепування мРНК;
- г) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій.

Правильна відповідь: _____.

Питання для самостійного опрацювання

1. Експресія генів за участю сильних регульованих промоторів.
2. Химерні білки. Розщеплення химерних білків, їх використання.
3. Методи стабілізації рекомбінантних білків.
4. Методи інтеграції чужорідної ДНК у хромосому господаря.
5. Підходи до підвищення ефективності секреції рекомбінантних білків.
6. Системи експресії *S. cerevisiae*:
 - вектори для *S. cerevisiae*;
 - пряма експресія у *S. cerevisiae*.
7. Секреція гетерологічних білків, які синтезуються у *S. cerevisiae*.
8. Дріжджові системи експресії рекомбінантних білків.
9. Системи експресії за використання культур клітин комах.
10. Експресибельні вектори для роботи з клітинами ссавців.

Література

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 15 – 28, 50 – 157.
2. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т.А. Компанець. – К. : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. – С. 13 – 81.
3. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 161 – 239; 313 – 371.
4. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посібник [для студентів біологічних факультетів університетів] / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. – С. 178 – 236.
5. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 12 – 36, 80 – 166, 204 – 428.

Практичне заняття № 3

Генна інженерія мікроорганізмів

Мета: ознайомитися з основними методами генно-інженерного конструювання штамів мікроорганізмів – продуцентів біологічно активних речовин.

Теоретичні відомості

Початком промислової генетичної інженерії прийнято вважати 1980 рік, коли у США був виданий перший патент на модифікований штам бактерій *Pseudomonas sp.*, здатен розкласти парафіни нафти (див. додаток Г). У 1982 р. було дозволено для клінічного використання одержаний мікробіологічним синтезом перший лікарський препарат – людський інсулін. Сьогодні промислова мікробіологія розвивається у кількох напрямках:

- 1) виробництво продуктів біосинтезу трансгенних мікроорганізмів, наприклад, антибіотиків, гормонів, ферментів, вітамінів;
- 2) використання біомаси мікроорганізмів – виробництво медичних вакцин, різноманітних дріжджів, білково-вітамінних концентратів і заквасок для одержання кисломолочних продуктів і силосування кормів;
- 3) біотехнології, що базуються на унікальних здатностях деяких бактерій синтезувати органічні кислоти, етанол, вуглеводи та метан. Сюди ж належить і переробка деяких відходів із можливістю одержання корисних сполук, насамперед, горючих газів.

У напрямі **генної інженерії мікроорганізмів** більша частина досліджень спрямована на добір продуцентів ферментів, вітамінів, антибіотиків, органічних кислот та інших корисних речовин. Відомо, що ферменти, отримані за допомогою генетично змінених бактерій, застосовують при випіканні хліба (тісто при цьому освітлюється, а хліб стає пухким). У Німеччині одержано трансгенним шляхом пектинази для виробництва соків, оскільки у соках і винах пектинази відсутні. У багатьох країнах, наприклад, Європейського союзу, Австралії, Новій Зеландії і ін. реєстрація продуктів, одержаних за допомогою таких «нетрадиційних» ферментів, є обов'язковою.

З 70-х рр. минулого століття починається цілеспрямоване конструювання штамів продуцентів різних біологічно активних речовин з використанням методів генної інженерії. Перші штам-продуценти конструювалися на основі клітин *E. coli*. У 1977 – 1979 рр. на основі цих бактерій були сконструйовані штам-продуценти соматостатину, інсуліну та гормону росту людини, що спонукало до виникнення багатьох біотехнологічних процесів. Головно, це процеси отримання білків людини, сільськогосподарських тварин, або їх вірусів. Число таких білків наближається до ста, хоча кількість препаратів, які дозволено використовувати, поки що невелика – це інсулін, лейкоцитарний інтерферон, деякі вакцини, діагностикуми тощо. Тепер коло мікроорганізмів, на основі яких конструюють генно-інженерні штам-продуценти, істотно розширено.

Основна перевага мікроорганізмів як об'єктів селекції продуцентів – простіша організація генетичного апарату порівняно з еукаріотами. Тому клонування генів у клітини рослин і тварин здійснюється на основі їх первинного клонування у мікробних клітинах. Методи сучасної селекції продуцентів ґрунтуються на генетичному конструюванні *in vivo* і *in vitro*. Генетичне конструювання *in vivo* дає змогу отримати і виділити мутанти, використовуючи різні способи обміну генетичною інформацією між живими мікробними клітинами: гібридизацію, кон'югацію, трансформацію, трансдукцію, транспозиційний мутагенез і злиття протопластів. Генетичне конструювання *in vitro* засноване на введенні індивідуальних фрагментів ДНК у живу клітину з отриманням рекомбінантних генетичних структур із заданими властивостями.

Важливе значення для конструювання штамів з бажаними ознаками мають **методи спрямованої передачі генетичної інформації до клітини-реципієнта** (трансформація, трансдукція, кон'югація). Однак обмін ділянками ДНК у цих випадках обмежений видовими особливостями представників і має односпрямований характер. Цей бар'єр долають, використовуючи позахромосомні молекули ДНК, здатні до автономної реплікації (плазмід), а також **метод злиття протопластів**. У першому випадку транспортерами (векторами) чужорідної ДНК до бактерійної клітини слугують плазмід (див. додаток Д), що є основою **методу векторної трансформації клітин**. Для виявлення генетичної інформації цієї ДНК, її вводять до клітини шляхом векторної трансформації. Якщо гібридна плазміда, проникнувши у бактерійну клітину, буде копіюватися, то разом з нею копіюватиметься і чужорідна ДНК. Потомство клітини, що містить гібридну ДНК, генетично однорідне, воно утворює клон. Відповідно цей метод отримав назву **клонування генів** (див. додаток Е). Він дає змогу вводити до клітини бактерій не тільки генетичну інформацію інших мікроорганізмів, а й вищих організмів, та отримати білки тварин та людини (інсулін, соматотропін, інтерферон та ін.).

Метод гібридизації соматичних клітин дає змогу отримати рекомбінанти, що поєднують ознаки обох батьківських форм. З цією метою одержують протопласти, індукують їхнє злиття шляхом обробки поліетиленгліколем та здійснюють відбір на селективних середовищах. Злиття протопластів є одним з основних методів скерованого отримання штамів мікроорганізмів з бажаними ознаками.

Для отримання стабільних (неревертуючих) мутацій у певному гені застосовують **метод інсерційного локалізованого мутагенезу**. Для цього ген клонують на плазміді і вбудовують у нього фрагмент ДНК, що кодує стійкість до антибіотика. Потім клітини трансформують сконструйованою гібридною плазмідною з зазначеним детермінантом, фланкований послідовностями, гомологічними хромосомному гену. У результаті подвійного кросинговеру відбувається інтеграція цільового гена у гомологічну ділянку хромосоми. Трансформантів добирають на селективних середовищах з антибіотиками.

Внесення специфічних змін у кодуючі послідовності ДНК, що ведуть до певних змін в амінокислотних послідовностях, називається **спрямованим**

мутагенезом. Для спрямованого мутагенезу клонованих генів використовують різні експериментальні підходи:

- в одних випадках вносять зміни у специфічні сайти клонованого гена (сайт-специфічний мутагенез);
- в інших – випадково змінюють короткий фрагмент клонованого гена (випадковий мутагенез).

Одним із найпростіших методів внесення точкових мутацій в клонований ген є **сайт-специфічний** (олігонуклеотид-спрямований) **мутагенез**. Уперше методику олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу застосував Д. Хатчінсон у 1978 р. під час мутагенезу фага фХ 174. Для його проведення необхідно знати: 1) точну нуклеотидну послідовність тієї ділянки ДНК, яку потрібно змінити і 2) характер амінокислотних замін.

Традиційна схема сайт-специфічного мутагенезу:

- фрагмент ДНК, у якому необхідно отримати мутацію, переводять в одониткову форму на будь-якому фаговому векторі;
- синтезують олігонуклеотид розміром 7 – 21 п. н. (синтез олігонуклеотидів – лінкерів, адаптерів, праймерів, промоторів – здійснюють хімічним способом, нарощуючи їх ланцюги шляхом приєднання певних ланок до заданої послідовності). Синтезований олігонуклеотид має бути комплементарний сайту ДНК, у якому передбачається ввести мутацію. При цьому дослідник може отримати на ньому різні точкові мутації – делеції, вставки, транзиції і трансверсії, які мають бути в центральній частині нуклеотиду;
- олігонуклеотид гібридизують з одноланцюговою фаговою ДНК і використовують для синтезу *in vitro* другого ланцюга ДНК. Ці маніпуляції здійснюють за допомогою Klenow-фрагмента ДНК;
- за допомогою лігази отримують ковалентно замкнуте кільце фагової ДНК, нуклеази S1 усувають незавершені продукти синтезу;
- кільцевою ДНК трансформують сферопласти *E. coli*. Після трансформації та подальшого акту реплікації потомство аналізують на наявність клітин дикого типу і мутантів (їх співвідношення має бути рівним 1: 1). Вихід мутантів можна збільшити, якщо сумарну ДНК, виділену з фагів, повторно використовувати для синтезу *in vitro* за допомогою тих самих синтетичних праймерів.

Існує кілька типів олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу з використанням: 1) ДНК фага M13, 2) плазмідної ДНК, 3) ПЛР-ампліфікації. Конструювання *in vitro* має на меті створення клітинних клонів, які несуть рекомбінантні молекули ДНК із заданими властивостями.

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

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

Вектори, які використовуються у конструюванні генно-інженерних бактерій мають відповідати деяким вимогам, що полегшують з ним роботу:

1) бажано, щоб вектор мав велике число унікальних сайтів рестрикції для різних рестриктаз, за якими можна здійснювати введення фрагментів чужорідної ДНК;

2) векторна молекула має бути невеликих розмірів і мати значну кількість копій на клітину, що забезпечує більшу ампліфікацію чужорідних генів при введенні в клітину рекомбінантних молекул ДНК, сконструйованих на основі цього вектора;

3) вектор має мати селективні маркери, за якими можна розрізняти клони, що містять вихідні та рекомбінантні молекули вектора.

Як вектори зазвичай використовують:

- ДНК власних плазмід;
- ДНК фага λ ;
- похідні фага λ (фагміди і косміди);
- ДНК бактеріофага M13.

Вибір вектора визначається завданнями, які ставить перед собою дослідник. Є вектори для ампліфікації, секвенування генів, а також інтеграційні, або човникові тощо. Вектори можуть бути високо копіювальними молекулами, мати потужні промотори, розташовані поруч з сайтами клонування генів, широке коло клітин-реципієнтів.

На другому місці після *E. coli* за рівнем своєї генетичної і біохімічної вивченості є представник бацил – *B. subtilis*. Бацили – це промислово цінні мікроорганізми, що мають добре організовану секрецію метаболітів та високу протеазну активність та є тепер одними із головних об'єктів генно-інженерних досліджень. Це пов'язано насамперед з тим, що промисловість упродовж тривалого часу використовує ці мікроорганізми для отримання екзоферментів (протеїназа, α -амілаза), антибіотиків (бацитрацин), засобів захисту рослин (ентомобактерії) і інші.

Останніми роками досягнуто значних успіхів у конструюванні плазмідних векторів для клонування в клітинах *B. subtilis*. Основною складністю при створенні плазмідних векторів для цих бактерій є те, що більшість плазмід, виявлених у цих клітинах, не містить селективних маркерів і є генетично нестабільні. Однак деякі мультикопіювальні плазмідні *Staphylococcus* і *Streptococcus*, що мають гени стійкості до антибіотиків, можуть трансформувати клітини *B. subtilis*, стабільно у них реплікуватися і експресувати гени.

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

Для генної інженерії найцікавішими є дворепліконні (човникові) гібриди, здатні експресуватися у клітинах різних господарів, наприклад, у *E. coli* і клітинах дріжджів або тварин. Зокрема, у 1980 р. на основі плазмід pBR322 і

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

Бірепліконний вектор pHP13 має усі ознаки сучасних векторів. З плазмиди pUC9 був перенесений локус, що несе частину гена β -галактозидази (LacZ') лактозного оперона *E. coli*. Він забезпечує реплікацію в клітинах і пошук клонів з рекДНК. Селективні маркери Cm^R до і Em^R pC194, взяті з плазмиди pE194, забезпечують експресію в обох видах клітин. Число плазмідних копій у клітинах *B. subtilis* – 5, а в *E. coli* – приблизно 200.

На основі вектора pHP13 сконструйований **вектор прямої селекції pHP59**, який дає змогу відбирати трансформанти *B. subtilis* з рекДНК. Додатковий елемент у цього вектора – ген із конститутивною експресією хромосоми *B. pumilus*, який міститься в одній трансляційній рамці з фрагментом LacZ' і тому забезпечує в клітинах *B. subtilis* синтез функціонального α -пептиду β -галактозидази у складі гібридного білка.

Методи клонування генів у *Streptomyces* розроблені в 1980 р. і пов'язані з активним зростанням досліджень у сфері генетики актиноміцетів. *Streptomyces* – грампозитивні ґрунтові мікроорганізми, геном яких представлений однією кільцевою хромосомою, що містить 10^4 т. п. н. Найбільш вивчений вид – *Streptomyces coelicolor*. Для цього штаму розроблена детальна генетична карта, на якій картовані найбільш істотні ауксотрофності мутації.

Стрептоміцети є основними природними продуцентами антибіотиків (більше 60% усіх відомих антибіотиків синтезуються цими мікроорганізмами), до того ж вони відрізняються унікальною здатністю синтезувати антибіотики різних видів. Наприклад, *S. coelicolor* продукує 4 різні види антибіотиків, а *S. clavuligerus* – більше 30. Тому цей об'єкт займає центральне місце в дослідницькій роботі фармацевтичних лабораторій.

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

Низькокопіювальні вектори мають один суттєвий недолік: складність отримання великої кількості ДНК. Із таких плазмід у *Streptomyces* найбільше використовують SLP1.2, представлену 4 – 5 копіями. Отримано похідні цієї

плазмід, що містять селективні маркери стійкості до тиострептону і неоміцину. Плазміда містить унікальні сайти для рестриктаз *Bam*HI і *Pst*I. Клонування у цих сайтах веде до експресії чутливого до неоміцину фенотипу.

Об'єктом особливої уваги генетиків, біотехнологів є актиноміцети – продуценти більше 70%, антибіотиків, які використовують у медицині і ветеринарії. Актиноміцети – найбільш складно організовані прокаріоти, які мають геном, майже в 3 рази більший, ніж геном бактерії ($\sim 1 \cdot 10^4$ МДа).

Зараз інтенсивно розробляються системи для клонування генів у *Pseudomonas*. Використання цих мікроорганізмів є дуже перспективним. По-перше, це промислово цінні бактерії, по-друге, вони містять плазмід біодеградації, що забезпечує їм низку унікальних властивостей – ріст на простих субстратах, таких, як метанол, симбіоз із рослинами і особливо незвичайно висока здатність катаболізувати різні органічні речовини. Серед псевдомонад найбільш вивчені є *P. putida* і *P. aeruginosa*. Для названих видів складені генетичні карти, широко використовується генетичний аналіз, заснований на використанні кон'югативних плазмід, які можуть мобілізувати перенесення хромосомних генів. Дуже зацікавлюють плазмід, що володіють широким колом господарів, наприклад, RK2 і RSF1010.

Плазміда RK2 є кон'югативною і має розмір 60 т.п.н. Вона малокопіювальна і містить детермінанти стійкості до канаміцину і ампіциліну.

Плазміда RSF1010 є некон'югативною і має невеликий розмір 8,68 т.п.н. Вона мультикопіювальна і містить маркери стійкості до стрептоміцину і сульфонамідів. Ця плазміда за допомогою кон'югативних плазмід може ефективно мобілізуватися у багатьох видів бактерій, включаючи грампозитивні. На основі цих плазмід сконструйовані вектори серії ПКТ і ФПК, що дають змогу проводити клонування в сайтах *Eco*R1, *Sst*I, *Hind*III, *Bam*HI і ін. Ці вектори здатні реплікуватися у грамнегативних бактеріях *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida* і ін.

Вектори на основі бактеріофагів. Клонування генів у плазмідних векторах ефективно, якщо розмір вставки не перевищує 10 т.п.н. Зі збільшенням розміру клонованого фрагмента вихід рекомбінантів різко падає. Тому для клонування великих фрагментів ДНК необхідно використовувати інші векторні молекули, наприклад на основі бактеріофагів. Перші вектори на основі бактеріофага λ були сконструйовані у 1974 р.

До перспективних об'єктів генетичної інженерії належать фототрофні ціанобактерії, які асимілюють сонячну енергію, а тому є потенційно найбільш вигідними продуцентами будь-якого виду речовин. На основі застосування цих мікроорганізмів розвивається фотобіотехнологія, задачею якої є виробництво біомаси як джерело біогазу, кормового і харчового білка, цінних біопрепаратів і хімічної сировини. Деякі ціанобактерії можуть використовуватися для промислового отримання водню і аміаку, для очистки стічних вод, біодеградації токсичних речовин і переробки відходів різних виробництв і сільського господарства.

Застосування методів генетичної інженерії до ціанобактерій відіграє важливу роль у розшифровці фундаментальних проблем регуляції процесів

азотфіксації і клітинної диференціації, які характерні для нитчастих форм ціанобактерій. Ці мікроорганізми цікаві і як об'єкти молекулярної генетики, про що свідчить той факт, що сьогодні клоновано уже більше 30 різних генів ціанобактерій.

Останніми десятиліттями зростає увага дослідників до дріжджів як об'єктів молекулярної генетики і генної інженерії. Основним об'єктом досліджень є пекарські дріжджі *S. cerevisiae*, що генетично і біохімічно добре вивчені, а також, починаючи з 1978 р. для цього об'єкта успішно розробляється методологія генетичної інженерії. Тепер для дріжджів розроблено два типи векторів – інтегративні та реплікативні. Інтегративні вектори є бактерійними плазмідами з клонованим індивідуальними генами дріжджів. Ці вектори інтегрують у хромосому шляхом гомологічної рекомбінації. Реплікативні вектори містять реплікон 2 мкм плазмиди дріжджів, або реплікон 3 мкм плазмиди, яка є екстрахромосомною копією кластера рДНК.

Методологія генетичної інженерії починає розроблятися і для інших видів дріжджів: *P. pinus*; *P. guilliermondii*, *Schizosaccharomyces pombe*. Великим досягненням є клонування генів, які відповідають за утилізацію метанолу у *Hansenula polymorpha*. Отже, сьогодні, є достатньо великий набір векторних молекул, який дає змогу клонувати в дріжджових клітинах як власні, так й гетерологічні гени.

Механізми ініціації транскрипції і її термінації, сплайсингу, модифікації мРНК дріжджів мають унікальні особливості і не співпадають з прокаріотичними та вищих еукаріот. Експресовані чужорідні гени, які клоновані у дріжджах, не мають мати інтронів і мають бути адаптовані під регуляторні елементи добре експресибельних генів дріжджів. Уже сконструйовані вектори, які містять “сильні” промотори структурних генів дріжджів: алкогольдегідрогенази, фосфогліцераткінази, глісеральдегідфосфатгідрогенази тощо. Інші варіанти експресійних векторів містять послідовність UAS (*upstream activation sequence*) деяких регуляторних генів. Ця послідовність багатократно активує транскрипцію. Сконструйовані вектори, що містять промотори й сигнальні послідовності секреторних білків, таких як α -фактору, інвертази, забезпечують не тільки правильний процесинг, але й секрецію у культурне середовище зрілих чужорідних білків. Вони були використані для синтезу в дріжджових клітинах соматотроніну людини і глюкоамілази *Aspergillus*.

Успіхи генної інженерії і генетики дріжджів дають можливість сподіватися, що найближчими роками матимуть реальне втілення виробництва, які використовують модифіковані генно-інженерними методами дріжджі як в традиційних процесах, так і для отримання чужорідних білків. Чималий успіх у цьому залежить від конструкції біореакторів, які сьогодні на ринку представлені великою різноманітністю типів (див. додаток В).

План заняття

1. Ознайомтеся з промисловими штамами мікроорганізмів, модифіковані методами генетичної інженерії, та заповніть таблицю:

Види промислових мікроорганізмів	Речовини та/ чи продукти, які ними синтезуються

2. Ознайомтеся з методами генетичного конструювання промислових штамів мікроорганізмів, дайте відповіді на запитання і заповніть таблицю:

2.1. Сформулюйте основне завдання селекційної роботи із штамми-продуцентами.

2.2. У яких випадках для конструювання штама-продуцента використовують індукований мутагенез та ступінчастий відбір?

2.3. Поясніть, чому в одних випадках при конструюванні промислових штамів отримують ауксотрофні мутанти, а в інших – регуляторні мутанти.

2.4. Охарактеризуйте підходи, що використовуються під час культивування штаму-продуцента для збільшення виходу цільового метаболіту.

2.5. Заповніть таблицю:

Методи генетичного конструювання	Штами промислових продуцентів	Речовини та/ чи продукти, які ними синтезуються

3. Ознайомтеся з характеристикою деяких векторних систем мікроорганізмів та заповніть таблицю:

Вектор	Вид мікроорганізму, для якого розроблений вектор	Характеристика вектора
• pBR325 • pUC18/19 • косміда • λ-вектор • штучна хромосома на основі фага P1 • бактерійна штучна хромосома		

4. Ознайомтеся з методами скринінгу штамів мікроорганізмів та заповніть таблицю:

Метод скринінгу	Принцип методу

5. Виберіть правильну відповідь:

5.1. Для селекції мутантних штамів мікроорганізмів використовують методи ... :

- а) висівання чутливих клітин на поживний агар, який містить антибактерійний агент;
- б) відбитків (реплік);
- в) фільтраційного збагачення;
- г) інсерційного мутагенезу.

5.2. За допомогою якого методу отримують ауксотрофні мутанти:

- а) фільтраційного збагачення;
- б) відбитків (реплік);
- в) індукованого мутагенезу;
- г) висівання чутливих клітин на поживний агар, що містить антибактерійний агент.

5.3. У тисячі разів підвищити частоту виникнення мутацій можна, використовуючи... :

- а) генетичну рекомбінацію;
- б) мутагени;
- в) злиття протопластів;
- г) векторну трансформацію.

5.4. Результати мутацій можуть проявлятися у різних змінах метаболізму клітини. Навіть ці зміни:

- а) підвищення рівня синтезу ферментів чи їхньої активності;
- б) блокування подальшого внутрішньоклітинного перетворення метаболіту;
- в) блокування деградації продукту;
- г) забезпечення ефективної секреції продукту з клітини;
- д) посилення позитивної регуляції синтезу продукту.

5.5. Для виробництва різних мікробних препаратів застосовують....:

- а) природні штами мікроорганізмів;
- б) мутантні штами, змінені в результаті мутагенезу;
- в) штами, сконструйовні методами генетичної інженерії.

Питання для самостійного опрацювання

1. Методи селекції промислових штамів мікроорганізмів.
2. Мутагенез і методи мутагенезу.
3. Принципи використання мутагенів у селекції мікроорганізмів.
4. Ступінчаста селекція промислових штамів мікроорганізмів.
5. Основні рівні регуляції біосинтезу метаболітів та використання їхніх закономірностей у селекції мікробних продуцентів цінних речовин.
6. Методи селекції мутантів-надсинтетиків амінокислот.
7. Плазмиди і кон'югація у бактерій.
8. Косміди і фагміди. Переваги фагових векторів.

9. Використання трансформації, кон'югації і трансдукції у конструюванні промислових штамів мікроорганізмів.
10. Фенотипова селекція клонів клітин, що містять рекомбінантні ДНК.
11. Використання імунологічних методів у доборі штамів продуцентів.
12. Використання ДНК-ДНК і ДНК-РНК гібридизації у доборі штамів продуцентів.
13. Конструювання та скринінг геномних бібліотек.
14. Секреція генно-інженерних білків шмамами мікроорганізмів, їх стабільність і деградація.
15. Характеристика векторів на основі фага $\mu 13$.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 16 – 46.
2. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии/ В. . Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 315 – 350.
3. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець : навч. посібник [для студентів біологічних факультетів університетів].– Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. – С. 178 – 236.
4. Яворська Г. В. Промислова мікробіологія : навч. Посібник / Г.В. Яворська, С.П., Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів, 2008. – С. 21 – 38.

Практичне заняття № 4

Генетична інженерія культур клітин

Мета: ознайомитися з методами клітинної та генної інженерії, спрямованих на конструювання генно-інженерних культур клітин і тканин та їх використанням у біотехнології та медицині.

Теоретичні відомості

Генетична інженерія (грец. *genesis* – походження) – наука, яка виникла на межі молекулярної біології, молекулярної генетики, біотехнології тощо, метою якої є конструювання організмів і клітин з новими комбінаціями спадкових ознак методами клітинної і генної інженерії.

Клітинна інженерія включає сукупність експериментальних процедур та технологій з різними видами клітин і типами тканин, спрямованих на отримання за їхнього використання біологічно активних речовин, або на їхнє поліпшення, удосконалення чи зміну, набуття нових властивостей та ознак. Генетичне конструювання нових форм *in vivo* включає отримання і виділення мутантів та використання різних способів обміну генетичною інформацією між живими клітинами.

Клітинна інженерія ґрунтується на таких маніпуляціях, як культивування клітин рослин, тварин, грибів *in vitro*; гібридизація соматичних клітин та отримання гібридів за допомогою злиття протопластів; перенесення генетичної інформації за допомогою ізольованих ядер, хромосом, клітинних органел, які містять ДНК (мітохондрії, пластиди). Одним з основних методів клітинної інженерії є **злиття нестатевих клітин** (гібридизація соматичних клітин) з утворенням гібридних клітин. Злиття клітин може бути неповним, коли клітина-реципієнт набуває окремі властивості клітини-донора (мітохондрії, цитоплазму, ядерний геном, хлоропласти і ін.). До рекомбінації ведуть різні способи обміну генетичною інформацією живих клітин (статевий і парасексуальний процеси еукаріотичних клітин; трансформація, кон'югація і трансдукція у прокаріот, злиття протопластів).

Інтенсивному розвитку клітинної інженерії сприяла розробка **методу культур тканин** у 50-ті рр. XX ст. та широке впровадження його у вірусологічну практику. З цього часу почалося масове культивування клітин з метою створення вірусних вакцин. Зростаючий попит на імунологічні препарати привів до створення промислового виробництва вакцин та імунодіагностичних препаратів на основі використання клітин людини і тварин. Відкриття принципів гібридомної техніки зумовило отримання у 1975 р. **моноклональних антитіл** – однієї із найбільш важливих подій у медико-біологічних науках II пол. XX ст. З цього періоду почалося масове виробництво препаратів антитіл, які базуються на біотехнології клітин.

Метод культур тканин має значне використання у низці медико-біологічних наук. Без культур тканин зараз немислима сучасна медична і ветеринарна імунопрофілактика та діагностика вірусних інфекцій, прогнозування низки

захворювань, наприклад гематологічних. Окрім того, реальною стала можливість використання культур тканин та стовбурових клітин у трансплантології – як джерела трансплантаційних клітин.

Стовбурові клітини, відомі також як **штамові клітини** – це первинні клітини, що трапляються в усіх багатоклітинних організмах. Ці клітини можуть самовідновлюватися шляхом поділу клітини, а можуть диференціюватися у досить велику кількість спеціалізованих типів клітин. Дослідження стовбурових клітин людини розпочалося з відкриття канадських учених (Ернеста Мак Кулоха) та (Джеймса Тілла) у 1960 р.

Існують дві досить широкі категорії стовбурових клітин ссавців: ембріональні стовбурові клітини, що походять безпосередньо від бластоцистів, та стовбурові клітини дорослого організму, що містяться у зрілих тканинах. У ембріонах стовбурові клітини можуть диференціюватися в усі спеціалізовані ембріональні тканини. Стовбурові клітини дорослого організму діють як репараційна система для тіла, відновлюючи та підтримуючи потрібну кількість спеціалізованих клітин. Одним із джерел стовбурових клітин може бути кістковий мозок.

Особливість стовбурових клітин полягає у тому, що вони мають такі основні властивості:

- **Самовідновлення** – здатність проходити величезну кількість клітинних циклів клітинного поділу і залишатися недиференційованими.

- **Потентність (потенціал)** – можливість диференціюватися у будь-який клітинний тип. Це визначає чи бути стовбуровим клітинам тотипотентними чи плюрипотентними. Деякі мультипотентні чи уніпотентні є попередниками деяких клітинних ліній, тоді їх іноді називають стовбуровими клітинами.

Залежно від потенціалу стовбурових клітин розрізняють: тоти-, плюри-, мульти- та уніпотентні клітини.

- **Тотипотентні** стовбурові клітини отримують унаслідок злиття сперматозоїду з яйцеклітиною. Клітини, що утворюються внаслідок кількох перших поділів заплідненої яйцеклітини теж тотипотентні. Ці клітини можуть перетворитися на ембріональні та екстраембріональні (позаембріональні) типи клітин.

- **Плюрипотентні** стовбурові клітини походять від тотипотентних клітин і можуть утворити клітини трьох зародкових шарів.

- **Мультипотентні** стовбурові клітини можуть утворювати лише близькі типи клітин (наприклад, гематопоетичні стовбурові клітини утворюють червоні кров'яні тіลця, білі кров'яні тілця, тромбоцити тощо).

- **Уніпотентні** стовбурові клітини можуть перетворитися лише на один тип клітин, але мають здатність до самовідтворення, що відрізняє їх від “не стовбурових” клітин.

Оскільки стовбурові клітини можна вирощувати та програмувати на спеціалізацію (наприклад, отримати м'язи чи нервову тканину) завдяки методу клітинних культур, їх стали використовувати для лікування хворих.

Завдяки своїм властивостям до безмежного розвитку і плюрипотентності ембріональні стовбурові клітини є потенційним матеріалом для регенеративної

медицини і заміщення тканин після поранень чи хворіб (так звана **клітинна терапія**).

Сьогодні в Україні дозволено проведення клінічних випробувань (Наказ МОЗ України № 630 «Про проведення клінічних випробувань стовбурових клітин», 2008 р.) з лікування таких патологій із застосуванням стовбурових клітин: панкреонекроз, цироз печінки, гепатити, опікова хвороба, цукровий діабет II типу, розсіяний склероз, критична ішемія нижніх кінцівок. Першим, хто отримав право на проведення клінічних випробувань у галузі застосування стовбурових клітин в Україні, став Інститут клітинної терапії. За допомогою стовбурових клітин пуповинної крові вже успішно проведено лікування десятків пацієнтів із цими захворюванням.

Стовбурові клітини досить успішно використовуються у наукових дослідженнях. Культури клітин є зручною моделлю для розв'язання цілої низки теоретичних питань, таких як природа та властивості імунокомпетентних клітин, кооперації клітин імунітету, імунорегуляції. Використовуючи культури тканин, розв'язують проблеми розвитку та диференціації клітин і тканин, малагнієзації клітин, регуляції за норми та патології і ін.

Окремим напрямом клітинної інженерії є використання **методу культур тканин** для отримання біологічно активних речовин, що обумовлено здатністю диференційованих клітин, які спеціалізуються на виконанні певної функції, до синтезу тих чи тих речовин. Наприклад, клітини ендокринних залоз синтезують та виділяють гормони, клітини кишкового епітелію – травні ферменти, лімфоцити – антитіла, імунокомпетентні клітини – імунорегуляторні речовини, в тому числі інтерлейкіни, Т- і В-активіни, імуноглобуліни.

Біотехнологія культур тканин розвивається у двох напрямках: розробляються методи і лабораторна апаратура, яка забезпечує керований розвиток клітин у культурі, які використовуються здебільшого у лабораторіях для науково-дослідницької мети; розробляються апаратура і технологія культивування клітин у великих (промислових) масштабах.

Культури тканин залежно від властивостей клітин класифікують на групи: 1) **первинні культури тканин**, отримані після дезагрегації шматочків тканини; ці культури мають необмежену тривалість життя; 2) **перещеплені культури тканин**, які пристосувалися до життя *in vivo*, багатократно пасивуються та продовжують швидко проліферувати упродовж необмеженого часу; 3) **генетично модифіковані тканини**, клітини яких отримані методами генної інженерії чи іншими методами сучасної біотехнології, що потребують спеціальних умов культивування.

Культури тканин використовуються для трансплантації тканин людини і тварин. Однією з галузей, у якій успішно використовуються культури тканин, є трансплантація підшлункової залози, нирки, шкіри.

Культивування клітин поза організмом відкриває можливості накопичення найціннішого матеріалу *in vitro*. Одним із таких напрямів є створення **банку трансплантаційних клітин**.

У селекції сільськогосподарських тварин із великим успіхом застосовують **метод трансплантації ембріонів** у поєднанні з **методом генетичних**

аналогів – методи **ембріональної інженерії**. Використання цього комплексного підходу дало змогу значно підняти відтворювальний потенціал перспективних порід деяких видів тварин.

Використовуючи техніку маніпуляції з ембріонами, отримують **химери** (аллофенні організми). Метод отримання химер полягає в імітаційному об'єднанні ембріональних клітин двох і більше тварин. Тварини можуть бути як однієї породи, так і різних порід і навіть різних видів. Сучасна мікрохірургія дає змогу отримувати химери, що мають 3 – 4 і більше батьків. Химери володіють ознаками тварин різних генотипів.

Є два основних методи отримання химер штучним шляхом: 1) **агрегаційний** – об'єднання двох і більше бластоцистів в один ембріон; 2) **ін'єкційний** – мікроін'єкція клітин внутрішньоклітинної маси бластоцисти донорів у бластопору ембріона-реципієнта. У обох випадках отримують особин, тканини та органи яких побудовані з клонів клітин об'єднаних (двох або більше) ембріонів. Перші сконструйовані химери були лабораторних мишей між лініями агуті і неагуті – вони були крапчастими. Сьогодні існують внутрішньовидові і міжвидові химери не тільки лабораторних тварин (мишей, хомяків, пацюків), але й сільськогосподарських тварин (корів, кіз, овець). Вивчення химер дає змогу зрозуміти процес реалізації геному у фенотипі тварин. Припускається, що при удосконаленні методів отримання химер вони можуть мати значний інтерес для практики тваринництва. Таким способом можна отримати тварин з більш високою резистентністю до низки хворіб і з ознаками, які зазвичай погано поєднуються в одному організмі.

Наприклад, чотирьохбатьківське химерне телятко було отримане у результаті введення кількох клітин зародка виду *Bos taurus* (звичайні домашні форми тварин) у зародок виду *Bos indicus* (зебувидні тварини). Крім свого прямого призначення – збільшення чисельності потомків від тварин із високою продуктивністю – техніка трансплантації ембріонів використовується також як ефективний селекційний інструмент при акліматизації ввезених порід тварин і при отриманні не тільки міжпородного, а й міжвидового потомства.

Одним із важливих напрямів клітинної інженерії є **клонування організмів**, започаткований професором зоології **Дж. Гордоном** (Оксфордський університет), який у 1977 р. **методом ядерного переносу** (див. додаток Н) клонував більше півсотні жаб. Важливим досягненням у цьому напрямі було отримання **Я. Вільмутом** (Шотландія) у 1997 р. клону ссавця – вівцю Доллі. Цей та подібні експерименти довели, що ядра клітин дорослих тварин, а не лише ембріонів, можуть бути репрограмовані при перенесенні їх до **енуклейованої** яйцеклітини (позбавленої власного ядра). Отримані таким способом ембріони здатні до розвитку і перетворюються у дорослу особину.

План заняття

1. Ознайомтеся з основними методами, які використовуються в інженерії клітинних культур та дайте відповіді на запитання:

- Що таке клітинні лінії?

- Як отримують, розмножують і підтримують культури клітин?
- Які основні групи клітинних культур Ви знаєте?

2. Дайте характеристику деяким методам, що використовуються у генетичній інженерії клітин:

- парасексуальній гібридизації;
- клонуванню;
- генетичних аналогів;
- трансплантації тваринних ембріонів;
- перенесення хромосом, ядер, органел;
- отримання химер.

3. Вкажіть біологічно активні речовини (БАР), які отримують за допомогою використання клітинних культур рослин / тварин, та заповніть таблицю:

Клітинна культура	Назва БАР	Функціональне призначення БАР

3. Виберіть правильну відповідь:

3.1. Тотипотентністю клітин називають...:

- а) здатність клітин до фенотипових змін;
- б) здатність клітин до реалізації повної генетичної програми розвитку;
- в) здатність клітин синтезувати вторинні метаболіти.

3.2. Клонуванням організмів називають...:

- а) введення гену до клітини організму-донора;
- б) імплантація генетично чужорідних ембріонів у матку сурогатних матерів;
- в) розмноження генотипово однорідних особин.

3.3. Вівця Доллі була створена методом:

- а) ядерного переносу;
- б) злиття яйцеклітини і сперматозоїда *in vitro*;
- в) генетичної модифікації ембріональних стовбурових клітин;
- г) гібридизації соматичних клітин.

3.4. Сомаклональною мінливістю називають...:

- а) мутаційну мінливість, яка властива окремим рослинам одного виду;
- б) комбінативну мінливість, що притаманна клітинам рослин в умовах культури *in vitro*;
- в) генотипову мінливість, характерну для клітин рослин в умовах культури *in vitro*.

3.5. Парасексуальною гібридизацією називають...:

- а) метод злиття протопластів клітин;
- б) блокування деградації продукту;
- в) забезпечення ефективної секреції продукту з клітини;

г) посилення позитивної регуляції синтезу продукту.

3.6. Цибридами називають...:

- а) клітини, створені методами генної інженерії;
- б) клітини, змінені в результаті індукованого мутагенезу;
- в) гібридні клітини, що містять ядро однієї батьківської клітини, а цитоплазму іншої.

3.7. Трансплантацією називають...:

- а) пересадку тканини, органів в організм реципієнтів;
- б) імплантацію генетично чужорідних ембріонів у матку сурогатних матерів;
- в) розмноження генотипово однорідних особин;
- г) введення гену до клітини організму-реципієнта.

3.8. Гібридами – це:

- а) клітини, утворені в результаті злиття В-лімфоциту і мієлоїдної клітини;
- б) гібридні енукейовані клітини з високою продуктивністю антитіл;
- в) відбирають на середовищі з 8-азогуаніном;
- г) відбирають на середовищі із стрептоміцином;
- д) продукують моноклональні антитіла.

3.9. До методів клітинної інженерії належать...:

- а) клонування генів;
- б) клонування організмів;
- в) ампліфікація генів;
- г) трансплантація ембріонів;
- д) парасексуальна гібридизація;
- е) отримання гібридом;
- є) Саузерн-блот гібридизація;
- ж) картування генів.

3.10. Ознаки і властивості химерного організму нащадкам:

- а) передаються;
- б) частково передаються;
- в) неповно передаються;
- г) не передаються.

4. Встановіть відповідність між напрямками генетичної інженерії та їх функціями:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1) генна інженерія; | А) використовує методи виділення клітин з організму, культивування на поживних середовищах, об'єднання соматичних клітин різних видів, родів, родин; |
| 2) клітинна (тканинна) інженерія | Б) використовує методи перебудови геномів організмів виділенням або введенням окремих генів або їх груп, синтез генів <i>in vitro</i> , копіювання і розмноження їх, введення у геном інших організмів; |

- | | |
|---------------------------|---|
| 3) ембріональна інженерія | В) використовує методи пересадки організатора із зміною впливу на розвиток інших тканин організму; |
| 4) клонування | Г) виділення соматичних клітин із організму і культивування на поживних середовищах, введення їх ядер в енукейовану яйцеклітину, імплантація з утворенням зародка і цілого організму з використанням тотипотентності. |

Питання для самостійного опрацювання

1. Методи отримання культури клітин із тваринних тканин.
2. Використання клітинних ліній для виробництва ферментів, інтерферону, вакцин, алкалоїдів.
3. Методи клітинної селекції рослин.
4. Хромосомна інженерія рослин: конструювання нових форм.
5. Трансплантація тваринних ембріонів. Клонування тварин.
6. Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин у медицині.
7. Селекція гібридом та біотехнологія отримання моноклональних антитіл.
8. Класичні та рекомбінантні вакцини.
9. Геномна інженерія. Основні напрями геномної інженерії.
10. Проблема клонування людини: соціальні та етичні аспекти.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 137 – 192.
2. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т.А. Компанець. – К. : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. – С. 50 – 82.
3. Основи біотехнології / укладачі: В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – С. 101 – 173.
4. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 389 – 417.
5. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – С. 332 – 353.

Практичне заняття № 5

Генетична інженерія рослин

Мета: ознайомитися з різноманітністю та технологією методів генетичної інженерії, які застосовуються при конструюванні нових форм рослин, а також різноманітністю та застосуванням трансгенних рослин.

Теоретичні відомості

Традиційні методи підвищення урожайності сільськогосподарських культур – схрещування і селекція – за останні півстоліття значно удосконалилися. До їх числа належать методи хромосомної інженерії.

Хромосомна інженерія – сукупність методик, що дають змогу здійснювати маніпуляції з хромосомами. Одна група методів заснована на введенні в генотип рослинної клітини пари чужих гомологічних хромосом, які контролюють розвиток потрібних ознак (*доповнені лінії*), або заміщенні однієї пари гомологічних хромосом на іншу (*заміщені лінії*). В отриманих таким способом заміщених і доповнених лініях збираються ознаки, що наближають рослини до “ідеального сорту”. Важливими методами хромосомної інженерії також є отримання гаплоїдних і поліплоїдних рослин.

Метод гаплоїдів заснований на вирощуванні гаплоїдних рослин із подальшим подвоєнням хромосом. Наприклад, з пилових зерен кукурудзи вирощують гаплоїдні рослини, що містять 10 хромосом ($n = 10$), потім хромосоми подвоюють і отримують диплоїдні ($n = 20$), повністю гомозиготні рослини усього за 2 – 3 роки замість 6 – 8-річного інбридингу. Поліплоїди отримують шляхом багатократного збільшення числа хромосом із застосуванням інгібіторів утворення веретена поділу. Перспективний метод отримання поліплоїдних форм часто поєднують зі штучною гібридизацією. Поліплоїдія – єдиний метод подолання безпліддя гібридів, одержаних у результаті схрещування віддалених видів.

Методи генної інженерії дають змогу, на відмінну від соматичної гібридизації, вводити у геном рослини тільки обраний ген, до того ж будь-якого походження, поза зв'язком зі статевою сумісністю донора і реципієнта, виключає необхідність тривалих беккросів і відборів для усунення непотрібних ознак, а також розширює можливості, прискорює і полегшує завдання поліпшення ознак і властивостей рослин.

Формальною датою народження генетичної інженерії рослин прийнято вважати 1982 рік, коли була отримана перша в світі химерна рослина сангін. Така назва зумовлена тим, що в геном соняшника був штучно перенесений ген білка фазеолін бобових (англ. sunflower + been = sunbeen). Надалі асортимент генетично модифікованих рослин значно зріс, насамперед, серед класу дводольних, хоча сьогодні вченими проводяться активно дослідження і з однодольними рослинами (пшеницею, рисом, кукурудзою, бананами).

Уже виділено і детально охарактеризовано приблизно сотні різних структурних генів рослин. Методами молекулярної біології, головню через етап

синтезу кДНК на інформаційній РНК, отримані копії геномних генів (клони), досліджуються оптимальні шляхи переносу в рослини чужорідної генетичної інформації, її експресії у новому генетичному середовищі, а також способи ідентифікації і добору трансформованих генотипів. Перенесення генів здійснюється у зростаючій кількості сортів рослин шляхом використання як технології рекомбінантної ДНК, так і соматичною гібридизацією.

Деякі методи генної інженерії детально розроблені і можуть бути застосовані на різних рослинних об'єктах, хоча й потребують доробки у застосуванні до конкретних видів рослин. Серед методів генної інженерії рослин виділяють **методи векторної трансформації і фізичного переносу ДНК**.

Методи векторної трансформації включають коінтегративну та бінарну векторні системи, які базуються на використанні Ті-плазмиди ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (див. додаток Д). Агробактерії мають здатність інтегрувати свій генетичний матеріал у клітини дводольних рослин. Вони містять великі (приблизно 200 тис пар основ) Ті-плазмиди (tumor inducing), які несуть так звану Т-ДНК – ділянку, здатну інтегруватися в ядерний геном рослинної клітини. До складу Т-ДНК належать гени фітогормонів, продукти експресії яких індукують у трансформованих рослин утворення пухлин – корончастих галів. Гени, що відповідають за перенесення та інтеграцію Т-ДНК у геном рослин (vir-гени), містяться в іншій ділянці Ті-плазмиди. Трансгенні рослини отримують, використовуючи модифіковану Т-ДНК, в якій онкогени замінені на будь-який ген, котрий бажано інтегрувати в рослинний геном. Таку неонкогенну плазмиду конструюють генно-інженерними методами, клонують в *E. coli*, а потім вектор уводять в *A. tumefaciens*: **vir-гени** забезпечують перенесення та інтеграцію бажаної ділянки. За допомогою агробактерій трансформовано велику кількість видів дводольних рослин, однак модифікація однодольних рослин (головні зернові культури – рис, пшениця та кукурудза) таким способом ускладнена.

Методи фізичного переносу ДНК (безвекторні системи) дають можливість прямого перенесення чужорідної ДНК у будь-які рослинні клітини або протопласти (клітини, у яких відсутня клітинна стінка). При безвекторному перенесенні використовують методи електропорації, мікроін'єкції та біолістичний метод. **Мікроін'єкцію** проводять під мікроскопом за допомогою скляної голки, уводячи через неї ДНК у ядро клітини. Бомбардування клітин (**біолістика**) – інший дуже ефективний метод введення ДНК у рослинну клітину. При цьому золоті або вольфрамові сферичні кульки діаметром 0,4 – 1,2 мкм покривають шаром ДНК, яку осаджують CaCl_2 , спермідином або поліетиленгліколем, і "вистрілюють" кульками в суспензію клітин зі спеціальної "рушниці". Кульки пробивають клітинну стінку, за рахунок чого ДНК потрапляє всередину клітини та з певною імовірністю інтегрується в рослинну ДНК за допомогою не зовсім зрозумілого механізму. Пряме введення ДНК у протопласти рослин можна здійснити й за допомогою **ліпосом** – сферичних частинок, мембрани яких містять фосфоліпіди. Частинки обволікають трансформуючу ДНК і тим самим захищають її від нуклеаз. За

допомогою ліпосом у протопласти рослин вдається ввести ДНК Ті-плазмід, а також цілі хромосоми.

Досягнення генетичної інженерії застосовуються насамперед у трьох практичних напрямках: реакція на гербіциди, стійкість до шкідників і хворіб, якість продукції. У наступному можна чекати успіху в поліпшенні симбіотичної фіксації азоту бобовими і не бобовими культурами, підвищенні ефективності фотосинтезу і стійкості до стресових дій середовища. Для отримання форм рослин, стійких до гербіцидів, використовують три основних підходи. Перший полягає у зміні чутливості мішені, на яку діє гербіцид; другий – у введенні в клітини рослин генів, які контролюють ферменти, що знищують гербіцид; третій – у ампліфікації генів, які визначають продукт, на який діє гербіцид.

Конструювання трансгенних рослин тепер розвивається за такими напрямками:

1. Отримання сортів с/г культур з більш вищою урожайністю
2. Отримання с/г культур, які дають кілька урожаїв на рік (наприклад, є ремантантні сорти полуниці, що плодоносять два рази за літо).
3. Створення сортів с/г культур, токсичних для деяких видів шкідників (наприклад, отримано сортів картоплі, листя яких є сильно токсичним для колорадського жука та його личинок).
4. Створення сортів с/г культур, стійких до несприятливих кліматичних умов (наприклад, отримані стійкі до засухи трансгенні рослини з геном скорпіона).
5. Створення сортів рослин, здатних синтезувати деякі білки тваринного походження (наприклад, отриманий сорт тютюну синтезує лактоферрин людини).

Досягнуто деякий прогрес у конструюванні сортів низки культур, які стійкі до деяких груп гербіцидів: триазину і його похідних (пригнічують фотосинтез); сульфонілсечовини, гліфосатів, імідозолінонів (пригнічують амінокислотний метаболізм). В інституті Вейсмана (Ізраїль) шляхом соматичної гібридизації із стійким до триазину біотипом пасльону чорного отримали триазин стійкий гібрид картоплі сорту *Mirka*.

Донором стійкості до II групи гербіцидів слугують як мутантні буряни, так і мутантні мікроорганізми. Для переносу цих генів найчастіше використовують векторні системи. У США отримали рослини тютюну, стійкі до гліфосату. Цей гербіцид блокує один із ферментів (EPSPS) біосинтезу ароматичних амінокислот. Зміна структури ферменту EPSPS без зміни його функції забезпечила стійкість цих рослин до гліфосфату, як і збільшення його синтезу в клітині.

Значного прискорення набули дослідження в генетичній інженерії рослин після секвенування геномів деяких модельних та с/г рослин. Зокрема, У 2000 році секвеновано перший геном рослини *Arabidopsis thaliana* (US\$70million). У 2005 секвеновано геном рису *Oryza sativa* (430 Mb). Проект почався у 1997 р. У 2010 р. опубліковано 19 не повністю секвенованих геномів рослин, 13 з них – сільськогосподарських. Секвенований геном *A. thaliana* дав

змогу: CRT binding factors (CBFs) з *Arabidopsis* були експресовані в томатах (*Solanum lycopersicum*), полуницях (*Fragaria sp.*), рисі і пшениці, дало змогу підвищити морозостійкість, а також стійкість до засолення та посухи; рецептор елонгаційного фактора Tu (EFR) *Arabidopsis* був експресований у томатах та тютюні (*Nicotiana tabacum*) підвищив їхню стійкість до широкого спектру захворювань; Nelson et al. досягли посухостійкості після трансформації клітин кукурудзи ортологом кукурудзи (ZmNF-YB2) транскрипційним фактором *Arabidopsis* AtNF-YB1, який був виявлений у процесі скринінгу геному на можливі гени посухостійкості в *Arabidopsis*.

Поряд із значними досягненнями і перспективами є низка труднощів, на які натрапляють дослідники: розмір та динамічна структура рослинних геномів додає або ще більше ускладнює проблеми, які виникають у інших системах. Рослинні геноми мають тенденцію до наявності мультигенних родин, паралогів і високої частоти поліплоїдії (від диплоїдів до октаплоїдів). Тому секвенування коротких послідовностей може бути недостатнім для картування унікального геному, що робить неможливим вирішення алельних варіантів між близькоспорідними видами. Зокрема, високий рівень нуклеотидної різноманітності (наприклад, для рису). Геном людини і рису приблизно однакового розміру, але якщо порівняти, то геноми двох рослин рису різняться між собою у 10 разів більше, ніж двох людей. Аналогічно, для клонів винограду та самозапильних сортів ячменю. Розмір геному та велика кількість мобільних генетичних елементів (від 10% *Arabidopsis thaliana* до 80% у *Triticum aestivum*), роблять шотган секвенування неефективним; Шотган-секвенування, яке може забезпечити 25* секвенування чотирьох геномів *Drosophila melanogaster*, може забезпечити лише 1* секвенування геному пшениці.

Генетична інженерія має неабияке значення у конструюванні сільськогосподарських культур, які здатні захищати себе від комах-шкідників. У 1985 році спеціалісти фірми PGS ізолювали ген ентомотоксину *Bacillus thuringiensis* і перенесли його в рослину тютюну. Отримані рослини мають найбільшу кількість цього білка в листках і стійкі до ушкодження гусеницями бражника (*Manduca sexta*). Ефект захисту рослин досягається при вмісті токсину в загальному білку рослини приблизно 0,02%. Польові дослідження у 1986 – 1987 роках підтвердили здатність рослин протистояти поїданню гусеницями. Ця ознака стабільно успадковується нащадками. Подальша робота спрямована на те, щоб застосовувати цю технологію до таких економічно важливих культур, як кукурудза, бавовна, овочеві. Ведуться дослідження щодо переносу у рослини із інших організмів (рослин, бактерій, грибів і комах) генів різних захисних білків, токсичних для патогенів.

Спеціалісти компанії *Agracetus* (США) отримали трансгенні рослини тютюну, які містять ген стійкості до захворювання корончастим галлом (збудник *A. tumefaciens*), шляхом уведення в геном рослинних клітин дріжджової алкогольдегідрогенази.

У Каліфорнійському університеті (США) в рослинах і мікроорганізмах ідентифікували гени, які захищають їх від висихання в умовах різкого нестачі вологи або засолення ґрунту. Ці гени сприяють накопиченню в клітинах

амінокислоти проліну, яка слугує осморегулятором у солестійких організмів. Поставлена задача – посилити накопичення проліну у сільськогосподарських культур, особливо у злаків.

У США отримують більше 150 ГМО. Найпоширеною є соя – використовується при виробництві більше 3000 харчових продуктів: супів, каш, картопляних чіпсів, маргаринів, салатних соусів, рибних консервів і ін. З ГМО-бавовника, рапсу виготовляють бавовникову і рапсову олію, з ГМО-картоплі – картоплю фрі, з помідорів повільного дозрівання – кетчуп та ін.

Трансгенні продукти, які не відрізняються за складом і властивостями від традиційних продуктів-аналогів та не містять ДНК і білок, дозволено використовувати без проведення досліджень їх безпеки як ГМО-джерел. Їх зараховують до I класу безпеки і вважають нешкідливими для здоров'я споживачів. До таких продуктів належать: харчові й ароматичні добавки, рафіновані олії, модифіковані крохмалі, мальтодекстрин, сиропи глюкози, декстрази та ін.

План заняття

1. Характеристика методів хромосомної інженерії рослин.
2. Характеристика методів генетичної трансформації рослин.
3. Репортерні гени у трансформації клітин рослин.
4. Фізичні методи переносу генів у рослинні клітини. Бомбардування мікрочастинками.
5. Характеристика векторних систем на основі *Ti*- та *Ri*-плазмід:
 - індукція пухлин агробактеріями *Ti*-плазмиди *Agrobacterium tumefaciens*.
 - Механізми переносу Т-ДНК;
 - неонкогенні вектори загального призначення на основі *Ti*-плазмід;
 - вектори для трансформації рослин за допомогою *Ri*-плазмід *A. rhizogenes*.
6. Експресія і успадкування гетерологічних генів. Ефект сайленсинга.
7. Характеристика ринку трансгенних рослин.
8. Виберіть правильну відповідь:
 - 8.1. Вкажіть правильне застосування *Ti*-плазмиди:
 - а) клонування ДНК за допомогою Т-парних бактеріофагів;
 - б) інтеграції трансгена у дріжджовий геном;
 - в) інтеграції трансгена у рослинний геном;
 - г) інтеграції трансгена у геном тварин.
 - 8.2. Для руйнування клітинної стінки рослин використовують фермент:
 - а) пектиназу;
 - б) целюлазу;
 - в) амілазу;
 - г) протеїназу.
 - 8.3. Для індукції злиття рослинних клітин використовують:
 - а) лізолецитин;
 - б) моноолеат гліцерину;

- в) ПЕГ;
- г) вірус Сендай;
- д) імпульси електричного струму.

8.4.Оберіть метод, який використовується для введення рекомбінантних молекул ДНК у клітини рослин?

- а) трансформацію протопластів рослинних клітин;
- б) нанесення розчину ДНК на калюсну культуру рослинних клітин;
- в) ін'єкції ДНК у пронуклеус заплідненої яйцеклітини;
- г) злиття соматичних клітин тварин;
- д) ін'єкції ДНК в ядро яйцеклітини.

8.5.Трансгенні рослини як джерело терапевтичних білків мають переваги:

- а) здатні до культивування у великих ферментерах;
- б) у них не розмножуються деякі патогени людини і тварин;
- в) білки рослин володіють значною стабільністю за тривалого зберігання;
- г) здатні до стабільної експресії трансгена.

9. Розв'яжіть задачі:

9.1. Рослину *Arabidopsis thaliana* трансформували *Ti*-плазмідною, в *T*-ДНК якої клонували ген стійкості до антибіотика G48 (G48^R). Отримали два клони, (А і В) стійкі до G48, з яких регенерували рослини. Після самозапилення трансгенних рослин отримали:

самозапилення рослини А → 3/4 нащадків G48^R і 1/4 нащадків G48^S;

самозапилення рослини В → 15/16 нащадків G48^R і 1/16 нащадків G48^S.

Поясніть ці результати.

9.2. Клоновано ген білка, що бере участь у процесі фотосинтезу. Які експерименти треба провести, щоб перевірити чи цей ген активний у коренях рослини?

9.3. Сконструйовано трансгенні рослини тютюну. Як вектор використали *Ti*-плазмиду, яка містила два зчеплених гени – стійкості до гербіциду та канаміцину. Для перевірки успадкування цих генів, трансгенні рослини схрестили з рослинами дикого типу. Серед нащадків трансгенної рослини І 50 % були стійкими до канаміцину, 50 % чутливими до нього. Натомість 75 % нащадків трансгенної рослини ІІ 50 % були стійкими до канаміцину, а 25 % чутливими до нього. Як пояснити різницю між двома трансгенними рослинами?

Питання для самостійного опрацювання

1. Особливості використання рослинних екстрактів як стимуляторів росту рослинних клітин і тканин *in vitro*.
2. Вектори для трансформації рослин на основі R_i - плазмід *A. rhizogenes*.
3. Трансформація клітин дводольних рослин за допомогою T_i та R_i - плазмід.
4. Кон'югаційне перенесення рекомбінантних плазмід у агробактерії.
5. Селекція рослин, стійких до гербіцидів, стресу, хворіб.
6. Бінарна та векторна система на основі *Ti*-плазмиди *A. tumefaciens*.
7. Перенесення генів у рослини за допомогою вірусів.

8. Отримання трансгенних рослин: стійких до комах, вірусів, гербіцидів, несприятливих зовнішніх факторів, зі зміненою харчовою цінністю. Рослини як біореактори.

9. Маркування генетично створених продуктів.

10. Області істотного суспільного занепокоєння: маркерні гени резистентності до антибіотиків, передача алергій, перенос пилка.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х : Федорко, 2008. – С. 211 – 237.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 371 – 416.
3. Федоренко В.О. Задачі та вправи з генетики: навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. 558.
4. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин.. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 372 – 388.
5. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. из-во, 2004. – С. 460 – 490.

Практичне заняття № 6

Генетична інженерія тварин

Мета: ознайомитися з різноманітністю та технологією генно-інжерних методів, які застосовуються при конструюванні нових форм тварин, а також різноманітністю та застосуванням трансгенних тварин.

Теоретичні відомості

Теоретичні та методичні основи генетичної інженерії тварин розроблені меншою мірою, ніж для мікроорганізмів та рослин. Видоспецифічність об'єктів для перенесення сторонніх генів (**трансгеноз**) у геном тварин та механізмів генетичної модифікації пов'язана зі складністю структурної організації і функціонування тварин, наявністю хромосомної обумовленості статі, специфічністю реалізації репродуктивної функції та ембріонального розвитку.

Описані різні модельні системи генетичної інженерії, розроблені на тваринних об'єктах: нематоді (*Caenorhabditis elegans*), дрозофілі (*Drosophila melanogaster*), миші (*Mus musculus*) та деяких інших.

У 1974 р. Р. Дженіш і Б. Мінтц описали першу схему експерименту по введенню чужерідної ДНК в ембріони миші. ДНК вірусу SV40 ін'єктували в бластоцисти, які поміщали в матку спеціально підготовлених самок. Із таких ембріонів розвивались нормальні дорослі миші, частина з яких містила у своєму геномі множинні копії ДНК вірусу SV40. Тварини, у геномі яких є інтегровані чужорідні гени, називають **трансгенними**.

У 1975 р. Б. Мінтц із співавторами продемонстрували можливість введення чужерідних генів в організм тварини, використовуючи клітини тератокарциноми (ТСС) миші, які здатні розмножуватися в культурі, а також втрачати свої непластичні властивості і нормально диференціюватися після ін'єкції в ембріони миші, які перебувають на стадії бластоцисти. Ранні ембріони були здатні розвиватися у дорослих мишей, соматичні і статеві клітини яких мозаїчні. Такі організми називають **химерами**.

У подальшому було розроблено дві стратегії генетичної трансформації для *M. musculus*, які були апробовані та адаптовані для конструювання трансгенних ссавців, в тому числі й для людини.

Перша стратегія – це **ектопічні вставки**, коли трансгени потрапляють у випадкові місця геному, зазвичай багатокопійно. Для здійснення генетичної трансформації рекомбінантна ДНК шляхом мікроін'єкції вводиться в ядро зиготи. Оброблені таким способом зиготи підсаджуються в підготовлену матку, самки, де розвивається плід. У кожному випадку трансген вбудовується у різні хромосоми або різні локуси однієї хромосоми, що веде до розщеплення за трансгеном у потомстві. Такий підхід має кілька проблем, пов'язаних із порушенням експресії трансгена внаслідок ефекту положення та інших причин, але стратегія ектопічних вставок доволі ефективна і не трудомістка.

Друга стратегія – **таргетинг генів**. За цієї стратегії трансгенна послідовність заміщує гомологічну ділянку в геномі. Ця стратегія дає змогу

еліминувати або модифікувати функцію, яка кодується відповідним геном. Таргетинг генів застосовують, коли потрібно інактивувати мутантний алель або виправити його на алель дикого типу. Виправлення мутантного алеля на алель дикого типу відбувається шляхом **генного заміщення**. При цьому трансген однокопійно вбудовується у свій локус на відповідній хромосомі. Таргетинг генів у миші здійснюють на ембріонально-стовбурових клітинах. Ембріонально-стовбурові клітини здатні розвиватися у клітини будь-якого типу, в тому числі і в клітини зародкової лінії. Після їх генетичної трансформації на селективних середовищах відбирають ті клітини, де вставка відбулася шляхом генного заміщення. Далі відселектовані трансформовані ембріонально-стволові клітини ін'єктують у зародок на ранніх стадіях розвитку. Дорослі особини, які вирости з таких зародків, схрещують із нормальними мишами. Отримане потомство є химерним, оскільки організм має певні тканини від оригінальних, нетрансгенних особин і деякі від трансгенних ембріонально-клітинних ліній. Химерні миші далі схрещують з їх сибсами для отримання гомозиготного потомства з нокаутованою (knockout), тобто інактивованою копією гена. Мишей, які мають цільовий трансген в кожній клітині, ідентифікують молекулярно-генетичними методами аналізу. Методика таргетингу генів має важливе значення для генної терапії, суть якої полягає у заміні мутантного алеля на алель дикого типу шляхом генного заміщення.

За “відкриття принципів уведення специфічних генних модифікацій в організм мишей за допомогою ембріональних стовбурових клітин” Маріо Капеккі, Мартін Аванс, Олівер Смітс у 2007 р. отримали Нобелівську премію. Розроблений ними метод **накауту гена** (knock-out) дає змогу отримати лінії мишей, у яких виключені певні гени. Основою цього методу є явище гомологічної рекомбінації – обміну відповідними ділянками між парами гомологічних хромосом. Капеккі і Смітс показали можливість гомологічної рекомбінації за участю штучно синтезованих фрагментів ДНК, що мають певну послідовність нуклеотидів, що відповідають ділянці цільового гена. За допомогою методу накауту гена можна дослідити роль кожного конкретного гена у розвитку організму за його нормального та патологічного функціонування, а також вивчати різні захворювання людини, використовуючи нокаут для моделювання захворювань людини на тваринах.

Для *C. elegans* – рекДНК ін'єктуються за допомогою шприца або мікропіпетки безпосередньо в гонаду нематоди, яка є синцитієм – багатоядерною клітиною. Синцитій нематоди містить більше 100 ядер на різних стадіях мейозу. Так, одразу більше 100 ядер потрапляють під вплив трансформуючої ДНК, деякі з них поглинають її. Зазвичай стороння ДНК формує або багатокопійні екстрахромосомні утворення, тобто присутня в ядрі поза межами хромосом. Рідко трансгени вбудовуються в хромосому ектопічно, часто багатокопійно.

Загальна схема отримання **трансгенних ссавців** є добре розроблена. Вона відбувається **шляхом мікроін'єкції** сторонньої ДНК у яйцеклітини або ранні ембріони. А. І. Божков (2008) виділяє такі стадії уведення розчину рекомбінантної ДНК та отримання трансгенних ссавців:

- а) підготовка тварини та виділення яйцеклітин або ембріонів;
- б) мікроін'єкція рекДНК у пронуклеус;
- в) пересадка ін'єктованих ембріонів до яйцеводів (якщо використовується проміжне культивування) або в матку синхронізованих сурогатних матерів;
- г) народження трансгенних тварин;
- д) скринінг потомства на наявність трансгена.

Для трансформації тварин шляхом мікроін'єкції використовують запліднені яйцеклітини на стадії двох пронуклеусів або двоклітинні ембріони. Тільки за таких умов отримують тварин, у яких і в генеративних, і в соматичних клітинах містяться трансгени.

Для тварин встановлено, що рекомбінантні молекули ДНК у лінійній формі інтегрують у ДНК реципієнта у кілька разів краще, ніж кільцеві. Вбудовування векторних послідовностей ДНК разом із трансгеном знижує інтенсивність його експресії у 1000 разів. З цієї причини за допомогою специфічних рестриктаз кільцеві молекули ДНК переводять у лінійну форму та видаляють векторні послідовності. Концентрація розчину ДНК для мікроін'єкцій має складати 1 – 2 пкг ДНК/мл. Це відповідає 200 – 400 копіям ДНК, якщо одна копія містить 5000 п. н. (розмір середнього гена). За дотримання таких умов частота інтеграції ДНК у геном складає 20 – 40 %. ДНК, введена до пронуклеусу шляхом мікроін'єкції, інтегрується лише в один сайт у вигляді тандемних послідовностей.

Для отримання запліднених яйцеклітин перед обробкою їх розчином рекДНК у самки індукують суперовуляцію. Сьогодні розроблені окремі схеми гормональної стимуляції суперовуляції, штучного запліднення та вимивання ембріонів для основних видів сільськогосподарських тварин.

Мікроін'єкції ДНК у запліднені яйцеклітини та ембріони проводять скляними ін'єкційними голками за обов'язкової візуалізації (з використанням інвертованих або прямих мікроскопів з диференціальною інтерференційно-контрастною оптикою). За допомогою маніпулятора орієнтують яйця так, щоб обидва пронуклеуси були у фокусі. Чоловічий пронуклеус має більший розмір, ніж жіночий. Яйце утримують піпеткою, приклавши до неї від'ємний тиск. Капіляр вводять у чоловічий пронуклеус різким уколом, щоб проколоти мембрану. Після введення розчину ДНК пронуклеус збільшується в об'ємі, пізніше він зменшиться до звичайних розмірів. Прооперовані яйця промивають спеціальним середовищем та витримують 10 год при 37⁰ С у повітрі з 5 % CO₂.

Для трансплантації ембріонів використовують псевдовагітних самок, (самки, спарені зі стерильними (васектомованими) самцями). Ембріони з ін'єктованою ДНК трансплантують псевдовагітним самкам, найчастіше у яйцеводи хірургічним шляхом. Для ВРХ використовують також пересадку ембріонів нехірургічним шляхом у матку реципієнта, у цьому разі ембріони культивують *in vitro* до стадії морули. Трансгенні ембріони розвиваються у матці сурогатної матері. Народження відбувається природнім шляхом, або застосовують кесаревий розтин.

Для перевірки інтеграції трансгена у геном тварини використовують молекулярно-генетичні методи аналізу з використанням ДНК-гібридизації. Для

цього отримують ДНК трансформованих тварин, шляхом біопсії тканини хвоста. Важливою проблемою в дослідях з трансгенозу генів у тканинах тварин виявилася експресія внесених генів. З'ясувалося, що тільки чотири промотори із багатьох досліджених здатні активувати приєднані до них гени. Тому обов'язковим є перевірка експресії трансгена за його фенотиповим проявом. Фенотиповий аналіз трансгенного потомства є дуже важливим, оскільки навіть присутній в геномі трансгенної тварини трансген може з певних причин не виявлятися фенотипово (мовчання трансгена) або не проявлятися в наступних поколіннях. Трансгенні тварини, отримані за успішної трансформації шляхом мікроін'єкції в яйцеклітину, зиготу або ранній ембріон, не є мозаїчними і при схрещуванні з нетрансгенними особинами передають трансген 50 % потомків.

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

Трансгенна технологія має велике значення, насамперед для фундаментальних, а також прикладних наукових досліджень. Зокрема, ще в 1986 р. австралійські вчені вперше у світі отримали трансгенну вівцю шляхом введення в ембріон гену, відповідального за синтез гормону росту овець. Згодом отримані трансгенні свині з геном людського гормону росту. У 1999 р. вчені Гарвардського університету (США) виділили ген, відповідальний за ріст кур'ячих ніжок та через кілька місяців отримали перші в світі чотириногі кури. Вчені вважають, що такі тварини матимуть велике значення у тваринництві майбутнього. У 1988 р. уперше вдалося отримати трансгенних овець, які продукують з молоком фактор згортання крові, необхідний для лікування людей, хворих гемофілією. Згодом у світі були сконструйовано приблизно 20 типів трансгенних корів, кіз, свиней, овець і кроликів, які продукували такі цінні фармацевтичні речовини, як тканинний активатор плазміногену, різні моноклональні антитіла, еритропоетин, інсуліноподібний фактор росту, інтерлейкіни, антитрипсин і ін. Роботи у цьому напрямі продовжуються, і спектр лікарських речовин, отриманих за допомогою трансгенних сільськогосподарських тварин розширюється. Зараз отримано також трансгенних птахів, риб тощо.

План заняття

1. Методи отримання і культивування предімплантаційних зародків тварин.
2. Технологія трансплантації ембріонів:
 - стимуляція суперовуляції;
 - виділення ембріонів;
 - клонування ембріонів;
 - зберігання ембріонів;
 - пересадка ембріонів.
3. Отримання химерних тварин:
 - технологія отримання химер;
 - визначення химеризму;
 - використання химер.
4. Характеристика методів генетичної трансформації тварин:
 - характеристика та застосування ретровірусних векторів;
 - метод мікроін'єкцій ДНК;
 - використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин;
 - характеристика фізичного методу із застосуванням мікрочастинок золота;
 - перенесення генів за допомогою штучних дріжджових хромосом (YAC);
 - метод "нокаута" гена.
5. Антисмістовні технології. Використання антисенс-РНК.
6. Характеристика ринку трансгенних тварин, їх застосування.
7. Виберіть правильну відповідь:
 - 7.1. Які фактори визначають ефективність експресії генів, клонованих у рекомбінантних молекулах ДНК:
 - а) сильний конститутивний промотор гена;
 - б) сильний промотор гена, експресія з якого індукується;
 - в) присутність у векторі експресії послідовності Шайна-Дальгарно на певній відстані від ініціаторного кодону;
 - г) відповідність між використанням певних синонімічних кодонів у гені та пулом тРНК, присутніх у клітині?
 - 7.2. Метод мікроін'єкцій ДНК при отриманні трансгенних мишей передбачає:
 - а) внесення рекДНК у чоловічий пронуклеус заплідненої яйцеклітини;
 - б) внесення рекДНК у ядро заплідненої яйцеклітини;
 - в) наявність плюрипотетних стовбурових клітин;
 - г) наявність ядер, виділених із плюрипотетних стовбурових клітин.
 - 7.3. За допомогою штучних дріжджових хромосом (YAC) у клітинах ссавців клонуються:
 - а) невеликі гени (≤ 20 т. п. н.);
 - б) мультигенні комплекси спорідненої функції (≥ 100 т. п. н.);

- в) цілі хромосоми;
- г) фрагменти хромосоми.

7.4. Використання ретровірусних векторів для трансгенозу мишей має недоліки:

- а) обмеження розміру вставки до 8 т. п. н.;
- б) неефективні;
- в) передбачають наявність вірусу-помічника, який може у низці випадків реплікуватися у трансгенному організмі;
- г) низький рівень експресії трансгену.

7.5. Метод нокаута гена передбачає:

- а) спрямовану інактивацію гена;
- б) вирізання гена з геному за допомогою рестриктаз;
- в) використання вольфрамових чи золотих кульок;
- г) використання гібридного цільового вектора (*targeting vector*).

Питання для самостійного опрацювання

1. Методи отримання химерних організмів.
2. Методи клонування ембріонів.
3. Історія розвитку методів генетичної трансформації мишей та ссавців.
4. Методи генетичної трансформації *Drosophila melanogaster*.
5. Використання клітин тератокарциноми для отримання трансгенних мишей.
6. Особливості експресії генів у трансгенних мишах.
7. Використання трансгенних тварин у фундаментальних дослідженнях.
8. Отримання трансгенних овець, свиней та корів.
9. Отримання трансгенних комах, риб та птахів.
10. Біотехнологічне використання трансгенних тварин.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – С. 238 – 262.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 418 – 439.
3. Основи біотехнології / укладачі : В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – С. 165 – 173; 330 – 343.
4. Федоренко В.О. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. 568.
5. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. из-во, 2004. – С. 448 – 459.

Практичне заняття № 7

Молекулярна генетика людини. Генотерапія

Мета: ознайомитися з науковими напрямками, досягненнями та методами молекулярної генетики людини і генотерапії; вивчити принципи і підходи молекулярно-генетичних методів, що застосовуються у молекулярній генетиці та генотерапії.

Теоретичні відомості

Останніми роками на рубежі двох століть значним прогресом відрізняються дослідження в сфері молекулярної генетики людини. Активний розвиток цієї науки розпочався у 1980-х рр. завдяки новаторським ідеям Д. Ботштейна, Р. Уайта, М. Сколнка і С. Девіса. Вони звернули увагу на те, що поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) людини породжує поліморфні алелі (маркерні локуси), що піддаються картуванню. Як писали автори у своїй статті, ми хочемо запропонувати новий спосіб побудови генетичної карти зчеплень людини. Його основою є створення за допомогою технології рекомбінантних ДНК випадкових однокопійних ДНК-зондів, здатних виявляти поліморфні нуклеотидні послідовності при гібридизації з індивідуальними ДНК, обробленими рестриктазою.

Сьогодні активні дослідження у молекулярній генетиці людини пов'язані, перш за все, з секвенуванням геному людини, проведене в рамках міжнародного науково-дослідницького проекту HUGO (1990 – 2003 рр.). Результатом цих робіт стало не тільки отримання величезної за обсягом інформації про будову ДНК людини, але й розробка нових ефективних технологій типування ДНК, створення й зберігання інформаційних баз даних, способів обробки великих масивів результатів і тощо. HUGO-проект став основою нового міжнародного проекту *Genome Project-write* (GP-write) чи Human Genome Project-write (HGP-write), очолюваний багатопрофільною групою наукових лідерів, який буде тестувати спроби синтезу повного штучного геному людини. Метою GP-write проекту є дослідження “словника” генів, що дасть змогу наблизитися до розуміння організації геному, навчитися повноцінно визначати змістове навантаження різних генів і їх ділянок та складати “програму” для клітини.

На основі розвитку цих досліджень виник новий науковий напрям – **геноміка**, яка революціонізувала сучасну біологію, дала змогу виявити особливості організації геномів, здійснити порівняння геномів різних організмів, виявити нові гени і генетичні елементи, розшифрувати мутації при значній кількості спадкових хворіб. Розробка таких численних проблем привела до істотного розширення інтересів молекулярно-генетичної науки, а також до розширення її підходів і методів як на суміжні, так і на віддалені наукові напрями, насамперед, медичну генетику, фармакологію, порівняльну біологію, криміналістику, судову медицину, біотехнологію, а також – антропологію, археологію, історію. Відповідно до цього, в рамках геноміки стали розвиватися

спеціалізовані розділи, такі як функціональна, порівняльна, медична, комп'ютерна, а також, етнічна геноміки.

Структурна геноміка вивчає послідовність нуклеотидів у геномі, визначає межі та структуру генів, міжгенних ділянок, промоторів, енхансерів тощо, тобто фактично бере участь у складанні генетичних карт організму. Підраховано, що геном людини складається з 3,2 млрд нуклеотидів.

Функціональна геноміка ідентифікує функцію кожного гена та ділянки геному, їх взаємодію у клітинній системі. Одна з важливих задач геноміки створити, так звану “генну мережу” – взаємозв'язану роботу генів. Наприклад, генна мережа системи кровотворення залучає до роботи не менше 500 генів. Вони не тільки взаємозв'язані між собою, але і пов'язані з іншими генами.

Порівняльна геноміка вивчає схожість та відмінності в організації геномів різних організмів.

Еволюційна геноміка пояснює шляхи еволюції геномів, походження генетичного поліморфізму та біорізноманіття, роль горизонтального перенесення генів. У застосуванні до людини, як і до будь-якого організму, можна сказати, що еволюція людини – це еволюція геному.

Етнічна геноміка (етногеноміка) вивчає особливості геномного поліморфізму окремих популяцій, рас, народів.

Медична геноміка розв'язує прикладні питання клінічної та профілактичної медицини на основі знань геномів людини та патогенних організмів.

Геноміка людини є основою **молекулярної медицини**, а її досягнення використовуються при розробці ефективних методів діагностики, лікування та профілактики спадкових та неспадкових захворювань. Якщо раніше припускали, що спадкова патологія, пов'язана з певними генами або регуляторними зонами, то зараз все більше уваги привертають нуклеотидні послідовності, розташовані в міжгенних проміжках. Вони довгий час вважалися “мовчазними”. Сьогодні накопичується все більше відомостей про їхній вплив на експресію генів.

Значний інтерес для медицини мають дослідження, пов'язані з укладанням “генної мережі” – схеми взаємодії генів між собою на рівні білкових продуктів. Ці дослідження сприяли створенню у рамках геноміки нової науки – **протеоміки**, яка вивчає білковий пейзаж клітини в різних режимах функціонування генів. Сьогодні протеоміка – самостійна наука, тісно пов'язана з геномікою.

Хоча геноміка як наука утворилася порівняно недавно, але в її становленні можна розрізнити кілька етапів.

I (1900 – 1940 рр.) На цьому етапі вивчаються менделюючі ознаки людини. Основний метод дослідження – генеалогічний аналіз. У цих роках вчені вивчили основні ознаки людини та наблизилися до опису груп зчеплення. Виявлено приблизно 400 менделівських ознак людини та 4 групи зчеплення.

II (1940 – 1980 рр.) – етап вивчення груп зчеплення. Основні методи дослідження – генеалогічний, цитогенетичний та метод гібридизації соматичних клітин. Суттєвий прогрес цитогенетики людини, особливо генетики соматичних клітин у 60-х роках у комплексі з генеалогічним підходом,

поставив вивчення геному людини на нові теоретичні основи. Впровадження у практику нових біохімічних та імунологічних методів істотно прискорило не тільки відкриття нових менделівських ознак, але й істотно прискорило процес розшифрування в геномі людини нових груп зчеплень генів. Починають різко зростати численні дослідження у сфері складання карт (картування) генів.

III (1980 – до сьогодні) – етап вивчення локалізації генів у геномі та розшифрування їх нуклеотидної послідовності. Основні методи вивчення – біохімічні, імунологічні. Цей етап почав формуватися у 1980-х роках із розвитком молекулярно-генетичних методів й технологій генної інженерії. Процес пізнання геному поглиблюється аж до виділення гена в чистому вигляді та його секвенування. У США та Великобританії були розроблені та впроваджені автоматичні прилади секвенування геномів – **секвенатори**, названі **геномотронами**. У них здійснюється більше 100 000 полімеразних реакцій за годину. Значну роль на цьому етапі має обчислювальна техніка та інформаційні системи. Завдяки їм розв'язуються питання накопичення інформації з різних джерел, зберігання її та оперативного використання дослідниками різних країн.

У молекулярній генетиці людини важливим завданням є **картування гена** – точне визначення його локалізації на хромосомі відносно інших генів.

Для цього використовуються три основні групи методів картування генів – фізичне (визначення за допомогою рестрикційних карт, електронної мікроскопії та деяких варіантів електрофорезу міжгенних відстаней – в нуклеотидах), генетичне (визначення частот рекомбінації між генами, зокрема, в сімейному аналізі та ін.) і цитогенетичне (гібридизація *in situ*, одержання монохромосомних клітинних гібридів, делеційний метод тощо). У генетиці людини приймаються чотири ступені надійності локалізації цього гена – підтверджена (встановлена у двох і більше незалежних лабораторіях або на матеріалі двох і більше незалежних тестів – об'єктів), попередня (1 лабораторія або 1 аналізована сім'я), суперечлива (неспівпадання даних різних дослідників), сумнівна (не уточнені остаточно дані однієї лабораторії).

Велике значення для картування генів людини зробила Міжнародна програма “Геном людини”, здійснивши повне секвенування усієї ДНК. Інформація про нуклеотидні послідовності є у генетичних базах даних у вільному доступі. Встановленням функціональної ролі певної нуклеотидної послідовності займається новий напрям програми “Геном людини” – функціональна геноміка.

Карта геному – це схема, що визначає хромосомну належність і взаємозв'язок (порядок і відстань) генів та інших компонентів геному. Карти геномів класифікують за обсягом інформації (роздільною здатністю) і методами побудови. Залежно від роздільної здатності виділяють маломасштабні карти (з низьким рівнем розділення), наприклад, ідіограма диференційного фарбування хромосом чи генетичні карти з відстанню 7 – 10 млн п.н. (мегабаз – Мб) між сусідніми марками, і крупномасштабні, практично з повною послідовністю нуклеотидів. Відповідно до методів побудови розрізняють фізичні та генетичні карти (карти зчеплення). Фізична карта цілої хромосоми або її сегментів

будується на основі прямого дослідження генетичного матеріалу і дає уявлення про реальне розташування генів у ДНК, відстань між якими і маркерами, що їх фланкують виражається в п.н., що полегшує їх ідентифікацію і вивчення, а також секвенування. Генетичні карти показують лінійне розташування маркерних сайтів, відстань між якими вимірюється у сМ (сантиморган – умовна одиниця частоти рекомбінації).

Для картування генів останніми десятиліттями використовуються методи клітинної біології, зокрема метод отримання гібридних клітин у культурі. У результаті численних робіт було отримано гібриди соматичних клітин людини і тварин (мишей, китайського хом'ячка і ін.), завдяки яким вдалося картувати чимало генів людини.

Значної популярності у молекулярній генетиці людини для картування генів набули методи генних зондів, ПЛР та геномна дактилоскопія.

Точність **методу генних зондів** залежить від якості зонду (його чистоти). Найкращими ДНК- і РНК-зондами слугують олігонуклеотидні послідовності, отримані шляхом хімічного синтезу, у яких розміщення нуклеотидів повністю відповідає ділянці шуканого гена (чи усього гена). ДНК-зонди мітять різними способами: ізотопами, спеціальним білком біотином, флуорохромами і ін.

Залежно від типу досліджуваної речовини, способів її попередньої обробки та перенесення (блоттингу) розрізняють кілька різновидів цього методу. **Саузерн-блот**, чи блот-гібридизація по Саузерну – найефективніший метод ідентифікації певних молекул ДНК серед електрофоретично розділених фрагментів, запропонований у 1975 р. Е. Саузерном. Геномну ДНК обробляють одним або кількома рестриктазами і утворені фрагменти діляться за відносною молекулярною масою в агарозному або акриламідному гелі. Далі фрагменти ДНК піддають денатурації *in situ* і переносять з гелю на щільний носій. У цьому випадку блоттинг (перенос) здійснюється за рахунок дії капілярних сил, електричного поля або вакууму. Методи **дот-** і **слот-гібридизації** отримали свої назви залежно від форми аналізованої плями ДНК на фільтрі – округлої, або подовгастої, відповідно. На тверду матрицю препарати ДНК і РНК наносяться крапельно. Принципова відмінність цих методів у тому, що з міченим ДНК-зондом гібридизуються молекули ДНК або РНК без попередньої обробки рестриктазами та електрофорезу. **Нозерн-блот** (Northern-blot) – метод гібридизації ДНК-зондів із електрофоретично розділеними молекулами РНК. **Вестерн-блот** (Western-blot), чи імуноблот, – це зв'язування електрофоретично розділених білків, фіксованих на фільтрах, з міченими антитілами.

Геномна дактилоскопія (ДНК-фінгерпринт) базується на рестрикційному аналізі ДНК із застосуванням специфічних зондів. Цей метод дає змогу дослідити поліморфізм множинних повторюваних локусів (мульти-локусний аналіз) у ДНК різних організмів. З його допомогою можна виявити в геномі ссавців більше 30 високополіморфних локусів, що достатньо для індивідуальної ідентифікації людини, тварин і рослин.

Завдяки розробці методів генного картування, можна, використовуючи специфічний хромосомний сайт в якості маркера, локалізувати на хромосомі людини ген, асоційований з цим захворюванням, нічого не знаючи про

механізм дії цього гена, а потім, використовуючи клоновану послідовність, яка розпізнає цей маркерний сайт, спробувати ідентифікувати дефектний ген. За допомогою цього підходу вже були охарактеризовані гени деяких хворіб людини. Далі методами функціональної геноміки досліджують механізм дії нормальних і дефектних генів та розробляють ефективні методи лікування.

Завдяки успіхам молекулярної генетики розроблений принципово новий метод вивчення молекулярної організації хромосом – *метод флюоресцентної гібридизації in situ* (FISH).

Медична геноміка займається вивченням генних дефектів при спадкових та інших захворюваннях, вивченням експресії мутантних генів та розробкою нових методів діагностики, лікування та профілактики. У зв'язку з цим виник новий напрям – генна терапія, орієнтована на виправлення дефектів, викликаних мутаціями (змінами) у структурі ДНК, або додання клітинам нових функцій.

Генна терапія – сукупність генно-інженерних (біотехнологічних) та медичних методів, що спрямовані на внесення змін у генетичний апарат соматичних, статевих або ембріональних клітин людини з метою лікування спадкових та набутих захворювань. Історично генна терапія націлювалася на лікування спадкових генетичних захворювань. Сьогодні генну терапію розглядають як потенційно універсальний підхід до лікування широкого спектру захворювань, починаючи від спадкових, генетичних і закінчуючи інфекційними.

Найбільш ефективний спосіб виявлення мутацій у гені – секвенування кДНК або окремих екзонів. Для генів, що мають порівняно невеликі розміри (наприклад, ген фактора згортання крові IX, що детермінує гемофілію В), метод прямого секвенування іноді використовують як основний метод сканування мутацій. Однак, незважаючи на наявність методик (різні модифікації ПЛР, використання мРНК для отримання кДНК), зараховують секвенування до рутинних методів. Секвенування повнорозмірної кДНК (тобто усіх екзонів) для виявлення мутацій у окремих індивідів залишається трудомісткою, дорогою процедурою і вимагає великих витрат часу. Тому на практиці отримані шляхом ампліфікації або клонування фрагменти ДНК попередньо тестують на наявність мутацій простішими методами, заснованими на порівнянні фізико-хімічних характеристик мутантних і нормальних послідовностей. Однак точні молекулярні характеристики кожної мутації незалежно від її природи (заміни нуклеотидів, делеції, дуплікації, інсерції і ін.), можуть бути отримані тільки шляхом прямого секвенування. За допомогою ПЛР та подальшого електрофорезу продуктів ампліфікації в поліакриламідному або агарозному гелі виявляють мутації, які змінюють довжину ампліфікованих фрагментів. До таких мутацій належать делеції та інсерції.

Стандартна схема генокорекції спадкового дефекту включає серію послідовних етапів. Вона розпочинається з отримання генетичної конструкції, що містить змістовну (кодує білок) і регуляторну частини гена. На наступному етапі добирають вектор, що забезпечує ефективну, а за можливості й адресну доставку гена в клітини-мішені. Потім проводиться **трансфекція** (перенесення

отриманої конструкції) в клітини-мішені, оцінюється ефективність трансфекції, ступінь корегування первинного біохімічного дефекту в умовах клітинних культур (*in vivo*) і, що особливо важливо, в природних умовах на тваринах – біологічних моделях. Тільки після цього переходять до клінічних випробувань.

Існує два види генотерапії: замісна і коригувальна. **Замісна генотерапія** полягає у введенні в клітину нормального гена. Внесена копія заміщує у геномі хворого дефектний ген. Усі проведені сьогодні клінічні випробування використовують внесення у клітину додаткових кількостей ДНК. За **коригувальної терапії** передбачається заміна дефектного гена нормальним шляхом рекомбінації. Поки цей метод на стадії лабораторних випробувань, оскільки ефективність його ще дуже низька, але останні дослідження показують успіхи в лікуванні деяких захворювань.

Для введення нової генетичної інформації у клітини ссавців використовують два основних підходи, що розрізняються природою клітин-мішеней:

- **фетальна генотерапія**, при якій чужорідну ДНК вводять у зиготу або ембріон на ранній стадії розвитку, при цьому очікується, що введений матеріал потрапить в усі клітини реципієнта (і навіть у статеві клітини, забезпечивши водночас передачу наступному поколінню);
- **соматична генотерапія**, за якої генетичний матеріал вводять тільки в соматичні клітини і він не передається статевим клітинам.

Розроблено два методи генотерапії – *ex vivo* та *in vivo* (див. додаток П). За генної терапії *ex vivo*, клітини вилучаються з організму пацієнта, генетично модифікуються, а потім вводяться назад в організм індивіду. Цей метод є дієвим у лікуванні захворювань крові (наприклад, комбінованого імунodefіциту), оскільки клітини крові можна досить легко вилучити і ввести назад. Комбінований імунodefіцит може бути результатом дефекту гена аденозиндезамінази. Це захворювання клінічно і імунологічно характеризується дефектом як Т-, так і В-лімфоцитів. Вперше успішна спроба лікування такого хворого методами генотерапії була зроблена в США в 1990 р. Однак для більшості генетичних захворювань цей метод є непридатний. Альтернативою цьому є метод **генної терапії *in vivo***, коли корекція генів здійснюється безпосередньо в організмі пацієнта. Для здійснення такої процедури, генетична інформація доставляється безпосередньо в клітину за допомогою вектора в якості яких слугують безпечні для здоров'я і життя віруси.

Список спадкових захворювань, які намагаються або планують лікувати генами, великий. Практично у будь-якій галузі медицини або розпочаті клінічні випробування лікування спадкових захворювань за допомогою генної терапії, або в дослідях на тваринах розробляються підходи до такого лікування. Методи генної терапії дають змогу лікувати різні генетичні патології і в період внутрішньоутробного розвитку.

Генна терапія успішно застосовується для лікування не тільки спадкових, але і значно поширеніших хворіб (діабет, остеопороз, ревматоїдний артрит, різні пухлини). Для лікування таких захворювань застосовується не одна, а одразу багато генетичних конструкцій, що усувають дефекти різних стадій перебігу патологічного процесу.

План заняття

1. Дайте характеристику методам картування генів:

- аналіз зчеплення генів;
- гібридизація соматичних клітин;
- картування генів за допомогою хромосомних перебудов;
- картування генів за допомогою ДНК-зондів;
- гібридизація мічених зондів і метафазних хромосом *in situ*.
- метод QTL (Quantitative Trait Loci), чи картування ЛКО (локусів кількісних ознак);
- аналіз асоціацій. Метод гена-кандидата;
- «прогулка» по хромосомі (chromosome walking) і «стрибки» по хромосомі (chromosome jumping).

2. Дайте характеристику молекулярно-генетичним методам дослідження геному людини:

- секвенуванню;
- полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР);
- блот-гібридизації по Саузерну (Саузерн-блоттинг);
- флюоресцентній гібридизації *in situ* (FISH);
- ДНК-фінгерпринту (ДНК-типуювання);
- фізичному картуванню геному людини;
- ДНК-чипуванню.

3. Охарактеризуйте методи клонування генів захворювання людини:

- функціональне картування;
- кандидатне картування;
- позиційне картування;
- позиційно-кандидатне картування.

3. Охарактеризуйте методи генотерапії *ex vivo* та *in vivo*.

4. Охарактеризуйте векторні системи, які застосовуються для генокорекції.

5. Опишіть невірусні системи доставки генів, які застосовуються у генотерапії.

6. Опишіть лікарські засоби на основі олігонуклеотидів, які застосовуються у генотерапії.

7. Розв'яжіть задачу.

Делеція одного нуклеотиду в гені Х зумовлює певне спадкове захворювання. Ця зміна призводить до втрати *EcoRI*-сайта, що наявний в немутантному гені. Як можна використати цю інформацію для визначення ризику появи хворих дітей? Припустимо, що жінка гетерозиготна за цією мутацією одружується з чоловіком, який є гетерозиготою за іншою мутацією гена Х. Який прогноз стосовно народження хворої дитини у цьому шлюбі?

Питання для самостійного опрацювання

1. Генотерапія як наука. Розвиток генної терапії.
2. ДНК-діагностика. Методи ДНК-діагностики, їх застосування.

3. Методи генної терапії *in vivo* та *ex vivo*.
4. Конструювання лікарських препаратів нового покоління.
5. Методи наноманіпуляцій з біополімерами. Принципи розрахунків і передбачення молекулярної структури.
6. Застосування системи геномного редагування CRISPR/Cas9 для швидкого моделювання канцерогенезу, нокауту і внесення нових генів.
7. Геноміка. Наукові напрямки геноміки.
8. Протеоміка. Наукові дослідження протеоміки.
9. Біоінформатика як наука про аналіз молекулярно-біологічних даних.
10. Характеристика геномних баз даних.
11. Пошук та аналіз інформації про амінокислотні послідовності білків
12. Пошук та аналіз інформації про нуклеотидні послідовності генів людини.

Література

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – С. 442 – 514.
2. Медична генетика : підручник для вузів / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, А.В. Шевеленкова, М. М. Чеснокова. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. – С. 203 – 218.
3. Федоренко В.О. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. 559.
4. Тоцький В.М. Генетика : підручник / В.М. Тоцький. – Вид. 3-є, випр. та доп. – Одеса : Асторовпринт, 2008. – С. 628 – 686.

Практичне заняття № 8

Біосенсорика і біонанотехнології

Мета: ознайомитися із типами, підходами до конструювання та основними принципами роботи біосенсорів, а також основними напрямками розвитку біонанотехнологій.

Теоретичні відомості

Постійно зростаюча необхідність поліпшення охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, перевірки якості харчових продуктів і питної води, збільшення кількості клінічних тестів у медичній та ветеринарній діагностиці потребують дедалі ширшого використання у практиці нових методів аналізу. Традиційні підходи для визначення аналізів недостатньо селективні або неекономічні у повсякденному використанні їх лабораторії. З огляду на це сьогодні є актуальним питання створення більш зручного, швидкого та дешевого методу визначення вмісту різноманітних аналітів у досліджуваних зразках.

Біосенсорика – це новітня галузь аналітичної біотехнології, одним з основних напрямів якої є розробка електрохімічних біосенсорів. **Біосенсор** – найновіше досягнення біоаналітичної хімії, основною особливістю якого є просторово-функціональне поєднання біоелемента з фізичним або фізико-хімічним перетворювачем первинного сигналу, генерованого при біоселективній взаємодії біоелемента (біоселективна мембрана) з аналітом. Згідно з класифікацією IUPAC, біосенсор – це автономний інтегральний аналітичний прилад, який забезпечує кількісний чи напівкількісний аналіз, із використанням біологічного розпізнавального елемента, що перебуває у прямому контакті з фізичним перетворювачем. Біосенсор перетворює зміну фізико-хімічних характеристик біоматриці на електричний чи оптичний сигнал з амплітудою, яка залежить від концентрації певної речовини у розчині. Функціонально прилад складається з двох частин: біоматриці – детектувального шару іммобілізованого біоматеріалу та перетворювача. У ролі біоелемента можуть виступати інтактні органи, шматочки тканин, мікроорганізми, органели, природні біомембрани, ферменти, антитіла і антигени, нуклеїнові кислоти та інші біомолекули, а також біоміметики, які імітують структурно-функціональні особливості природного біоелемента (див. додаток Р). **Біоелемент** є аналіт-впізнаючим елементом, який забезпечує селективне зв'язування або біохімічне / метаболічне перетворення аналіту, що веде до зміни фізичних або фізико-хімічних характеристик контактного трансдуктора (перетворювача). У ролі трансдуктора у біосенсорних системах використовують електрохімічні, оптичні, термоелектричні, акустичні, транзисторні та інші елементи. Біосенсори розглядають як інформаційні перетворювачі, в яких первинна енергія біоспецифічних взаємодій слугує для отримання інформації про природу та концентрацію аналіту у пробі. Сьогодні запропоновано кілька **основних типів біосенсорів**, які відрізняються за

характером перетворювача: амперметричні (див. додаток Р), кондуктометричні, потенціометричні (зазвичай, на основі рН-залежних польових транзисторів), термісторні та оптичні. Перші три типи мають спільну електрохімічну природу і об'єднуються під спільним терміном “електрохімічні біосенсиори” (див. додаток С). Основна принципова відмінність між ними полягає у природі вимірюваного електрохімічного сигналу: сили струму (амперометричні), різниці потенціалу (потенціометричні), електричної провідності (кондуктометричні). При використанні термісторних перетворювачів вимірюється зміна температури завдяки тепловому ефекту аналітичної реакції, а в оптичних – інтенсивність генерованої світлової енергії. Важливими **перевагами біосенсорів** є висока чутливість та селективність, можливість мініатюризації, сумісність із комп'ютерними процесорами, легкість обробки даних, простота використання, швидкість аналізу, широкий діапазон речовин, які можна детектувати, та низька собівартість аналізу, а недоліками – обмежена стабільність та складність у приготуванні біоселективної мембрани. Завдяки цим перевагам біосенсиори стали приладами нового покоління. Сьогодні активно ведуться дослідження стосовно конструювання ефективних біосенсорів для потреб промисловості, біотехнології, медицини. Конструювання біосенсорів спричинило справжній бум у галузі аналітичної біотехнології.

Розвиток біосенсорів нерозривно пов'язаний із **розвитком мікросистемних технологій**. Великий прогрес у розробці мікроелектродів став можливим завдяки сучасним досягненням у галузі мікромеханіки, збільшення чутливості та якості супутного електричного обладнання. Водночас прогрес у математиці і комп'ютерній техніці забезпечив можливість теоретичного моделювання мікросистем, їхньої роботи за різних умов, оцінки їхньої чутливості і співвідношення “сигнал/ шум”, водночас знизивши витрати на проведення додаткових експериментів. До того ж мініатюризація таких систем дала змогу зменшити витрати на реагенти, що використовуються в аналізі, зробила їх зручнішими в експлуатації та транспортуванні. Усі ці явно позитивні чинники обумовили успішну комерціалізацію деяких біосенсорів.

Біонанотехнології – це технології, які здійснюють конструювання нових матеріалів і приладів на основі природних чи синтетичних макромолекул, а також нових біологічних структур на основі синтетичних біополімерів. Біонанотехнології використовують не тільки для створення нових матеріалів. На основі біомолекул можна створювати “молекулярні машини”, різноманітні прилади і сенсори. При розробці молекулярних машин активно ведуться дослідницькі роботи. Доведено, що можна створити рухливі наноструктури, “крокуючі роботи”, виготовлені із молекул ДНК. Вони здатні рухатися у певному напрямку по молекулі ДНК при підведенні до них енергії. Щодо наносенсорів (ДНК-залежних перемикачів, молекулярних сенсоров, сенсоров на основі гібридних конструкцій, які складаються із нуклеїнової кислоти і білка), то вони уже широко використовуються у молекулярній діагностиці. Розроблено декілька діагностичних систем для медицини, що базуються на олігонуклеотидах, які самозбираються у комплекс на аналізованій ДНК, отримано патенти на такі системи і ДНК-чіпи. Винайдено нанорозмірні

неорганічні структури – “квантові краплі”, які за рахунок квантових ефектів різноколірно забарвлені. Вони можуть бути використані як спектральні мітки для діагностичних систем. Розроблено оригінальні біосенсиори для візуалізації певних вірусних РНК. Перевагами нових нанобіосенсорів є селективність стосовно к РНК, висока чутливість, стабільність біосенсорів *in vitro* та *in vivo*.

Надзвичайно важливим напрямом біонанотехнологій є **створення із ДНК нових матеріалів, різних двомірних і трьохмірних структур**. На їхній основі можуть бути отримані принципово нові матеріали для електроніки. Ведуться роботи з отримання хімічно модифікованих нуклеїнових кислот, потрібних для отримання таких матеріалів.

Важливим завданням біонанотехнології є **створення засобів доставки терапевтичних препаратів** у певні види клітин. Зокрема, розробляються методи скерованого введення до патологічних клітин ДНК і РНК, що є потрібним для успішного розвитку генотерапії.

Одним із найбільш розвинутих напрямів нанотехнологій є **біочіпові технології**, які широко використовуються у сучасній біології та медицині. Біочіпова технологія – сучасна нанотехнологія аналізу генетичного матеріалу, дає змогу проводити скринінг складних сумішей нуклеїнових кислот. Це індустрія високих технологій, які базуються на сучасних досягненнях хімії, біології, фізики, мікроелектроніки, інформатики та інших галузей знань. **Біочіп** є пластинкою, яка містить на своїй поверхні велику кількість різних зондів – фрагментів нуклеїнових кислот чи олігонуклеотидів, розміщених у чіткому порядку. За допомогою такого чіпу можна спостерігати за функціонуванням усіх генів в організмі людини, що вже робиться у сучасних лабораторіях. Для медичних потреб розроблено чіпи для виявлення різних генотипів вірусу гепатиту С, різних варіантів вірусу віспи тощо.

План заняття

1. Ознайомтеся з основними класами електрохімічних біосенсорів, їхніми характеристиками, особливостями конструювання та дайте відповіді на запитання:

1.1. Де використовують біосенсиори та з якою метою?

1.2. Які біосенсиори називають амперметричними? Охарактеризуйте електрохімічні принципи їхнього функціонування та технології створення.

1.3. Які біосенсиори називають кондуктометричними? Охарактеризуйте електрохімічні принципи їхнього функціонування та технології створення.

1.4. Назвіть принципи функціонування ферментативних електрохімічних біосенсорів на основі глюкозооксидази і алкогольоксидази.

1.5. Які матеріали та підходи використовують для іммобілізації біологічного матеріалу?

2. Ознайомтеся з ДНК-аналітичними технологіями та дайте відповіді на запитання:

2.1. Що таке ДНК-матриці? Вкажіть їхнє використання у фундаментальних і прикладних дослідженнях.

2.2. Яке діагностичне значення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)?

3. Ознайомтеся з основними напрямками біонанотехнологій та дайте відповіді на запитання:

3.1. Що таке біонанотехнології?

3.2. Дайте характеристику науковим напрямкам біонанотехнологій.

3.3. Які здобутки біонанотехнологій Вам відомі?

4. Виберіть одну або кілька правильних відповіді.

4.1. Каталітичними біоелементами біосенсорів можуть бути:

- а) клітини мікроорганізмів;
- б) антитіла;
- в) рецептори;
- г) ферменти;
- д) біоміметики.

4.2. Для побудови ензимних електродів біосенсорів використовують:

- а) полікарбонатну мембрану;
- б) електроосадження матриці з ферментом на поверхню електрода;
- в) клітини, органели, ДНК;
- г) імобілізацію фермента на «голу» поверхню електрода.

4.3. До інформаційних технологій, у яких використовуються біоеlementи у якості розпізнавальних елементів, належать:

- а) інженерна ензимологія;
- б) аналітична біотехнологія;
- в) ферментативна кінетика;
- г) біосенсорика;
- д) ДНК-чіпування.

4.4. ДНК-чіпи застосовують для визначення:

- а) для кількісного та якісного складу біологічних рідин;
- б) експресії генів у різних тканинах;
- в) спектру білків у різних тканинах;
- г) одонуклеотидних поліморфізмів.

4.5. Біонанотехнології дають змогу здійснювати:

- а) зборку наноструктур із біомолекул;
- б) молекулярне клонування;
- в) наноконтейнери для доставки лікарських засобів;
- г) зборку рекомбінантних молекул;
- д) зборку білків.

Питання для самостійного опрацювання

1. Біосенсорика як наука.
2. Біосенсори – новий клас аналітичних приладів.
3. Основні класи електрохімічних біосенсорів.
4. Амперометричні біосенсори: принципи конструювання і функціонування.

5. Безмедіаторні і медіаторні амперометричні біосенсиори.
6. Кондуктометричні біосенсиори: принципи конструювання і функціонування.
7. Ферментні і мультиферментні біосенсиори.
8. Клітинні біосенсиори.
9. Принципи іммобілізації біологічного матеріалу.
10. Матеріали для іммобілізації ферментів.
11. Методи іммобілізації біологічного матеріалу.
12. Біосенсиори на основі імунних реакцій.
13. Біосенсиори на основі нуклеїнових кислот.
14. Біосенсиори на основі світлочутливих мембран.
15. Комерційні варіанти систем на основі біосенсорів.
16. Аналізатори для клінічної діагностики.
17. Портативні аналізатори для використання в домашніх умовах.
18. Системи для *in vivo* моніторингу у клінічних умовах.
19. Аналізатори для харчової промисловості, біотехнологічного виробництва та екологічного моніторингу.
20. Біонанотехнології: основні напрями, підходи, здобутки.

Література

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Х : Федорко, 2008. – С. 292 – 303.
2. Дзядевич С. В. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів / С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін. – К. : Наук. думка, 2006. – С. 3 – 177.
3. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посібник [для студентів біологічних факультетів університетів] / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка. – 2007. – С. 254 – 257.
4. Корпан Я.І., Гончар М.В., Стародуб М.Ф., Єльська Г.В. Біосенсиори на основі клітин мікроорганізмів / Я. І. Корпан, М. В. Гончар, М. Ф. Стародуб, Г. В. Єльська // Біополімери і клітина. – 1995. – Т. 11. – № 2. – С. 15 – 45.
5. Яворська Г. В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П., Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка. – 2008. – С. 169 – 180.

ЗАВДАННЯ ПІДВИЩЕНОЇ СКЛАДНОСТІ

1. Вказати, чим контролюються біосинтез треоніну в *E. coli*:
 - а) надлишком треоніну; б) надлишком треоніну та ізолейцину;
 - в) не контролюється за механізмом зворотного зв'язку; г) надлишком лізину.
2. Обрати методи, що використовуються для виділення та очистки ферментів у промислових масштабах:
 - а) іонообмінної хроматографії; б) афінної хроматографії;
 - в) електрофорезу; г) ультрафільтрації; д) жоден із методів.
3. Обрати характеристики таких ферментів, як папаїн, бромелін, фіцін:
 - а) протеолітичні, рослинного походження;
 - б) амілолітичні, рослинного походження;
 - г) використовують для обробки ячменю при виробництві пива;
 - д) протеолітичні, тваринного походження;
 - е) використовуються як ферментні препарати для обробки м'яса з метою його пом'якшення.
4. Діючи на ДНК ультразвуком, отримано фрагменти з повністю спареними («тупими») кінцями. Як їх увести у векторну молекулу:
 - а) подіяти на них ендонуклеазою рестрикції;
 - б) подіяти на них ДНК-лігазою;
 - в) приєднати до них полі-А-послідовності, а до розщепленого вектора – полі-Т-послідовності та з'єднати їх ДНК-лігазою;
 - г) приєднати до них полі-Т-послідовності, а до розщепленого вектора – полі-Ц-послідовності та подіяти на них термінальною полінуклеотид-трансферазою.
5. Білкова інженерія дає змогу конструювати:
 - а) мутантні гени;
 - б) химерні білки;
 - в) отримувати біоміметики;
 - г) трансгенні організми
6. Саузерн блоттинг – це метод, у якому:
 - а) рестрикують ДНК та аналізують розміри рестриктів;
 - б) фрагментовану ДНК переносять на нейлонову мембрану;
 - в) використовують рестриктази та лігази для побудови генетичних карт векторів;
 - г) за допомогою зонда визначають цільову нуклеотидну послідовність у зразку.
7. Геномну дактилоскопію (ДНК-типуння) використовують:
 - а) у полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР);
 - б) у судовій медицині для ідентифікації біологічних зразків;
 - в) у побудові рестрикційних (фізичних) карт молекул ДНК;
 - г) для встановлення батьківства.
8. Оберіть праймер, що використовують для конструювання бібліотеки клонів кДНК у реакції зі зворотною транскриптазою:
 - а) oligoA;

- б) oligoT;
 - в) oligoC;
 - г) праймер не потрібен
9. Метаболічна інженерія займається:
- а) клонуванням генів;
 - б) дослідженням специфічних особливостей метаболізму та їхньою модифікацією у різних організмів;
 - в) конструюванням нових організмів і систем із спрямовано зміненими метаболічними перетвореннями субстратів у продукти життєдіяльності;
 - г) трансплантацією ембріонів;
 - д) ампліфікацією генів.
10. З якою метою плазмідний вектор після рестрикції та перед лігуванням із чужорідним фрагментом часто піддають обробці фосфатазою:
- а) підвищити ефективність роботи лігази;
 - б) підвищити вихід рекомбінантної ДНК;
 - в) запобігти лігуванню між фрагментами;
 - г) запобігти денатурації ДНК.
11. Визначити гени, які замінює у фаговій ДНК клонований фрагмент при клонуванні за допомогою фага Λ :
- а) гени білків оболонки фага; б) гени реплікації фагової ДНК;
 - в) гени інтеграції/ексциції фагової ДНК у бактерійний геном;
 - г) гени лізису бактерійної клітини.
12. Обрати, що використовують для трансформації бактерій космідою:
- а) обробку CaCl_2 ; б) електропорацію; в) бактеріофаг λ ; г) космічні промені.
13. Яке визначення зворотної транскриптази правильне:
- а) ДНК-залежна ДНК-полімераза; б) ДНК-залежна РНК-полімераза;
 - в) РНК-залежна ДНК-полімераза; г) РНК-залежна РНК-полімераза.
14. Зазначити, що відбувається на етапі охолодження у кожному циклі полімеразної ланцюгової реакції:
- а) ренатурація ДНК; б) ренатурація Taq-полімерази;
 - в) зупинка синтезу ДНК; г) реасоціація праймерів із матрицею.
15. Визначити, для чого застосовують процедуру RT-PCR:
- а) ампліфікації рестриктного фрагмента ДНК;
 - б) ампліфікації кДНК;
 - в) ампліфікації рекомбінантної Т-міченої ДНК;
 - г) ампліфікації транспортної РНК.
16. Визначити, яку каталітичну активність має Кленов-фрагмент ДНК-полімераза I:
- а) полімеразну та 3'-екзонуклеазну; б) 3'- та 5'-екзонуклеазну;
 - в) полімеразну та 5'-екзонуклеазну; г) усі зазначені.
17. Зазначити, чому ген стійкості до дії антибіотика є необхідним у складі плазмідного вектора:
- а) з метою підвищення життєздатності трансформованих бактерій;
 - б) для ідентифікації трансформованих бактерій;

- в) для підсилення ефективності трансформації;
г) для підвищення стабільності плазмід; д) плазмід.
18. Обрати найголовнішу з перерахованих проблем експресії еукаріотичних білків у бактерійних клітинах:
а) наявність у бактерій хроматинових структур;
б) наявність у бактерій еукаріотичної системи поліаденілювання мРНК;
в) відсутність у бактерій еукаріотичної системи кепування мРНК;
г) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій.
19. Обрати організми, в яких використовують експресибельні вектори на основі ДНК бакуловірусів для експресії білків:
а) бактерії; б) дріжджі; в) клітини комах; г) клітини ссавців.
20. Підвищити термостабільність рекомбінантного білка можна здійснивши заміни кількох амінокислот на:
а) ала;
б) цис;
в) трп;
г) вал.
21. Вказати правильне використання Ті-плазмід:
а) клонування ДНК за допомогою Т-парних бактеріофагів;
б) інтеграції трансгена у дріжджовий геном;
в) інтеграції трансгена у рослинний геном;
г) інтеграції трансгена у геном тварин.
22. Обрати правильні способи відбору особин або клітин, у яких відбулася специфічна інтеграція трансгена у певне місце генома:
а) схрещування за спеціальною схемою;
б) рестриктний аналіз;
в) полімеразна ланцюгова реакція;
г) фінгерпринтинг ДНК.
23. Зазначити, на чому базується метод секвенування ДНК за Сенджером:
а) специфічному гідролізу ДНК поряд з нуклеотидом певного типу;
б) зупинці синтезу ДНК після приєднання певного дидезоксинуклеотиду;
в) детекції вивільнення пірофосфату після приєднання певного нуклеотиду;
г) пірофосфорилуванні нуклеотиду певного типу.
24. Обрати праймер, що використовують для приготування бібліотеки клонів кДНК у реакції зі зворотною транскриптазою:
а) oligoA; б) oligoT; в) oligoC; г) праймер не потрібен.
25. Зазначити, на чому базується метод піросеквенування ДНК:
а) специфічному гідролізу ДНК поряд із нуклеотидом певного типу;
б) зупинці синтезу ДНК після приєднання певного дидезоксинуклеотиду;
в) детекції вивільнення пірофосфату після приєднання певного нуклеотиду;
г) пірофосфорилуванні певного нуклеотиду.
26. Визначити найбільш ефективну процедуру інтеграції трансгена у геном тварини:
а) мікроін'єкція ДНК у чоловічий пронуклеус;

- б) трансфекція ембріональних стовбурових клітин;
 - в) перенесення соматичного ядра до заплідненої яйцеклітини;
 - г) інфікування стовбурових клітин бактеріофагом λ .
27. Очищені ДНК-полімерази і синтетичні олігонуклеотиди ДНК можна використовувати для ампліфікації окремих ділянок генома за допомогою методу:
- а) полімеразно ланцюгової реакції; б) фосфаттриєфірного;
 - в) фосфідтриєфірного; г) секвенування.
28. Як називається набір векторних молекул, які містять увесь геном організму:
- а) клонотека; б) генофонд; в) геномна бібліотека; г) генотип.
29. Визначити, що таке рестриктази:
- а) ендонуклеази, специфічні до невеликих елементів послідовності нуклеотидів;
 - б) рестриктні топоізомерази; в) рестриктні ДНК-полімерази.
30. Визначити сполуки, які потребують для своєї активності рестриктази:
- а) АТФ; б) ГТФ; в) усі чотири нуклеозидтрифосфати; г) не потребують нуклеозидтрифосфатів.
31. Визначити, що залишається на кінцях молекули ДНК після розрізання її рестриктазою:
- а) вільні одноланцюгові 5'-кінці; б) вільні одноланцюгові 3'-кінці;
 - в) не залишається вільних одноланцюгових кінців;
 - г) реалізуються усі можливості залежно від типу рестриктази.
32. Обрати групи, між якими Т4-лігаза утворює фосфодиефірний зв'язок:
- а) 5'-фосфатом і 3'-гідроксильною групою дезоксирибози;
 - б) 3'-фосфатом і 5'-гідроксильною групою дезоксирибози;
 - в) 5'- і 3'-фосфатом; г) 5'- і 3'-гідроксильними групами.
33. Обрати, що має містити плазмід як вектор для клонування:
- а) сильний промотор; б) ориджин реплікації;
 - в) сайт зв'язування ДНК-полімерази I;
 - г) унікальний сайт рестрикції.
34. Визначити, що таке полілінкер:
- а) ділянка ДНК, що використовується для рекомбінації;
 - б) ділянка ДНК, що містить декілька сайтів для різних лігаз;
 - в) ділянка ДНК, що містить декілька унікальних сайтів рестрикції;
 - г) ділянка ДНК, від якої залежить ефективність трансформації.
35. Визначити специфічність дії нуклеази S1:
- а) здійснює гідроліз дволанцюгових нуклеїнових кислот;
 - б) здійснює гідроліз одноланцюгових нуклеїнових кислот;
 - в) здійснює гідроліз гібридів РНК-ДНК;
 - г) здійснює гідроліз одного фосфодиефірного зв'язку всередині ланцюга;
 - д) руйнування одониткових петель та одониткових ділянок навпроти прогалин.
36. Як за допомогою генно-інженерних методів модифікувати *Zygotomonas mobilis*, щоб можна було використовувати цей мікроорганізм для отримання етанолу із ксилози?

37. Що таке ендонуклеази рестрикції II типу і чому вони є такими важливими для технології рекомбінантних ДНК?
38. При обробці кільцевої плазміді pCEL1 різними рестриктазами та їхніми комбінаціями отримують такі фрагменти (розміри наведені у парах нуклеотидів): *EcoR1* – 6,0; *BamH1* – 6,0; *HindIII* – 6,0; *HaeII* – 3,0 і 1,0; *EcoR1* і *HaeII* – 2,0 і 1,0; *EcoR1* і *HindIII* – 3,5 і 2,5; *EcoR1* і *BamH1* – 4,5 і 1,5; *BamH1* і *HindIII* – 5,0 і 1,0; *BamH1* і *HaeII* – 3,0; 1,5 і 0,5; *HindIII* і *HaeII* – 3,0; 1,5 і 0,5. Використовуючи ці дані, побудуйте рестрикційну карту плазміді pCEL1.
39. Здебільшого банк клонів створюють лігуванням плазмідного вектора, який піддають повному гідролізу за допомогою *BamH1* із хромосомною ДНК, частково гідролізованою рестриктазою *Sau3A1*: а) чому в цьому експерименті використовується два різних ферменти; б) що таке частковий гідроліз і як його проводять; в) чому його так часто використовують для створення банків клонів?
40. Чому рестриктовану плазмідну ДНК перед лігуванням часто обробляють лужною фосфатазою?
41. Які дві стратегії хімічного синтезу гена завдовжки 0,5 т.п.н. Ви можете запропонувати? Яку з них ви оберете?
42. Що таке дидезоксинуклеотиди? Як із їхньою допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК?
43. Як визначають нуклеотидну послідовність клонованої ДНК за допомогою векторної системи на основі фага M13?
44. Як, приєднуючи ферменти до моноклональних антитіл чи їхніх Fv-фрагментів, можна отримати лікарські препарати?
45. Як отримати моноклональні мишині антитіла, максимально близькі за структурою до антитіл людини? Чому вони так потрібні?
46. Як підвищити кількість триптофану, що синтезується *Corynebacterium glutamicum*?
47. Відібравши три штами *Pseudomonas*, один із яких використовує фенол як єдине джерело вуглецю при 0°C, другий розщеплює антрацен з утворенням катехолу при 35 °C, а третій розщеплює *n*-толуол з утворенням протокатехоата при 35 °C, запропонуйте стратегію створення штаму, який зможе використати як єдине джерело вуглецю фенол, антрацен чи *n*-толуол при 0°C.
48. Як модифікувати штам *Pseudomonas*, що має плазмиду pWWO і не здатний розщеплювати 4-етилбензоат, аби він міг утилізувати цю сполуку?
49. Які параметри потрібно чітко контролювати при оптимізації процесу ферментації?
50. Чому *Ti*-плазмідна *Agrobacterium tumefaciens* підходить для створення вектора – переносника чужорідного гена до хромосомної ДНК рослини?
51. Чим відрізняються бінарна та коінтегративна векторні системи?
52. Що таке репортерні гени і як вони використовуються при трансформації рослинних клітин?
53. У чому полягає метод бомбардування клітин мікрочастинками, який використовується для трансформації рослин?

54. Запропонуйте декілька стратегій створення рослин, стійких до комах-шкідників.
55. Як за допомогою антизмістовної РНК можна забезпечити стійкість рослин до специфічних вірусів?
56. Як інгібітори протеаз, інгібітор амілази і холестеролоксидаза захищають рослини від комах-шкідників?
57. Що таке миші з “нокаутним” геном? Як і для чого отримують таких мишей?
58. Які переваги і недоліки трансгенних мишей як модельних систем для дослідження захворювань людини?
59. Чи можна молочну залозу використати як “біореактор” для синтезу комерційних продуктів?
60. Що таке генетичний поліморфізм? Чому поліморфні локуси важливі для картування генів захворювань людини?

ВІДПОВІДІ ДО ЗАВДАНЬ підвищеної складності

- 1) а) надлишком треоніну;
- 2) д) жоден з методів;
- 3) а) протеолітичні, рослинного походження;
- 4) в) приєднати до них полі-А-послідовності, а до розщепленого вектора – полі-Т-послідовності та з'єднати їх ДНК-лігазою;
- 5) б) химерні білки і в) отримувати біоміметики;
- 6) б) фрагментовану ДНК переносять на нейлонову мембрану і в) використовують рестриктази та лігази для побудови генетичних карт векторів;
- 7) б) у судовій медицині для ідентифікації біологічних зразків і г) для встановлення батьківства;
- 8) б) oligoT;
- 9) б) дослідженням специфічних особливостей метаболізму та їх модифікацією у різних організмів і в) конструюванням нових організмів і систем із спрямовано зміненими метаболічними перетвореннями субстратів у продукти життєдіяльності;
- 10) в) з метою запобігти лігуванню між фрагментами;
- 11) в) гени інтеграції / екзиції фагової ДНК у бактерійний геном;
- 12) а) обробку CaCl_2 ;
- 13) г) РНК-залежна РНК-полімераза;
- 14) г) реасоціація праймерів з матрицею;
- 15) б) ампліфікації кДНК;
- 16) а) полімеразну та 3'-екзонуклеазну;
- 17) б) для ідентифікації трансформованих бактерій;
- 18) г) відсутність у бактерій еукаріотичних систем посттрансляційних модифікацій;
- 19) в) клітини комах;
- 20) б) здійснивши заміни кількох амінокислот на цис;
- 21) в) інтеграції трансгена у рослинний геном;
- 22) в) полімеразна ланцюгова реакція;
- 23) б) зупинці синтезу ДНК після приєднання дидезоксинуклеотиду певного типу;
- 24) б) oligoT;
- 25) г) пірофосфорилуванні нуклеотиду певного типу;
- 26) б) трансфекція ембріональних стовбурових клітин;
- 27) а) полімеразна ланцюгова реакція;
- 28) в) геномна бібліотека;
- 29) а) ендонуклеази, специфічні до невеликих елементів послідовності нуклеотидів;
- 30) г) не потребують нуклеозидтрифосфатів;
- 31) а) вільні одноланцюгові 5'-кінці; б) вільні одноланцюгові 3'-кінці;
- 32) а) 5'-фосфатом і 3'-гідроксильною групою дезоксирибози;

- 33) б) ориджин реплікації; г) унікальний сайт рестрикції;
- 34) в) ділянка ДНК, що містить декілька унікальних сайтів рестрикції;
- 35) д) руйнування одониткових петель та одониткових ділянок навпроти прогалин;
- 36) здійснити клонування генів, які відповідають за катаболізм ксилози;
- 37) ендонуклеази рестрикції II типу гідролізують ДНК у чітко визначених сайтах із певною нуклеотидною послідовністю з утворенням липких або тупих кінців, через що є важливими для технології рекомбінантних ДНК;
- 38) на рестрикційній карті плазмиди pCEL1 відмічають сайти рестрикції, відповідно до отриманих фрагментів;
- 39) а) для того, щоб вирізати фрагмент із плазмиди та замістити його на рекомбінантну ДНК у подальшій лігазній реакції; б) частковий гідроліз проводять за умов неповного гідролізу ДНК рестриктазою, в результаті чого утворюється менше рестрикційних фрагментів порівняно з повним гідролізом;
- 40) рестриктовану плазмідну ДНК перед лігуванням обробляють лужною фосфатазою для усунення липких кінців для того, щоб отримати менше баластних продуктів лігування, зокрема, рециклізованих плазмід;
- 41) є дві стратегії хімічного синтезу генів: фосфаттриєфірний і фосфатдиефірний;
- 42) дидезоксинуклеотиди – це нуклеозидтрифосфати, позбавлені 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглецевих атомах вуглеводневого кільця. З їх допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК методом Сенджера;
- 46) підвищити синтез триптофану *C. glutamicum* можна шляхом блокування утворення амінокислот одного метаболічного шляху;
- 47) створити такий штам *Pseudomonas* можна шляхом гібридизації вихідних штамів, які несуть різні плазмиди;
- 48) модифікувати штам *Pseudomonas* можна, ввівши у нього плазмиду pWWO яка містить ген здатний розщеплювати 4-етилбензоат;
- 49) параметри, які потрібно чітко контролювати при оптимізації процесу ферментації: температура, аерація, склад і рН середовища;
- 50) *Ti*-плазміда *A. tumefaciens* здатна проникати, переносити та експресувати включені до неї гени у рослинних клітинах;
- 51) бінарна векторна система характеризується тим, що всі етапи клонування рекДНК у “роззброєну” *Ti*-плазмиду проводять у *E.coli*, після чого їх вводять до клітини *A. tumefaciens*; коінтегративна векторна система характеризується тим, що векторна ДНК рекомбінує у клітинах *A. tumefaciens* із “роззброєною” *Ti*-плазмидою, Т-ДНК якої не містить пухлиноутворювальних генів, так, що увесь вектор клонування вбудовується в неонкогенну *Ti*-плазмиду;
- 52) репортерні гени дають змогу виявити, чи певна генетична конструкція успішно введена у клітину, орган чи тканину; 53) метод бомбардування клітин мікрочастинками використовується для трансформації рослин шляхом уведення рекДНК у їхні клітини за допомогою вольфрамових чи золотих кульок. ДНК осаджують і “покривають” нею кульки та “обстрілюють” ними клітини;

- 55) стратегія використання антизмістовної РНК полягає у її здатності гібридизуватися із РНК рослинних вірусів, у результаті чого вона інактивується;
- 56) ці інгібітори захищають рослини від комах-шкідників шляхом зниження їхньої протеолітичної, амілолітичної і холестеролоксидазної активності, на яких ґрунтується ушкоджувальна дія комах-шкідників;
- 57) миші з “нокаутним” геном позбавлені певного гена; їх використовують для вивчення дії та функціонування продукту цього гена;
- 58) трансгенні миші є зручною моделлю для дослідження захворювань людини;
- 59) молочна залоза може бути використана як “біореактор” для синтезу комерційних продуктів шляхом уведення відповідних рекДНК у геном ВРХ, продукти яких будуть секретуватися у молоко;
- 60) генетичний поліморфізм – явище, що характеризується відмінним нуклеотидним складом у певних локусах генетичної карти особин одного виду; це наявність двох або більше алельних форм окремих генів; поліморфні локуси важливі для картування генів захворювань людини.

СЛОВНИК ОСНОВНИХ ТЕРМІНІВ І ПОНЯТЬ

Адаптор (Adaptor) – 1. Синтетичний, дволанцюговий олігонуклеотид з одним тупим кінцем і одним липким. Після пришивання адаптера тупим кінцем до ДНК-мішені останню можна вбудовувати у відповідний вектор, використовуючи її липкий кінець. 2. Синтетичний одностанцюговий олігонуклеотид, у якого після самогібридизації утворюються липкі кінці і внутрішній сайт для ендонуклеази рестрикції. Коли адаптор вбудовується у вектор клонування, в останнього з'являється новий сайт рестрикції.

Активатор (Activator) – 1. Речовина, що стимулює транскрипцію специфічного гена чи оперона. 2. Білок, що зв'язується з оператором і пришиває транскрипцію; використовується також назва “активаторний білок”.

Алостерична регуляція (Allosteric regulation) – регуляція активності ферменту, що здійснюється ефекторною молекулою, яка зв'язується з ділянкою в молекулі ферменту, віддаленою від активного центру.

Альтернативний сплайсинг (Alternative splicing) – з'єднання екзонів цього гена в різних комбінаціях з утворенням відмінних між собою зрілих молекул мРНК.

Амплікон (Amplicon) – плазмідний вектор вірусу простого герпесу I типу.

Антипаралельна орієнтація (Antiparallel orientation) – протилежна спрямованість ($5' \rightarrow 3'$ і $3' \rightarrow 5'$) ланцюгів у дволанцюгових молекулах нуклеїнових кислот.

Антифризний білок (Antifreeze protein) – білок, багатий аланіном, який утворюється в печінці деяких організмів і запобігає замерзанню плазми крові. Виявлений також у клітинах деяких комах, рослин і бактерій, де він регулює утворення кристалів льоду при низьких температурах.

Аутологічні клітини (Autologous cells) – клітини, отримані від певного організму, культивовані, можливо, генетично змінені і знову введені до організму донора.

Arabidopsis thaliana – рослина з невеликим геномом, що використовується як модельна система для вивчення процесів росту і розвитку.

Бакміда (Bacmid) – човниковий вектор на основі генома AcMNPV, що здатний існувати у клітинах *E.coli* і клітинах комах.

Бактеріоцин (Bacteriocin) – речовина, яка синтезується одним мікроорганізмом і знищує клітини іншого мікроорганізму.

Балістична трансфекція (Biolistics, Microprojectile bombardment) – введення ДНК до клітин рослин і тварин чи органел за допомогою вольфрамових чи золотих кульок. ДНК осаджують, “покривають” нею кульки та “обстрілюють” ними клітини.

Білки теплового шоку (Heat-shock proteins) – білки, що синтезуються у відповідь на різке підвищення температури.

Білок одноклітинних організмів, БОО (Single-cell protein) – білкові продукти, що синтезуються монокультурою мікроорганізмів і використовуються як харчові добавки до харчового раціону тварин.

Бібліотека кДНК (cDNA library) – колекція клонів кДНК, яку синтезують *in vitro* на матрицях мРНК, що походить із однієї тканини чи популяції клітин.

Бінарна векторна система (Binary vector system) – двоплазмідна система *Agrobacterium*, призначена для перенесення ділянки Т-ДНК, що містить клоновані гени у клітинах рослин. Гени вірулентності локалізовані на одній плазміді, а вбудована ділянка Т-ДНК – на другій.

Біоаккумуляція (Bioaccumulation) – накопичення будь-якої речовини (наприклад, ДДТ) в організмах певного трофічного ланцюга.

Біодеградація (Bioremediation) – знешкодження речовин, що потрапили в навколишнє середовище, за допомогою мікроорганізмів.

Біоконтроль (Biocontrol) – процес, у якому використовуються живі організми для обмеження росту і розвитку патогенних мікроорганізмів.

Біомаркер (Biomarker) – біологічна ознака, яка підтверджує прогресування патологічного процесу або ефективність лікування.

Біомаса (Biomass) – 1. Клітинна маса, що утворюється у результаті життєдіяльності живих організмів. 2. Органічна речовина, яка може використовуватись як джерело енергії чи хімічних сполук.

Біореактор, ферментер (Bioreactor) – апарат, у якому здійснюються біохімічні реакції за участю живих мікроорганізмів, клітинних екстрактів чи ферментів.

Біотинове мічення (Biotin labeling) – 1. Приєднання молекули біотину до молекули іншої речовини. 2. Включення біотинвмісного нуклеотиду в молекулу ДНК.

Блоттинг (Blotting) – перенесення розділених молекул з одного середовища (наприклад, гелю) на твердий носій (папір, нітроцелюлозний фільтр).

Бокс Прибнова (Pribnow box) – послідовність нуклеотидів у прокаріот, розташована за 10 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції. Зазвичай складається з 6 нуклеотидів: ТАТААТ.

Бокс Хогнесса (Hogness box) – послідовність нуклеотидів в еукаріот, розташована за 25 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції. Зазвичай складається з 8 нуклеотидів.

Вектор (Vector) – молекула ДНК (наприклад, бактерійна плазміда), що самореплікується і використовується в генній інженерії для перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Вестерн-блоттинг (Western blotting) – перенесення білкових молекул, розділених за допомогою гелі-електрофорезу, на тверду поверхню.

“Відбиток пальців” (DNA fingerprint) – набір рестрикційних фрагментів ДНК, характерний для певного індивідуума. Для отримання “відбитка” використовують або гелі-електрофорез як такий, або в поєднанні з ПЛР-ампліфікацією.

Відкрита рамка зчитування (Open reading frame) – послідовність нуклеотидів, що не містить термінуючих кодонів; кодує поліпептид чи білок.

Вірус-помічник (Helper virus) – вірулентний штам вірусу, за наявності якого дефектний вірус може розмножуватися у клітині-господареві.

“Вироджені” праймери (Degenerate primers) – синтетичні олігонуклеотиди, в одному із сайтів яких містяться різні основи.

vir-Гени (vir Genes) – група генів Ті-плазмиди, які забезпечують перенесення Т-ДНК до клітини рослин.

Вставка (Insert) – сегмент ДНК, вбудований у вектор клонування.

Генеалогічний ДНК-тест (genealogical DNA test) – це тест специфічних послідовностей ДНК, який аналізує конкретні місця геному людини для визначення родових, етнічних та генеалогічних зв'язків. Результати цього тесту інформують про зв'язок та спорідненість конкретного індивіда з відповідними етнічними групами.

Ген “самогубства”, “суїцидний” ген (Suicide gene) – ген, що викликає за певних умов загибель власної клітини.

Генетичний поліморфізм (Genetic polymorphism) – наявність двох або більше алельних форм окремих генів.

Генетичний фінгенпринтинг, фінгерпринтинг або метод генетичних відбитків пальців (**DNA fingerprinting** (also called DNA profiling, DNA testing, or **DNA typing**)) – молекулярно-генетичний метод ідентифікації індивідуумів за характеристикою профілів їх ДНК. Профіль ДНК – це невеликий набір варіантів ДНК, який, ймовірно, може відрізнятися у всіх не споріднених осіб, і водночас, є унікальний для окремих осіб, як і відбитки пальців (звідси альтернативна назва методу).

Ген-кандидат (Candidate gene) – структурний ген у геномі людини, мутація в якому лише ймовірно (до отримання доказів) є причиною конкретного спадкового захворювання.

Ген-мішень (Target gene) – 1. Клонований ген. 2. Ген, що зазнає специфічної дії. 3. Ген, що цікавить дослідника.

Генна імунізація (Genetic immunization) – індукція в організмі імунної відповіді без введення антигена, шляхом включення до клітини гена, що кодує білок-антиген.

Генна терапія ex vivo (Ex vivo gene therapy) – введення гена (чи групи генів) до ізольованих клітин хворого. Після культивування і трансформації клітини вводять до організму хворого за допомогою трансфузії, інфузії або ін'єкції. Ця процедура дає змогу усувати генетичні дефекти.

Генна терапія з використанням “антизмістових” послідовностей (Antisense therapy) – лікування *in vivo* генетичного захворювання шляхом блокування синтезу білка, включення до генома нуклеотидної послідовності, комплементарної специфічній мРНК.

Генна терапія з використанням клітин зародкової лінії (Germ line gene therapy) – введення гена (генів) до заплідненого яйця або клітини ембріона на ранній стадії. Чужорідний ген опиняється в ядрах усіх клітин організму, що розвиваються, у тому числі статевих, і змінює його фенотип.

Генна терапія in vivo (In vivo gene therapy) – введення гена (чи групи генів) безпосередньо до тканини або органа з метою усунення генетичного дефекту.

Генна терапія соматичних клітин (Somatic cell gene therapy) – введення гена до клітини, що відрізняється від статевої, з метою корекції генетичного дефекту.

Геномна бібліотека, банк (бібліотека) генів (Genome library) – набір клонованих фрагментів ДНК, які в сукупності представляють індивідуальний

(груповий, видовий) геном. За наявності великого генома (ссавці) одержують хромосомоспецифічні бібліотеки.

Генотипування (Genotyping) – визначення усіх алелей і усіх локусів певної хромосоми.

Ген-репортер (Reporter gene) – ген, що кодує продукт, який легко можна виявити. Такі гени використовують, щоб переконатися, чи певна генетична конструкція успішно введена до клітини, органа чи тканини.

Гени “домашнього господарства” (Household genes) – набір основних структурних генів, що забезпечують життєдіяльність клітини.

Гетерологічний зонд (Heterologous probe) – сегмент ДНК одного організму, що використовується для скринінгу бібліотеки схожих ДНК іншого організму.

Гібридизація (Hybridization) – спаровування двох полінуклеотидних ланцюгів, часто з різних джерел, з утворенням ДНК/РНК- або ДНК/ДНК-гібридів, що стабілізуються водневими зв'язками.

Гібридизація ДНК (DNA hybridization) – спаровування двох молекул ДНК, часто з різних джерел, завдяки утворенню водневих зв'язків між комплементарними нуклеотидами. Використовується для виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей у досліджуваній ДНК.

Гібридний білок, химерний білок (Fusion protein) – продукт сумісно клонованих двох або більше кодуючих послідовностей із різних генів. Це один поліпептидний ланцюг.

Гібридний ген (Hybrid gene, chimeric gene) – ген, що складається з фрагментів двох або декількох генів і експресується як єдине ціле із утворенням гібридного (химерного) білка.

Гібридома (Hybridoma) – гібридна клітинна лінія, одержана при злитті нормальних антитілоутворювальних (лімфоцитів) і мієломних клітин. Має здатність до необмеженого росту і синтезу моноклональних антитіл.

Гіперваріабельна ділянка (Hypervariable region) – сайт варіабельної частини важкого чи легкого ланцюга молекули імуноглобуліну, що характеризується високою мінливістю в антитілах різної специфічності порівняно з іншими її сегментами – каркасними ділянками.

Глюкозилювання (Glycosylation) – ковалентне приєднання вуглеводного залишку до білкової молекули.

Група несумісності (Incompatibility group) – група плазмід, представники яких можуть співіснувати в одній клітині.

Група сумісності (Compatibility group) – група плазмід, представники якої не здатні співіснувати в одній бактерійній клітині.

Двоцистронний вектор (Dicistronic vector) – клонований вектор, призначений для експресії двох генів в одній клітині ссавців. Гени перебувають під контролем одного промотора і сигналу поліаденілювання.

Дезоксирибозим (Deoxyribozyme) – молекула ДНК, що має каталітичну активність.

Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаза I (Deoxyribonuclease I, DNase I) – фермент, що розщеплює дволанцюгову ДНК. Використовується для очищення препаратів РНК і безклітинних екстрактів.

Дерепресія (Derepression) – індукція транскрипції гена в результаті пригнічення функцій репресора – блокування його зв'язування з промотором.

Дидезоксинуклеотид, ddNTP (Dideoxynucleotide) – нуклеозидтрифосфат, одержаний синтетичним шляхом, і позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглецевих атомах вуглеводневого кільця.

ДНК-зонд (DNA-probe) – фрагмент ДНК, мічений певним способом, що використовується для гібридизації зі специфічною ділянкою у молекулі ДНК. Дає змогу ідентифікувати комплементарні йому послідовності нуклеотидів.

ДНК-лігаза (DNA-lygase) – фермент, що каталізує утворення фосфодієфірного зв'язку між 3'-гідроксильною групою і 5'-фосфатом сусідніх нуклеотидів у місці одноланцюгового розриву молекули ДНК.

ДНК-маркерний сайт, STS (Sequence tagged site) – унікальний для певного локусу олігонуклеотид, який може використовуватися для його ідентифікації методом ПЛР.

ДНК-полімераза (DNA polymerase) – фермент, що каталізує синтез полінуклеотидного ланцюга з окремих нуклеотидів із використанням іншого ланцюга як матриці і ДНК-затравки з вільною 3'-ОН-групою.

ДНК-полімераза Tag (Taq DNA polymerase) – термостабільна ДНК-полімераза (зберігає активність при 95⁰С) бактерії *Thermus aquaticus*. Часто застосовується у методі ПЛР.

Екзонуклеаза III (Exonuclease III) – екзонуклеаза *E.coli*, яка відщеплює нуклеотиди із 3'-кінців дволанцюгової ДНК.

Електропорація (Electroporation) – утворення пор у клітинних мембранах під дією електричного струму. Через ці пори до клітин проникає чужорідна ДНК.

Ендонуклеаза (Endonuclease) – фермент, який гідролізує внутрішні фосфодієфірні зв'язки і розщеплює молекули ДНК та РНК. Ендонуклеази беруть участь у рекомбінації, репарації та рестрикції; в останньому випадку називаються рестриктазами (ендонуклеазами рестрикції).

Епітоп, антигенна детермінанта (Epitope, antigenic determinant) – частина молекули антигена, яка взаємодіє з антигензв'язуючим центром антитіл або Т-клітинним рецептором.

Ерліфтний біореактор (Airlift fermenter) – циліндричний біореактор, у якому перемішування здійснюється потоком газу, що подається знизу.

“Ефект свідка” (Bystander effect) – знищення немодифікованих пухлинних клітин цитотоксичним продуктом, що синтезується сусідніми генетично трансформованими клітинами.

Ефективність трансформації (Transformation efficiency) – показник відношення кількості клітин, що одержали чужорідну ДНК, до кількості трансформуючої ДНК. Виражається числом трансформантів на 1 мкг ДНК.

Ємність вектора (Vector capacity) – максимальний розмір ділянки ДНК, що може бути клонований у певному векторі.

Замісна терапія (Replacement therapy) – введення до організму метаболітів, кофакторів, гормонів, що запобігає їхньому дефіциту, зумовленому генетичним дефектом.

Зворотня транскриптаза (Reverse transcriptase) – РНК-залежна ДНК-полімераза, що використовує молекулу РНК в якості матриці для синтезу комплементарного ланцюга ДНК.

Зворотня транскрипція – полімеразно-ланцюгова реакція (Reverse transcription – polymerase chain reaction) – метод отримання великої кількості кДНК, який складається з двох етапів. Спочатку *in vitro* синтезують кДНК, використовуючи транскриптазу, мРНК як матрицю і oligo(dT) в ролі праймера. Потім кДНК ампліфікують за допомогою ПЛР, використовуючи 2 праймери: один комплементарний ділянці першого ланцюга кДНК, а інший – другому ланцюгу, що комплементарний першому.

Зонд (Probe) – 1. Сполука, мічена певним способом із метою виявлення споріднених біохімічних молекул у складному зразку. 2. Олігонуклеотид, що використовується для виявлення комплементарних послідовностей за допомогою гібридизації.

Імунологічний скринінг (Screening immunological assay) – скринінг геномної бібліотеки, який базується на виявленні продукту гена-мішені імунологічними методами. Проводиться за відсутності відповідного ДНК-зонда.

Інгібування кінцевим продуктом (End-product inhibition) – інгібування ферменту метаболітом – кінцевим продуктом метаболічного шляху.

Індуктор (Inducer, Inductor) – невелика молекула, яка зв'язується з регуляторним білком-репресом, що веде до дерепресії відповідних генів.

Індукція (Induction) – дерепресія гена або групи генів під дією індуктора.

Інсектицид (Insecticide) – речовина чи живий організм, що вбиває комах.

Інтеграція (Integration) – вбудовування чужорідної ДНК (зазвичай за допомогою гомологічної рекомбінації) до хромосоми клітини-господаря.

Інтегративний вектор (Integrating vector) – вектор, спеціально сконструйований для того, аби з його допомогою можна було вбудовувати (інтегрувати) клоновану ДНК до генома клітини-господаря.

Інтрон (Intron) – транскрипційна ділянка гену, що не містить кодонів і вирізається із первинного транскрипта під час процесингу з утворенням функціональної РНК.

Кандидатне картування (Candidate gem cloning) – стратегія ідентифікації гена конкретного захворювання, що ґрунтується на даних про можливий продукт цього гена.

Картування генів (Gene mapping) – визначення положення певного гена на хромосомі відносно інших генів.

Касета (Cassete) – група тандемних, тісно зчеплених, функціонально об'єднаних локусів. Приклад – касетна модель статевих типів у дріжджів.

Клітинна лінія (Cell line) – група клітин, що підтримується у культурі шляхом пересівань.

Клон (Clone) – популяція клітин або молекул, ідентичних одній матричній клітині або молекулі.

Клонування (Cloning) – сукупність процедур, що використовуються для отримання клонів. Клонування багатоклітинних організмів, наприклад, включає пересадку (трансплантацію) ядер соматичних клітин в запліднене яйце з видаленим пронуклеусом.

Клонування генів (Gene cloning) – система методів, що використовуються для отримання клонованих ДНК: виділення потрібного гена з якого-небудь організму, вбудовування його у плазмиду (вектор), введення до клітини організму-господаря, багатократна реплікація.

Коінтегративна векторна система (Cointegrative vector system) – двоплазмідна система, що використовується для перенесення клонованих генів до рослинної клітини.

Комплементарний гомополімерний “хвіст” (Homopolymeric tail) – гомополімер із дезоксирибонуклеозидмонофосфатів, що приєднується до 3'-ОН-кінців обох ланцюгів фрагмента ДНК із тупими кінцями. Створення комплементарних “хвостів” (наприклад, *poly(A)* у вбудовуваному фрагменті ДНК і *poly(T)* у векторі) дає змогу клонувати фрагмент у складі рекомбінантної плазмиди.

Комплементация (Complementation) – відновлення фенотипу дикого типу (чи близького до нього фенотипу) при об'єднанні в одній клітині двох ДНК із двома рецесивними мутаціями, що перебувають у транс-конфігурації.

Конкатемерні молекули (Concatemeric molecules) – довгі молекули ДНК, які складаються з декількох тандемних одиниць, що повторюються. У такій формі перебуває геном деяких фагів під час реплікації.

Конститутивний синтез (Constitutive synthesis) – синтез РНК чи якого-небудь білка, що постійно відбувається у клітині чи цілому організмі.

Контиг (Contig) – безперервний набір клонів, що охоплюють певну ділянку хромосоми або всю хромосому.

Контрансфекція (Contransfection) – введення до однієї еукаріотичної клітини двох різних молекул ДНК при наявності системи експресії на основі бакуловірусів – процедура одночасного введення бакуловіруса і вектора до клітини комах у культурі.

Конформаційний поліморфізм одноланцюгової ДНК, SSCP (Single-strand conformational polymorphism) – відмінності в конформації одноланцюгових ДНК, що відрізняються одна від одної лише одним нуклеотидом. Аналізовані ДНК піддають денатурації. Денатуровані ланцюги набувають різної конформації і при гель-електрофорезі мігрують із різною швидкістю.

Кон'югативні плазмиди (Conjugative plasmids) – плазмиди, які здатні передаватися від однієї клітини до іншої під час кон'югації.

Корепресор (Corepressor) – невелика молекула, що зв'язується з неактивним репресором (апорепресором) з утворенням комплексу, що приєднується до оператора і блокує транскрипцію.

Корончатий гал (Crown gall) – пухлина рослин, утворення якої викликають бактерії роду *Agrobacterium*.

Косегрегація (Cosegregation) – феномен, суть якого в тому, що дві ознаки успадковуються спільно, тобто їхні гени при кросинговері не розщеплюються.

Косміда (Cosmid) – вектор, який об'єднує властивості плазмідного вектора і вектора на основі фага λ та містить *cos*-сайти.

Косупресія (Cosuppression) – пригнічення експресії специфічного рослинного гена при трансформації рослини додатковою копією цього гена, включеною до “змістовної” орієнтації.

Коферментація (Cofermentation) – одночасне культивування двох мікроорганізмів в одному біореакторі.

Ксенобіотик (Xenobiotte) – сполука, одержана синтетичним шляхом, а не синтезована живим організмом.

Культура (Culture) – популяція клітин чи мікроорганізмів, які вирощують у контрольованих умовах *in vitro*.

Культуральне середовище (Culture medium) – тверде або рідке середовище, що використовується для вирощування мікроорганізмів *in vitro*.

Лігування (Ligation) – з'єднання двох молекул ДНК за допомогою фосфодіефірних зв'язків. *In vitro* каталізує ферментом ДНК-лігазою фага Т4.

Лігування олігонуклеотидних зондів, ЛОЗ (Oligonucleotide ligation assay) – метод виявлення однонуклеотидних замін у гені-мішені за допомогою коротких олігонуклеотидів, комплементарних протилежним ланцюгам тестованого зразка ДНК. Якщо заміна відсутня, то обидва олігонуклеотиди повністю гібридизуються з ДНК, і після додавання до реакційної суміші ДНК-лігази відбувається їхнє зшивання (лігування). У протилежному випадку зшивання неможливе.

Лінкер (Linker) – синтетичний олігонуклеотид, що містить сайт рестрикції. Використовується для з'єднання векторної і клонованої ДНК, до кінців якої методом пришивання тупих кінців приєднані лінкери.

Липкі кінці (Cohesive ends) – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, що виступають на кінцях дволанцюгової молекули; утворюються в результаті східчастих розщеплень дволанцюгових ДНК.

Маркерні експресибельні послідовності, EST (Expressed sequence tag) – короткі маркерні послідовності, характерні для кожного експресибельного гена людини. Дають змогу вивчати розміри, різноманітність і транскрипційну активність експресибельних генів людини.

Маркерний ген (Marker gene) – ген із відомою хромосомною локалізацією, що має чіткий фенотипічний прояв (стійкість до антибіотика, ферментативна активність тощо).

Маркерний пептид (Marker peptid) – ділянка гібридної білкової молекули, що полегшує ідентифікацію або очищення білка.

Метаболічне навантаження (Metatotic load) – порушення метаболізму організму-господаря у результаті введення до його генома і експресії чужорідної ДНК.

Метод відбитків (реплік) (Replica plating) – перенесення колоній мікроорганізмів з однієї чашки Петрі на іншу за допомогою оксамитової “печатки” з повним збереженням взаємного розташування колоній.

Метод випадкових праймерів (Random primer method) – спосіб отримання мічених ДНК-зондів, який ґрунтується на застосуванні синтетичних олігонуклеотидів, що містять усі можливі комбінації з шести нуклеотидів, два з них гібридизуються з денатурованою ДНК-мішенню.

Мікроін'єкція (Microinjection) – введення до ізольованої еукаріотичної клітини ДНК або інших молекул за допомогою тонкої голки.

Міні-сателітна ДНК людини (Human minisatellite DNA) – некодуюча ДНК людини, зазвичай містить у великій кількості GC, а також тандемні повтори коротких (завдовжки 9 – 40 п.н.) сегментів.

Мітка (Label) – радіоактивний ізотоп чи ліганд, який ідентифікується біохімічними або імунологічними методами (наприклад, флуорофор), що зв'язується з макромолекулою. Дає змогу знайти мічену речовину у зразку.

Мішень (Target) – у широкому значенні – біологічний об'єкт (тканина, молекула, клітина, мікроорганізм), який цікавить дослідника.

Молекулярна діагностика (Molecular diagnostic) – виявлення молекулярно-біологічними методами патогенного мікроорганізму, специфічної речовини або зміненої нуклеотидної послідовності, яка спричиняє те чи те захворювання.

Моноклональні антитіла (Monoclonal antibodies) – однотипні антитіла, суто специфічні стосовно одного епітопу (антигенної детермінанти). Синтезуються гібридами – клітинними гібридами, одержаними при злитті нормальних антитілоутворювальних клітин із мієломною пухлинною клітиною, здатною до необмеженого росту. Деякі мієломні клітини синтезують моноклональні тіла самостійно.

Мультилокусна генетична карта, карта зчеплення (Multipoint map, multilocus Jinkage map) – схема, на якій відображено взаємне розташування локусів на хромосомах певного організму.

Негативна регуляція (Negative control) – тип регуляції, при якому транскрипція гена пригнічується регуляторним білком (репресором); відповідно при інактивації білка-регулятора структурні гени залишаються в активному стані.

Неметаболізуючі індуктори (Gratuitous inducers) – речовини, що індукують синтез індукцибельних ферментів, не виступають для них субстратами, а тому залишаються у початковому вигляді.

Нозерн-блоттинг (Nothern blotting) – перенесення молекул РНК, які піддали електрофорезу, з гелю на тверду поверхню (нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) із подальшою ДНК-РНК-гібридизацією.

“Нокаут” (Knockout) – спрямоване руйнування гена за допомогою гомологічної рекомбінації.

Нуклеаза S1 (S1 nuclease) – фермент, що специфічно деградує одноланцюгову ДНК.

Одноланцюговий розрив (Nick) – розрив фосфодієфірного зв'язку між сусідніми нуклеотидами в одному ланцюзі ДНК.

Олігонуклеотид, олігомер (Oligonucleotide) – короткий (6 – 10 нуклеотидів) сегмент одноланцюгової ДНК. Зазвичай одержують хімічним синтезом.

Онкоген (Oncogene) – ген, експресія якого веде до неконтрольованої проліферації (трансформації) клітин.

Оптимізація кодонів (Codon optimization) – модифікація кодонів певного гена без зміни амінокислотної послідовності білка, що його кодує, спрямована на те, щоб кодони ефективно прочитувалися організмом господаря.

Пакуюча клітинна лінія (Packaging cell line) – клітинна лінія, створена для продукування вірусних частинок, що не містять інфекційної нуклеїнової кислоти.

Паліндром (Palindrome) – ділянка дволанцюгової молекули ДНК, обидва ланцюги якої мають однакову нуклеотидну послідовність при зчитуванні від 5'-

до 3'- кінця. Такі ділянки часто розпізнаються ендонуклеазами рестрикції II типу.

Параспорульний кристал (Parasporal crystal) – тісно упаковані молекули токсину *Bacillus thuringiensis*, що синтезуються ним при утворенні спор.

Патогенез-залежний промотор (Pathogenesis-related promotor) – промотор рослинних генів, що активізується при інфікуванні рослини патогенами.

Первинна культура (Primary culture) – культура клітин або тканин, відібраних безпосередньо від організму.

Періодична ферментація (Batch fermentation) – культивування мікроорганізмів під час обмеженого часового інтервалу. Свіже середовище інокують посівним матеріалом і проводять культивування у безперервному режимі, не вносячи нових порцій середовища і не виводячи продуктів обміну.

Періодична ферментація з додаванням субстрату (Red-Batch fermentation) – культивування мікроорганізмів упродовж обмеженого часового інтервалу з періодичним додаванням субстрату і збором продукту тільки після завершення процесу.

Перше антитіло (Primary antibody) – антитіло, що зв'язується з молекулою-мішенню при проведенні імунологічного аналізу (наприклад, за допомогою методу ELISA).

Піроген (Pyrogen) – речовина, яка продукується бактеріями і спричиняє підвищення температури у людини.

Плазміда (Plasmid) – позахромосомний генетичний елемент, здатний до довгострокового автономного існування і реплікації. Зазвичай це дволанцюгова кільцева ДНК завдовжки 1 – 200 т.п.н.

Плазміда-помічник (Helper plasmid) – плазміда, яка виконує функції другої плазмиди в тій самій клітині. Деякі плазмиди-помічники допомагають перенесенню некон'югативних плазмід із клітини донора до реципієнта.

2 мкм-плазміда (2 μ m plasmid) – дволанцюгова кільцева плазміда завдовжки 6318 п.н., виявлена в ядрі *Saccharomyces cerevisiae*. На її основі отримано багато плазмідних векторів для дріжджових клітин.

Плазмідна несумісність (Plasmid incompatibility) – механізм регуляції кількості копій плазмід одного типу у бактерійній клітині. Забезпечує неможливість внутрішньоклітинного існування плазмід, які належать до одної групи сумісності.

Плазмовірус (plasmovirus) – генетична конструкція, яка містить ретровірусні гени, що перебувають під контролем 5'-LTR-промотора, а також "терапевтичний" ген і ген *env*, який контролює цитомегаловірусний промотор.

Повтори CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – це кластеризовані регуляторні, розділені проміжками, короткі паліндромні повтори чи ділянки ДНК, що містять множинні повтори, розділені унікальними ділянками – спейсерами. CRISPR були виявлені у кінці 80-их у геномі *E. coli* і пізніше у інших бактерій (40%) і архей. Набір спейсерів унікальний для кожного штаму. Спейсери відповідають ділянкам з геномів різних вірусів. Вважається, що CRISPR-система, що містить Cas – CRISPR асоційовані гени, є адаптивним імунітетом прокариот.

Позитивна регуляція (Positive control) – тип регуляції, при якій регуляторний ген транскрибується тільки за наявності білка-активатора.

Позитивний відбір (Positive selection) – відбір клітин за наявності у них маркерного гена, який забезпечує сприятливий ріст на селективному середовищі (наприклад, середовищі з антибіотиком).

Позитивно-негативний відбір (Positive-negative selection) – методика, при якій одночасно відбувається відбір клітин, що містять вставку у специфічному хромосомному сайті (позитивний відбір), і “відсів” клітин, що несуть вставку в іншому, неспецифічному сайті.

Позиційне картування (Positional gene cloning) – одна із стратегій ідентифікації гена захворювання за відсутності даних про продукт цього гена і будь-яких генів-кандидатів. У подібних випадках спочатку визначають хромосомну локалізацію (позицію) гена. Далі отримують геномні клони, які охоплюють картований сайт (використовуючи відповідні маркери), ідентифікують і аналізують наявності в них екзони. Використовуючи цілий низку методів (ідентифікація GC-острівців, виявлення екзонів, секвенування, комп’ютерний аналіз тощо), визначають, який саме ген відповідає за певне захворювання.

Позитивно-кандидатне картування (Positional – candidate gene cloning) – одна зі стратегій ідентифікації гена захворювання, коли дані про продукт цього гена відсутні, але ген картований у тій самій хромосомній ділянці, де вже є ідентифіковані гени та EST. Спочатку аналізують сучасні генетичні і транскрипційні карти, аби виявити кодуючі послідовності (гени, внутрішньогенні EST), які містяться у цьому районі, потім за допомогою аналізу мутацій або будь-якими іншими методами виявляють екзони, пов’язані з цим захворюванням.

Поліаденілювання (Polyadenylation) – ферментативне приєднання залишків аденіну до 3'-кінця молекули еукаріотичної мРНК. Цей багатий аденіном 3'-кінець називається poly(A)- хвостом.

Полівалентна вакцина (Polyvalent vaccine) – вакцина, яка забезпечує імунну відповідь на декілька інфекційних агентів або на різні епітопи однієї молекули.

Полілінкер (Polylinker) – коротка ділянка ДНК, яка містить декілька унікальних сайтів рестрикції для ендонуклеаз; у ці сайти інтегрують чужорідну ДНК (проводять клонування).

Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР (Polimerase chain reaction) – метод ампліфікації специфічного сегмента ДНК з допомогою термостабільної ДНК-полімерази з використанням олігонуклеотидних ДНК-зондів, комплементарних послідовностям протилежних ланцюгів ДНК, які фланкують ампліфікуючий сегмент. Процес складається із серії циклічно повторюваних реакцій: денатурації ДНК, відпалювання зондів, синтезу ДНК.

Поліморфізм коротких тандемних повторів, STRP (Short tandem repeat polimorfism) – варіабельність блоків із тандемних ди-, три-, або тетрануклеотидних повторюваних елементів за кількістю цих елементів при частоті зустрічальності блоків у великій популяції не менше 1 %. STRP-локуси виявляють за допомогою гел-електрофорезу після проведення ПЛР з

використанням праймерів, комплементарних унікальним послідовностям, які фланкують певний локус.

Поліморфний сайт (Polymorphic site) – ділянка хромосоми, представлена в популяції більш ніж одним варіантом, і яка трапляється з частотою не менше 1 %.

Полінуклеотид (Polynucleotide) – лінійний полімер, який складається із 20 і більше нуклеотидів, з'єднаних один з одним фосфодіефірними зв'язками. Полінуклеотидами є, наприклад, молекули ДНК і РНК.

Поліцистронна мРНК (Multigene RNA, polysistronic message) – молекула мРНК, яка кодує більш ніж один білок. Утворюється при транскрипції двох або більше сусідніх генів, які належать до складу одного оперона.

Посттрансляційні модифікації (Posttranslational modifications) – зміни структури білкових молекул після завершення їхнього синтезу рибосомами. До таких модифікацій належать: фосфорилювання, гліколізування, окислення цистеїну, відщеплення сигнальних послідовностей тощо.

Праймер (Primer) – короткий олігонуклеотид, який гібридизується із матрицею і є затравкою при її копіюванні.

Праймер-опосередкована прогулянка (“блукаюча затравка”) (Primer walking) – один із методів секвенування довгих сегментів ДНК (>1 т.п.н.) з використанням праймера (затравки), який комплементарний кінцю уже відомої послідовності. На основі даних, отриманих на першому етапі, синтезують новий праймер, що перекривається з кінцем вже секвенованої ділянки, з подальшим його використанням для визначення нуклеотидної послідовності наступної ділянки клонованої ДНК. Цю процедуру повторюють доти, поки не секвенують увесь сегмент.

“Прогулянка хромосомою”(Chromosome walking) – метод ідентифікації нуклеотидних послідовностей, які фланкують відомі гени, для деяких є олігонуклеотидні зонди. Фланкуючі послідовності використовуються згодом як зонди для ідентифікації послідовностей, які прилягають до них, і т.д.

Проект “Геном людини” (Human Genome Proekt) – міжнародна програма, метою якої є побудова генетичної і фізичної карт генома людини і визначення повної нуклеотидної послідовності ДНК.

Промотор (Promoter) – ділянка молекули ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза, що супроводжується ініціацією транскрипції відповідних генів. Зазвичай міститься перед 5'-кінцем регуляторного гена.

Рамка зчитування (Reading frame) – один із трьох можливих способів зчитування нуклеотидної послідовності у вигляді триплетів. Відкрита рамка зчитування не містить термінуючих кодонів і може транслюватися у білок.

Реактор із механічним перемішуванням (Stirred tank fermenter) – біореактор, у якому для рівномірного розподілу газу по всьому об'єму використовуються мішалки.

Регуляторний білок (Regulatory protein) – білок, який “вмикає” або “вимикає” транскрипцію.

Рекомбінантна ДНК (Recombinant DNA) – молекула ДНК, одержана шляхом об'єднання *in vitro* різнорідних фрагментів ДНК.

Рекомбінантний білок (Recombinant plasmid) – білок, який кодує клонована рекомбінантна ДНК.

Реплікативна форма, РФ (Replicative form) – проміжна форма дволанцюгової вірусної нуклеїнової кислоти, яка є матрицею для синтезу ДНК і РНК та представляє релаксаційне (відкрите) кільце.

Реплікація (Replication, reduplication) – процес самовідтворення (синтезу) ДНК.

Реплікація за типом “кільця, що котяться” (Rolling circle model) – процес реплікації кільцевих молекул ДНК з утворенням конкатемерної дуплексної ДНК (ДНК, які складаються із декількох тандемно повторюваних одиниць генома).

Репресія (Repression) – один з двох альтернативних (поряд з індукцією) механізмів регуляції генів. Проявляється у пригніченні транскрипції або трансляції шляхом зв'язування білка-репресора з оператором.

Репресор (Repressor) – білок, який зв'язується з оператором або промотором певного гена, в результаті чого блокується зв'язування з цими елементами РНК-полімерази.

Рестриктаза, ендонуклеаза рестрикції (Restriction endonuclease) – бактерійний фермент, який розщеплює дволанцюгову молекулу ДНК у специфічних сайтах.

Рестрикційна карта (Restriction map) – діаграма, на якій зображено сайти рестрикції молекули ДНК.

Рибозим (Ribosime) – молекула РНК, що має ферментативну активність.

РНК-полімераза (RNA polymerase, RNA synthetase) – фермент, який здійснює синтез РНК із рибонуклеозидтрифосфатів. Матрицею є ДНК або РНК, відповідні РНК-полімерази називають ДНК- або РНК-залежними.

Сайт інтеграції (клонування) (Cloning site) – специфічна ділянка векторної молекули, в яку вбудовують фрагменти чужорідної ДНК. Переважно це унікальний сайт рестрикції.

Сайт рестрикції (Restriction site) – нуклеотидна послідовність у молекулі ДНК, яка розпізнається відповідною рестриктазою. Здебільшого це короткий паліндром.

Сайт-специфічний мутагенез (Site-specific mutagenesis) – внесення *in vitro* мутації в конкретний сайт клонованої послідовності. Дає змогу ідентифікувати функціональні ділянки в молекулах білків і одержувати білки із заздалегідь заданими властивостями. Іноді називають олігонуклеотид-спрямованим мутагенезом.

Самореплікативний елемент (Self-replicating element) – позахромосомна молекула нуклеїнової кислоти, здатна до незалежної від хромосомної ДНК (автономної) реплікації. Прикладом такого елемента є плазміда.

Саузерн-блоттинг (Southern blotting) – виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей шляхом перенесення денатурованих молекул ДНК, які піддають електрофорезу, з агарозного гелю на нітроцелюлозний або нейлоновий фільтр за рахунок капілярного ефекту і гібридизації з міченим зондом, комплементарний шуканій послідовності.

Секвенуючий гель (Sequencing gel) – довга пластина поліакриламідного гелю, яка дає змогу проводити електрофоричне розділення оліго- і полінуклеотидів, які відрізняються довжиною всього на один нуклеотид.

CEPH (Centre d'Etude de Polymorphisme Humain) – центр із вивчення поліморфізму людини, який розташований у Парижі. Там зберігається база даних із генетичної і молекулярно-генетичної мінливості популяцій людини з більшості регіонів земної кулі.

Серотип (Serotype) – антигенна характеристика клітини (бактерії, клітини крові тощо), встановлена на основі її взаємодії з антитілами.

Скринінг (Screening) – метод (або комплекс методів) ідентифікації одиничного об'єкта (особини в популяції, клітини із бажаними властивостями, ділянки нуклеотидної послідовності тощо) шляхом перевірки великої кількості об'єктів.

Ступеневий розрив (Staggered cut) – розщеплення дволанцюгової ДНК, при якому розриви в комплементарних ланцюгах розміщуються не чітко один навпроти одного, а дещо зміщені.

Субклонування (Subcloning) – перенесення частини уже клонованої молекули ДНК в інший вектор клонування.

Субодинична вакцина (Subunit vaccine) – вакцина, яка містить лише окремі компоненти патогенного мікроорганізму.

“Стрибки по хромосоми” (Chromosome jumping) – один із варіантів методу “прогулянки хромосомою”, який характеризується тим, що в результаті мутації маркерний ген, який використовується для скринінгу, переміщується (стрибає), що дає змогу виявити нові зчеплені з ним гени.

CG-острівці, HTF-острівці (CpG islands, HpaII tiny fragments) – CG-багаті послідовності розміром до декількох сотень пар; фланкують із 5'-кінця багато транскрипційно активних генів хребетних і містять сайти рестрикції для Hpa II.

Cos-сайти (Cos-sites) – нуклеотидні послідовності на кінцях генома фага λ , необхідні для упаковки ДНК у фагові частинки.

Тандемний повтор (Tandem array) – нуклеотидна послідовність, яка складається із декількох однакових елементів, з'єднаних “голова-до-хвоста”.

ТАТА-бокс (TATA-box) – ділянка, розміщена у промоторній частині генів еукаріот за 25 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції, з якою пов'язана РНК-полімераза. Інша назва – бокс Хогнеса. Аналогом у прокаріот є бокс Прибнова.

Т-ДНК (T-DNA) – фрагмент Ti-плазмиди, який вбудовується в ядерну ДНК клітини господаря і стабільно її успадковує. Викликає утворення пухлин у рослин (корончастого галла).

Температура плавлення Tm (Melting temperature) – температура, при якій відбувається розрив половини водневих зв'язків у полінуклеотидному дуплексі.

Термінальна трансфераза (Terminal transferase, deoxynucleotidyl transferase) – фермент, який каталізує приєднання 3'-кінця молекули ДНК дезоксирибонуклеозидмонофосфатів. Використовується для клонування кДНК за допомогою комплементарних гомополімерних “хвостів” (*poly(A) – poly(T)*).

Ti-плазміда (Ti-plasmid) – плазміда ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, Т-ділянка якої здатна включатися в ядерну ДНК, що призводить до виникнення пухлин.

Типування ДНК (DNA typing) – це молекулярно-генетичне дослідження конкретних варіантів поліморфних локусів геному людини (мікро- і мінісателітної ДНК). У кожної людини сукупність таких поліморфних геномних локусів має свої характерні особливості, що дає змогу використовувати цей метод для ідентифікації особистості і встановлення спорідненості.

Трансгенний організм (Transgenic organism) – організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал, уведений методами генної інженерії.

Трансгенез (Transgenesis) – введення чужорідного гена в рослинну або тваринну клітину та його передача низці поколінь.

Транскрипційне картування (Transcription mapping) – “прив’язка” індивідуальних транскриптів (клонів кДНК експресибельних послідовностей-мішеней) до хромосомних районів за допомогою методу флуоресцентної гібридизації *in situ*, ПЛР тощо.

Трансфекція (Transfection) – штучне введення в еукаріотичні клітини ізольованих молекул ДНК.

Трансформація (Transformation) – 1. Перенесення генетичної інформації у бактерійні клітини за участю плазмід або без них, але завжди без участі вірусів; часто призводить до змін фенотипу клітини-реципієнта. 2. Перетворення нормальних тваринних клітин у пухлини.

Тупий кінець (Blunt end) – кінець дволанцюгової молекули ДНК, у якого не виступає жоден із ланцюгів.

Ту-елемент (Ty-element) – мобільний генетичний елемент дріжджів (від англ. Transposon of yeast).

Ферментний імуносорбентний аналіз, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) – метод виявлення специфічних молекул у зразку. Зразок фіксують на твердій підставці і додають антитіло, специфічне до маркерної молекули. До другого антитіла приєднують фермент, який перетворює безбарвний субстрат у кольоровий продукт із подальшим його кількісним аналізом.

Фізична карта (Physical map) – схема розміщення генів на хромосомі, встановлена за допомогою різноманітних методів (електронна мікроскопія, секвенування, рестрикційне картування). Відстань на такій карті вимірюється кількістю пар нуклеотидів.

Флуоресцеїн (Fluorescein) – флуоресцентний барвник, який часто використовується як мітка для антитіл. Дає змогу візуалізувати антитіла після їх зв’язування з антигеном.

Флуорофор (Fluorophore) – хімічна група, яка відповідає за флуоресценцію певної сполуки.

Фрагмент Кленова (Klenov fragment) – найбільший із двох фрагментів ДНК-полімерази I *E.coli*, утворюється при її протеолітичному розщепленні. Зберігає 5’→3’ полімеразну активність і 3’→5’ екзонуклеазну. Використовується частково при секвенуванні ДНК.

Функціональне картування (Functional cloning) – ідентифікація гена, виходячи з відомої амінокислотної послідовності його продукту.

Футпринтинг (Footprinting) – метод ідентифікації ділянок ДНК, що специфічно зв’язуються з білками. Його основою є захист ДНК у місцях контакту з білком від ендонуклеазного розщеплення.

Химера (Chimera) – організм, у якому є клітини, тканини й органи різних організмів.

Хромосомний сайт інтеграції (Chromosomal integration site) – місце у хромосомі, куди може вбудуватися чужорідна ДНК, часто без жодних наслідків для організму-господаря.

“Цинкові пальці” (Zinc fingers) – ДНК-зв’язуючі домени, які включають по два цистеїнових залишки та один гістидиновий. Ці амінокислоти взаємодіють із йоном цинку, а ділянка поліпептидного ланцюга між ними утворює петлю у формі “пальця”.

Частота трансформації (Transformation frequency) – показник частки клітин у клітинній популяції, які одержали чужорідну ДНК; виражається числом трансформантів до загальної кількості клітин.

Човниковий вектор (Shuttle vector) – плазмідна ДНК, здатна реплікуватися у клітинах двох різних типів (наприклад, у *E. coli* і клітинах дріжджів).

Ядерне клонування (Nuclear cloning) – отримання живого організму з без’ядерної (енуклейованої) яйцеклітини з імплантованим диплоїдним соматичним ядром.

Додатки

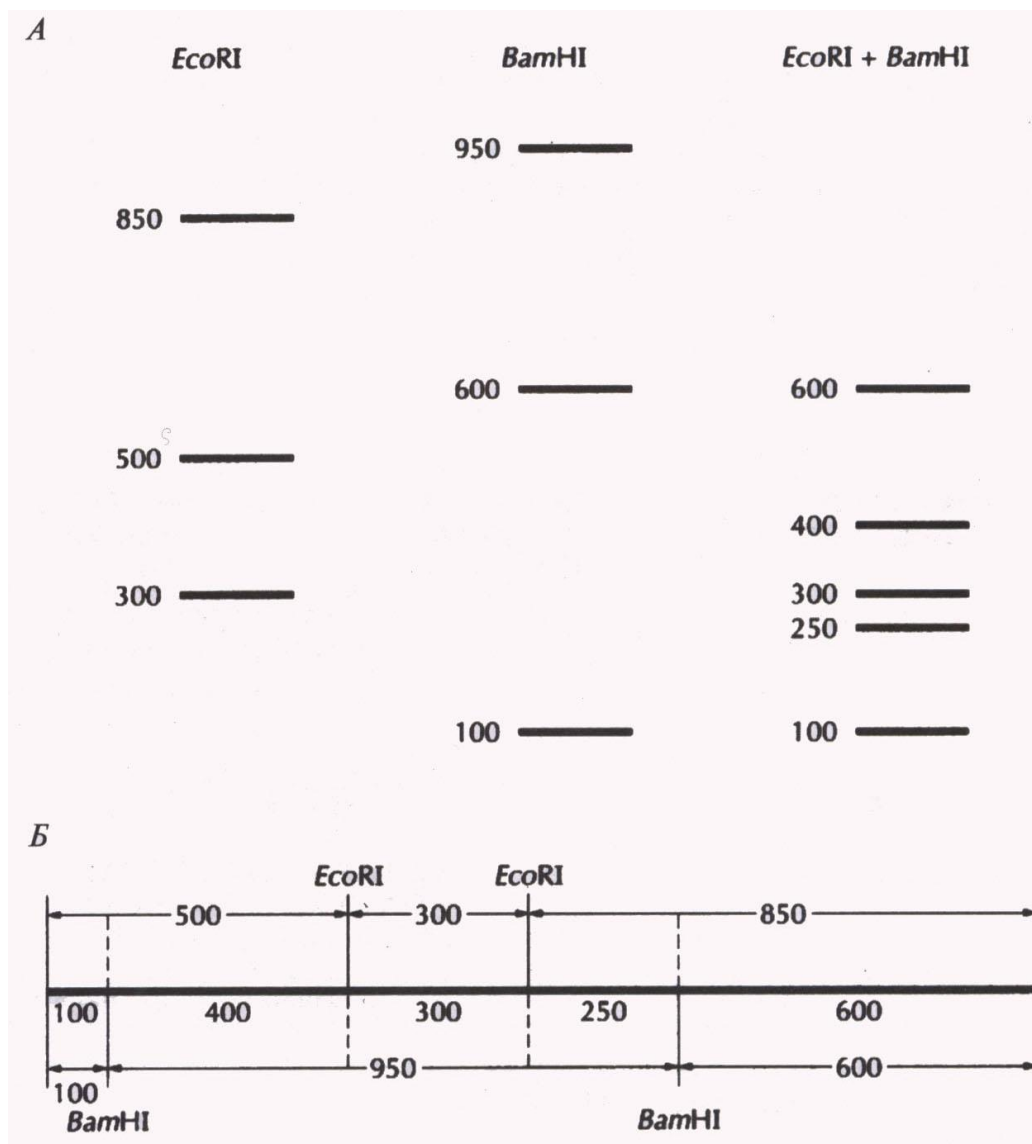
Додаток А

Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими ферментами рестрикції*

Фермент	Сайт розпізнавання	Характер утворюваних кінців
<i>AluI</i>	5'-AG↓CT-3' 3'-TC↑GA-5'	Тупі кінці
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATCC-3' 3'-C C-TAG↑G-5'	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>EcoRI</i>	5'-G↓AATT C-3' 3'-CTTAA↑G-5'	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>HaeIII</i>	5'-GG↓CC-3' 3'-CC↑GG-5'	Тупі кінці
<i>HpaI</i>	5'-GTT↓AAC-3' 3'-CAA↑TTC-5'	Тупі кінці
<i>MstII</i>	5'-C↓CTNAGG-3' 3'-GGANTC↑C-5'	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>NotI</i>	5'-G↓CGGCCGC-3' 3'-C GCCGGC↑G-	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>PacI</i>	5'-T↓TAATTA-3' 3'-AATTAAT↑T-5'	Виступаючі кінці із 3'-фосфатною групою
<i>PstI</i>	5'-C- TGCA↓G-3' 3'-G↑ACGT- C-5'	Виступаючі кінці із 3'-гідроксильною групою
<i>PvuII</i>	5'-CAG↓CTG-3' 3'-GTC↑GAG-5'	Тупі кінці
<i>Sau3AI</i>	5'↓GATC-3' 3' -CTAG↑-5'	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Картування сайтів рестрикції

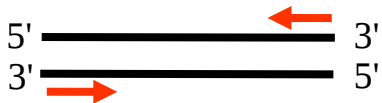
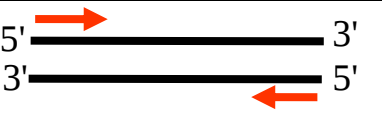
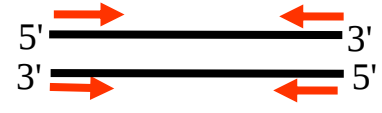
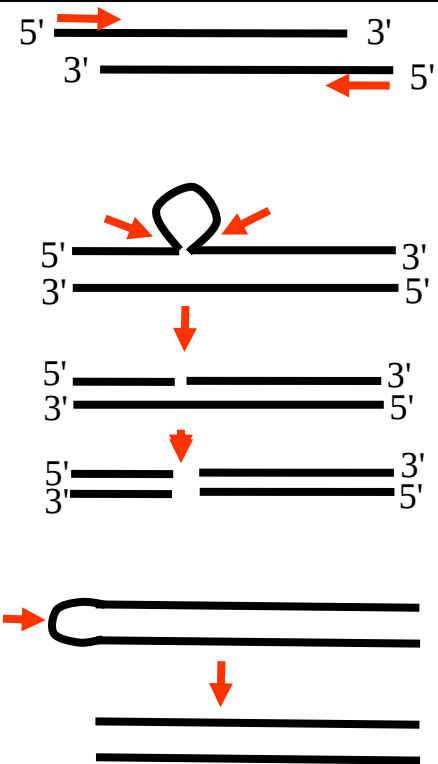


А. Результати гель-електрофорезу фрагментів ДНК*, отриманих розщепленням вказаними ферментами. Очищену ДНК гідролізували рестриктазами *Eco*RI і *Bam*HI роздільно, а потім їхньою сумішшю, проводили гель-електрофорез і візуалізували продукти фарбуванням етидій бромистим. Числа зліва від горизонтальних смужок – довжина фрагментів у парах основ.

Б. Рестрикційна карта*, отримана на основі електрофоретичних даних. Числа – відстань між сайтами впізнавання відповідних ферментів.

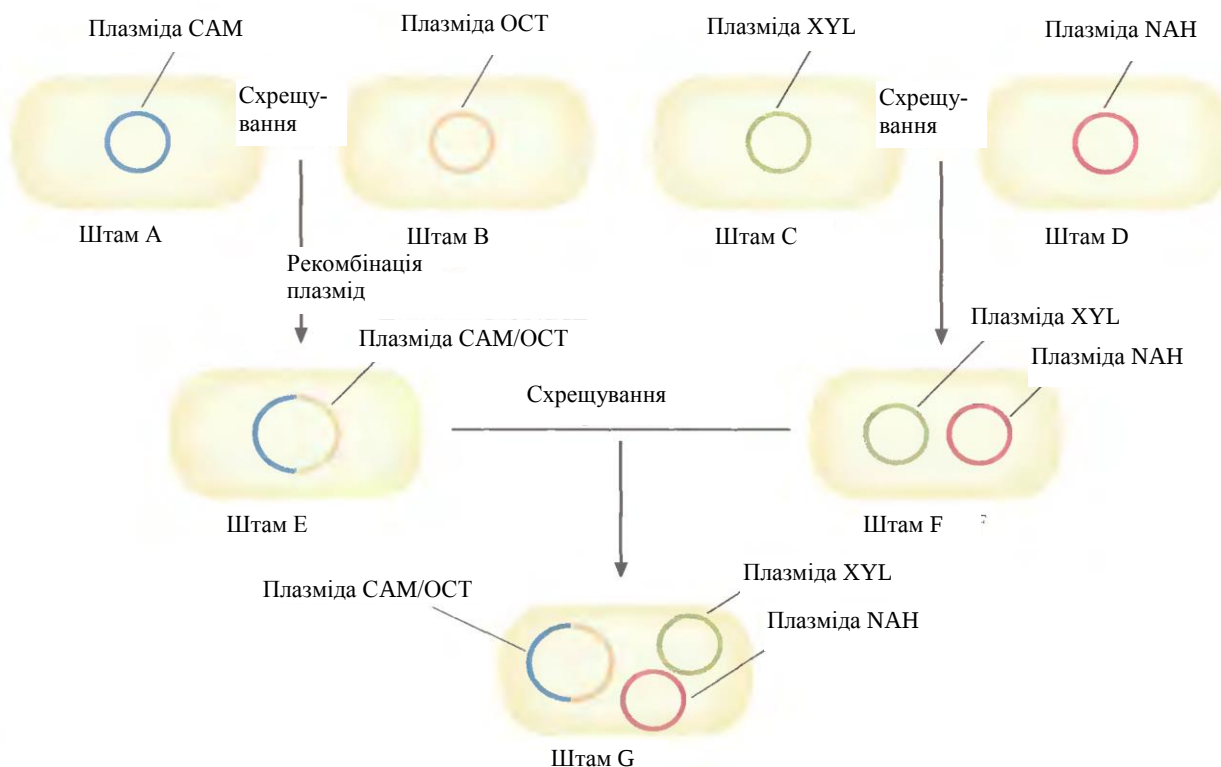
*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Нуклеази, які використовуються у генетичній інженерії*

Фермент	Принцип дії ферменту	Дія ферменту
Екзонуклеаза III <i>E. coli</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК з 3'-кінців
Екзонуклеаза VII <i>E. coli</i>		Розщеплює одноланцюгову ДНК із 5'-та 3'-кінців
λ-екзонуклеаза <i>E. coli</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК із 5'-кінців
Нуклеаза Bal <i>Alteromonas espejana</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК 5'- та 3'-кінців
Нуклеаза S1 з <i>Aspergillus oryzae</i>		Гідролізує одониткову ДНК та РНК Гідролізує одониткові петлі у складі ДНК та РНК Руйнування ділянок напроти прогалин Гідролізує “шпилькові” структури у складі ДНК та РНК

* [Федоренко В.О. Курс лекцій (електронний) з біотехнології, 2010].

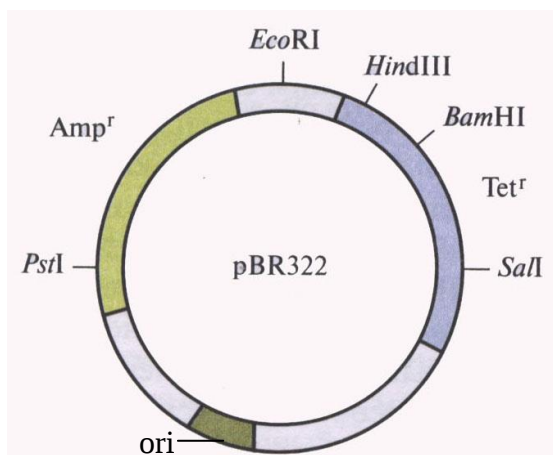
Конструювання рекомбінантного штаму *Pseudomonas putida*



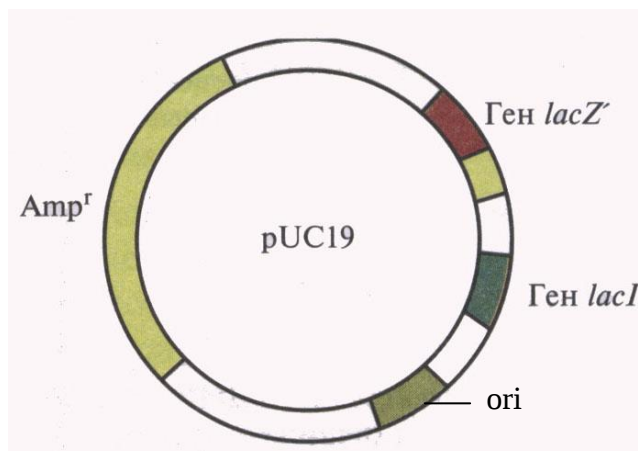
Конструювання рекомбінантного штаму *Pseudomonas putida**, здатного руйнувати камфору, октан, ксилол і нафталін. Штам А, який містить плазмиду САМ (детермінує руйнування камфори) схрещують зі штамом В, який містить плазмиду ОСТ (детермінує руйнування октану). У результаті утворюється штам Е з гібридною плазмідною, що утворилася в результаті гомологічної рекомбінації між вихідними плазмідами і володіє функцією кожної з них. Штам С, який містить плазмиду ХУЛ (руйнування ксилолу), схрещують зі штамом Д, який містить плазмиду НАН (детермінує руйнування нафталіну), й отримують штам Ф, який містить обидві плазміди. Після цього схрещують штам Е і Ф, у результаті чого утворюється штам Г, у якому є плазміди САМ/ОСТ, ХУЛ і НАН.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

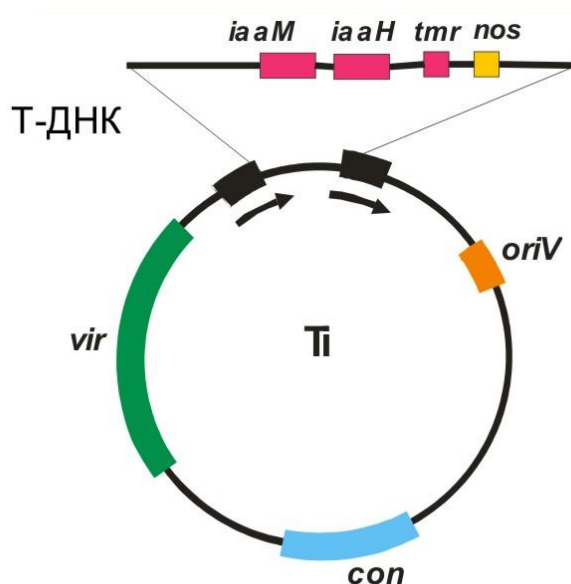
Генетичні карти плазмідних векторів



Генетична карта плазмідного вектора pBR322*: Amp^r і Tet^r – гени ампіцилін і тетрациклін-резистентності, відповідно; $PstI$, $EcoRI$, $HindIII$, $BamHI$, $SalI$ – сайти рестрикції відповідних рестриктаз; ori – точка початку реплікації.



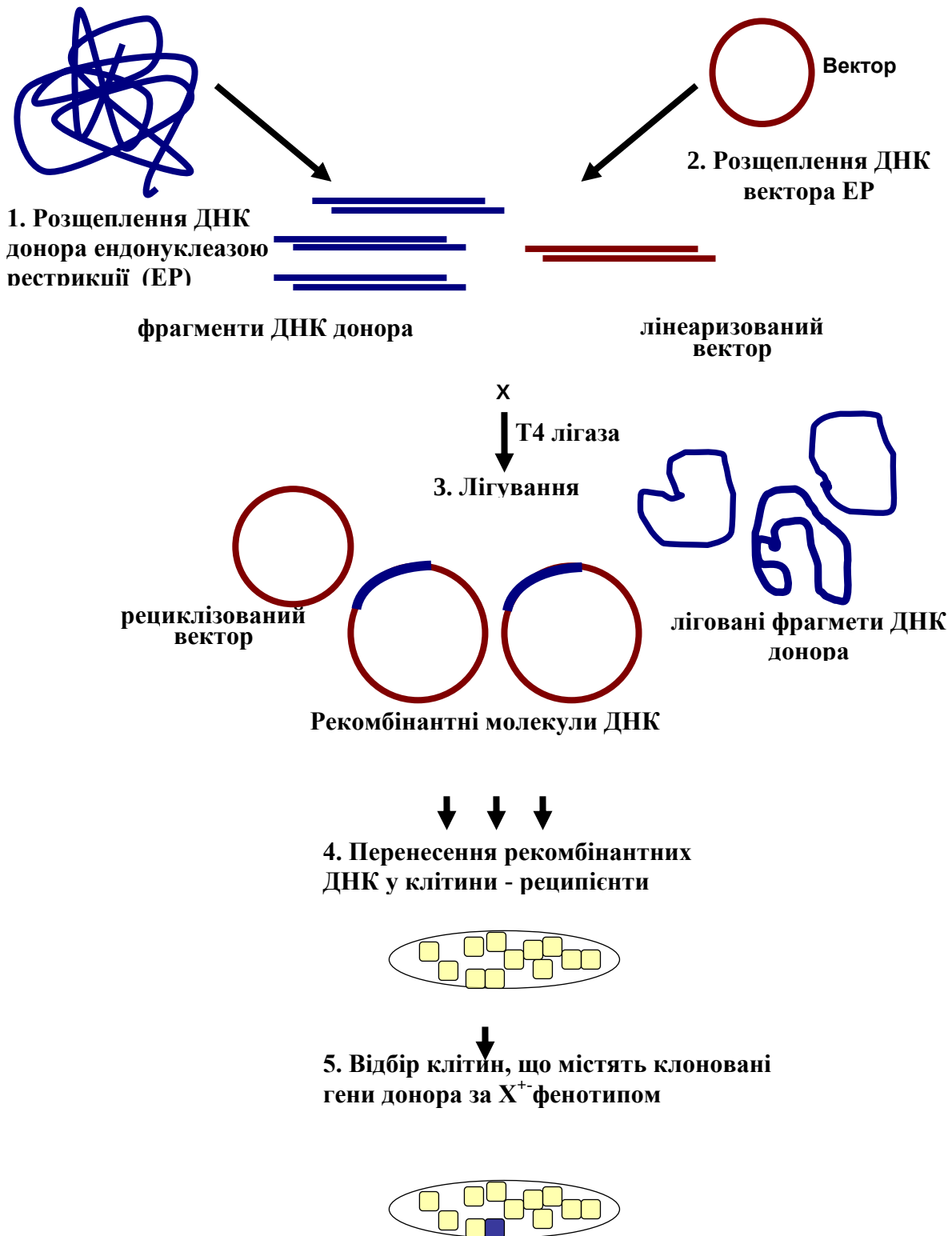
Генетична карта плазмідного вектора pUC19*: Amp^r – ген ампіцилін-резистентності; ген $lacZ'$ – регульований сегмент гена β -галактозидази ($lacZ'$) лактозного оперону *E.coli*; ген $lacI$ – ген, який кодує репресор, що контролює експресію $lacZ'$.



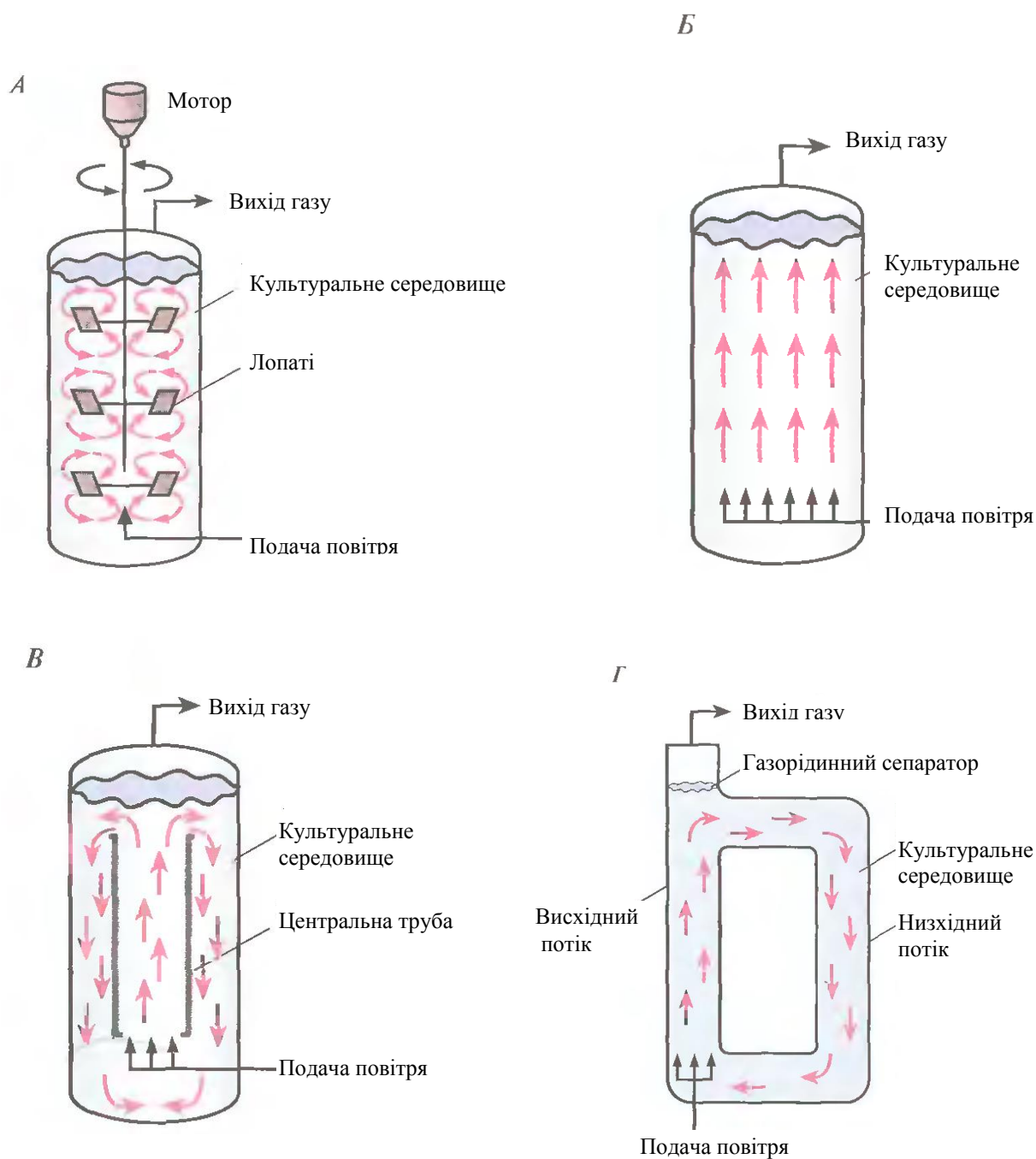
Генетична карта Тi-плазмиди *Agrobacterium tumefaciens**: $iaaM$ – ген триптофан-монооксигенази; $iaaH$ – ген індол-3-ацетамідгідролази; tmr – ген ізопентеніл-трансферази; nos – ген нопалінсинтази; $oriV$ – оріджин реплікації плазмиди

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Основні етапи генно-інженерного експерименту



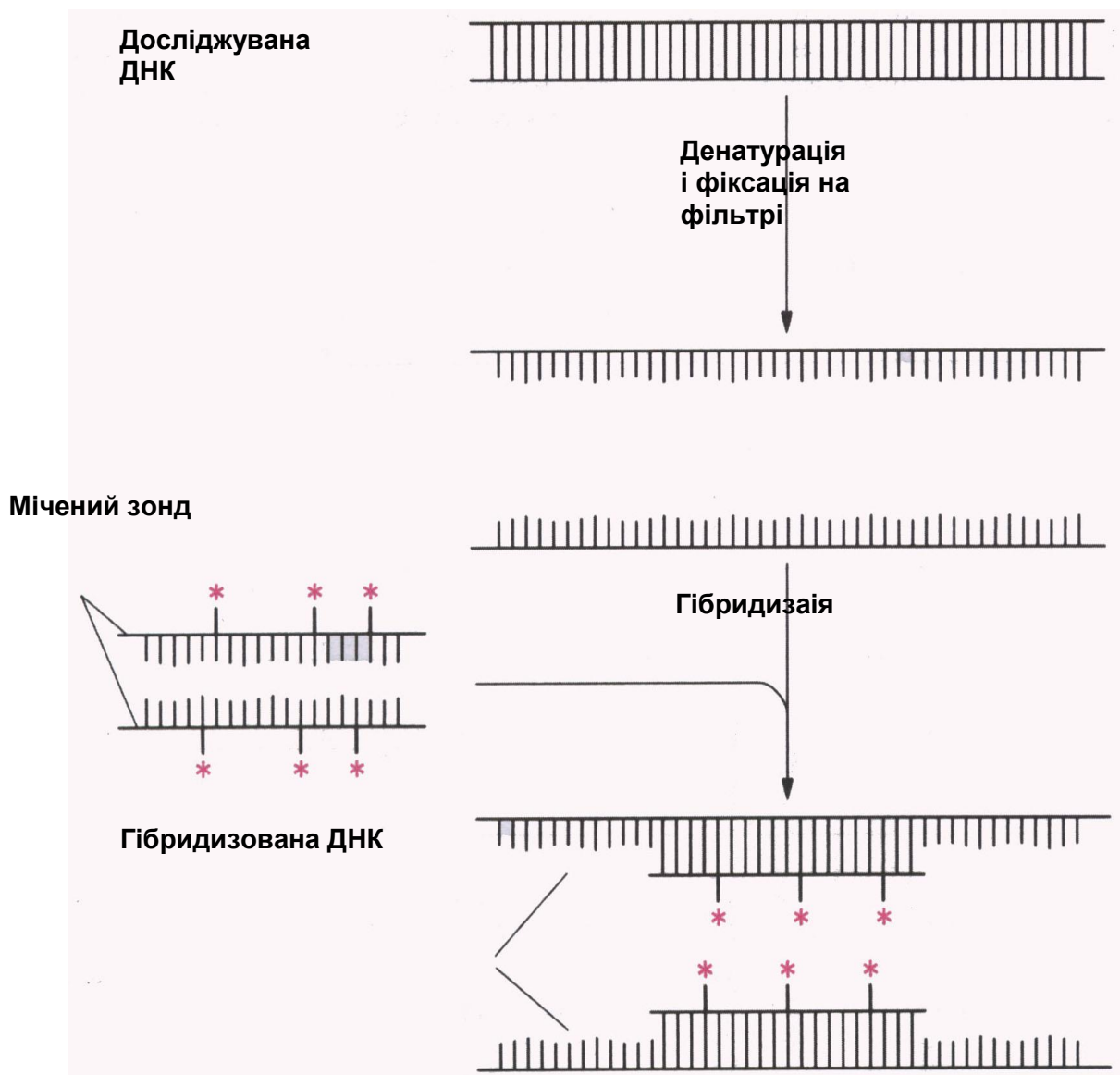
Схематичне зображення різних типів біореакторів



Різні типи біореакторів: А – реактор із механічним перемішуванням; Б – барботажна колона; В – ерліфтний реактор із внутрішньою рециркуляцією; Г – ерліфтний реактор із зовнішньою системою рециркуляції. Стрілки – напрямок потоку культурального середовища.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

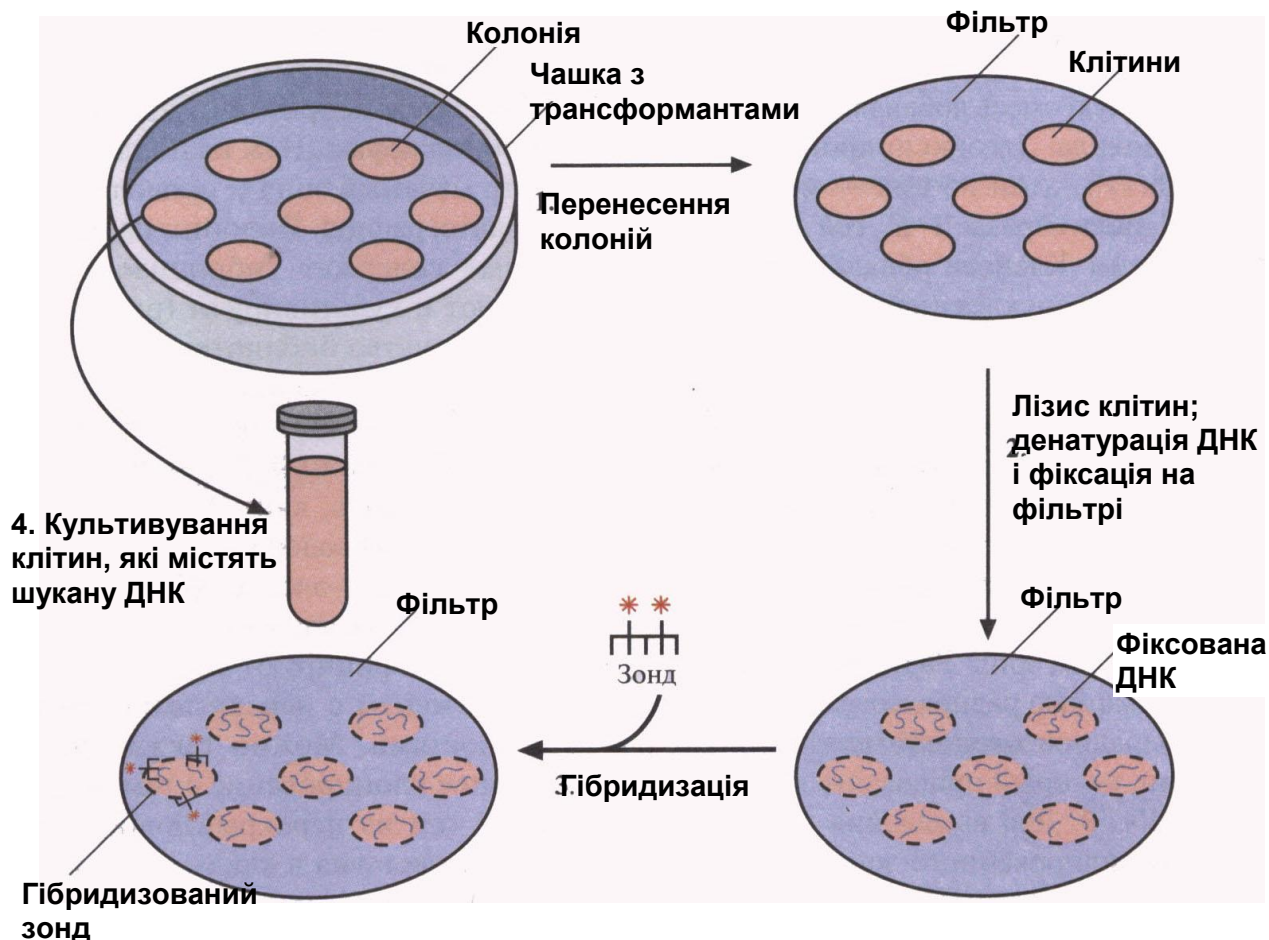
Схематичне зображення ДНК-гібридизації



Перебіг стадій ДНК-гібридизації*. Досліджувану ДНК піддають денатурації і фіксують на твердій підкладці, наприклад, нітроцелюлозному чи найлоному фільтрі. Мічений ДНК-зонд (здебільшого завдовжки від 100 до 1000 п.н.) також денатурують, наносять на фільтр із досліджуваною ДНК і проводять відбиток. Для усунення негібридизованого ДНК-зонда фільтр промивають і візуалізують мітку. Якщо гібридизація між зондом і досліджуваною ДНК не відбулася, то ніякої мітки не виявляється (мітка на рисунку позначена кольоровою зірочкою)

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

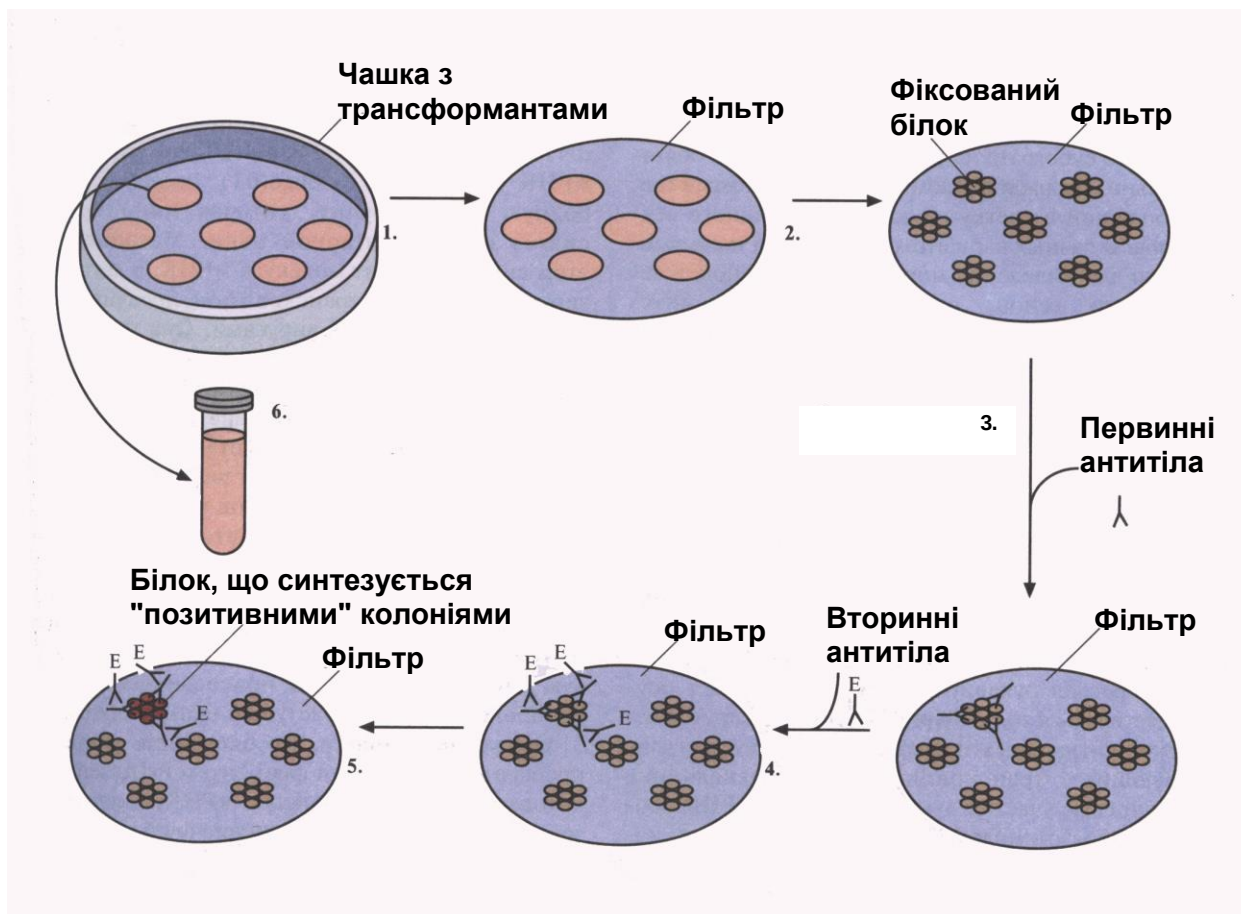
Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК методом ДНК-ДНК гібридизації



Скринінг бібліотеки геномної ДНК за використання міченого зонда*. Клітини після трансформації висівають на тверде поживне середовище, яке забезпечує ріст тільки трансформованих клітин. 1. Переносять клітини із кожної колонії на тверду підкладку (наприклад, нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) так, щоб їхнє розміщення відповідало на вихідній чашці. 2. Клітини лізують, вивільнену ДНК піддають денатурації, депротейнізації та фіксують на фільтрі. 3. На фільтр наносять мічений ДНК-зонд і проводять гібридизацію. Змивають із фільтра негібридизований зонд і проводять радіоавтографію, щоб визначити, які клітини містять мічений ДНК-зонд. 4. Ідентифікують на чашці колонії, що містять досліджувану ДНК (позитивний гібридизаційний сигнал), відбирають із них матеріал і культивують.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

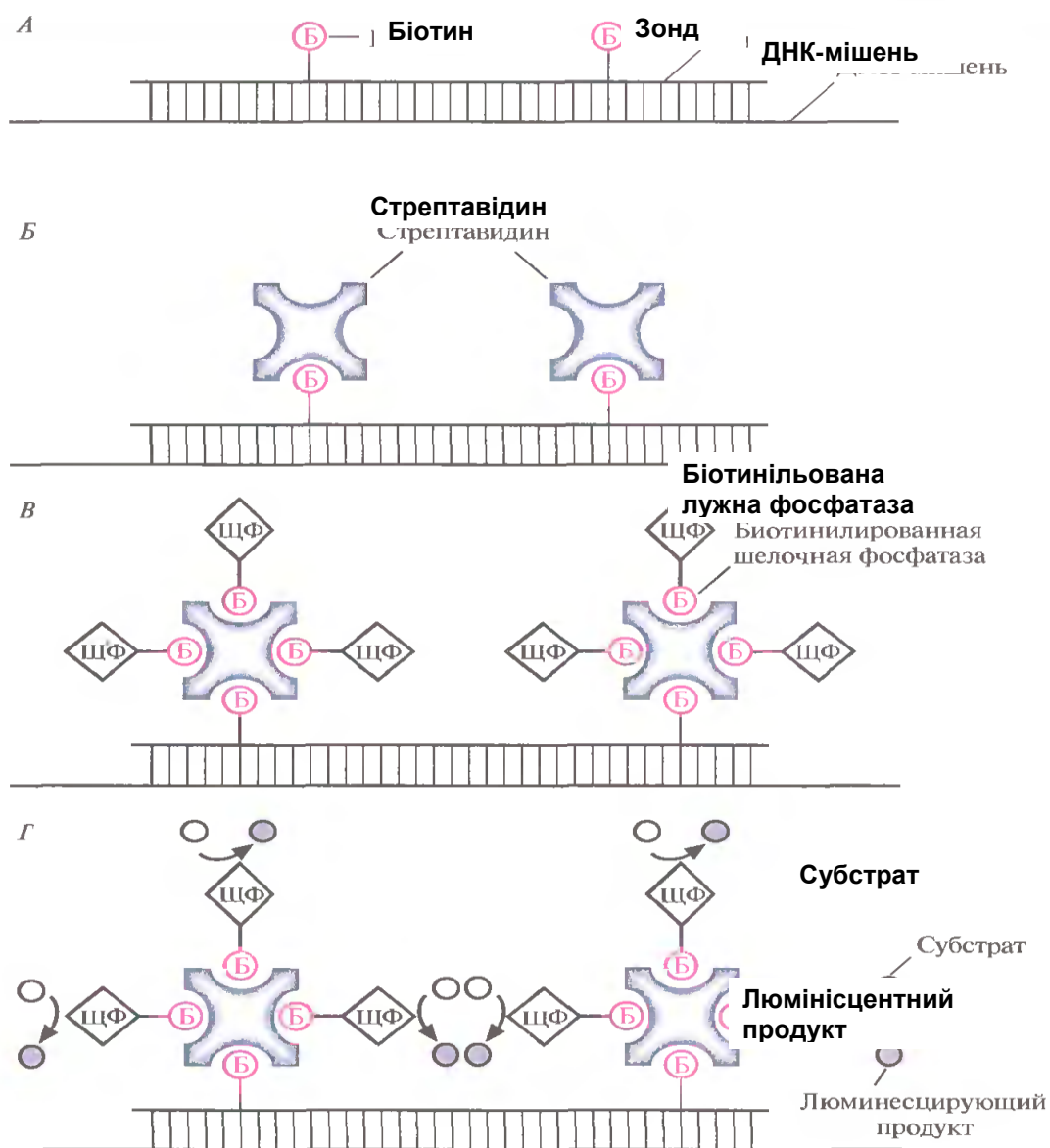
Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК імунологічним методом



Імунологічний скринінг геномної бібліотеки (імунологічне тестування колоній)*. Клітини після трансформації висівають на тверде поживне середовище, яке забезпечує ріст тільки трансформованих клітин. 1. Переносять клітини із кожної колонії на тверду підкладку (наприклад, нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) так, щоб їхнє розміщення відповідало на вихідній чашці. 2. Клітини лізують, білки фіксують на фільтрі. 3. На фільтр наносять первинні антитіла, які зв'язуються тільки з шуканим білком. 4. Незв'язані первинні антитіла усувають, наносять на фільтр вторинні антитіла, специфічні стосовно первинних антитіл і зв'язані з ферментом (наприклад, лужною фосфатазою). 5. Змивають із фільтра усі незв'язані вторинні антитіла і наносять на нього безколірний субстрат, при гідролізі якого утворюється забарвлений продукт. Гідроліз може відбутися тільки за наявності вторинних антитіл. 6. Відбирають колонії на чашці, які відповідають забарвленим плямам на фільтрі, і культивують їх. У них може міститися рекомбінантна ДНК, що кодує білок, гомологічний первинним антитілам

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

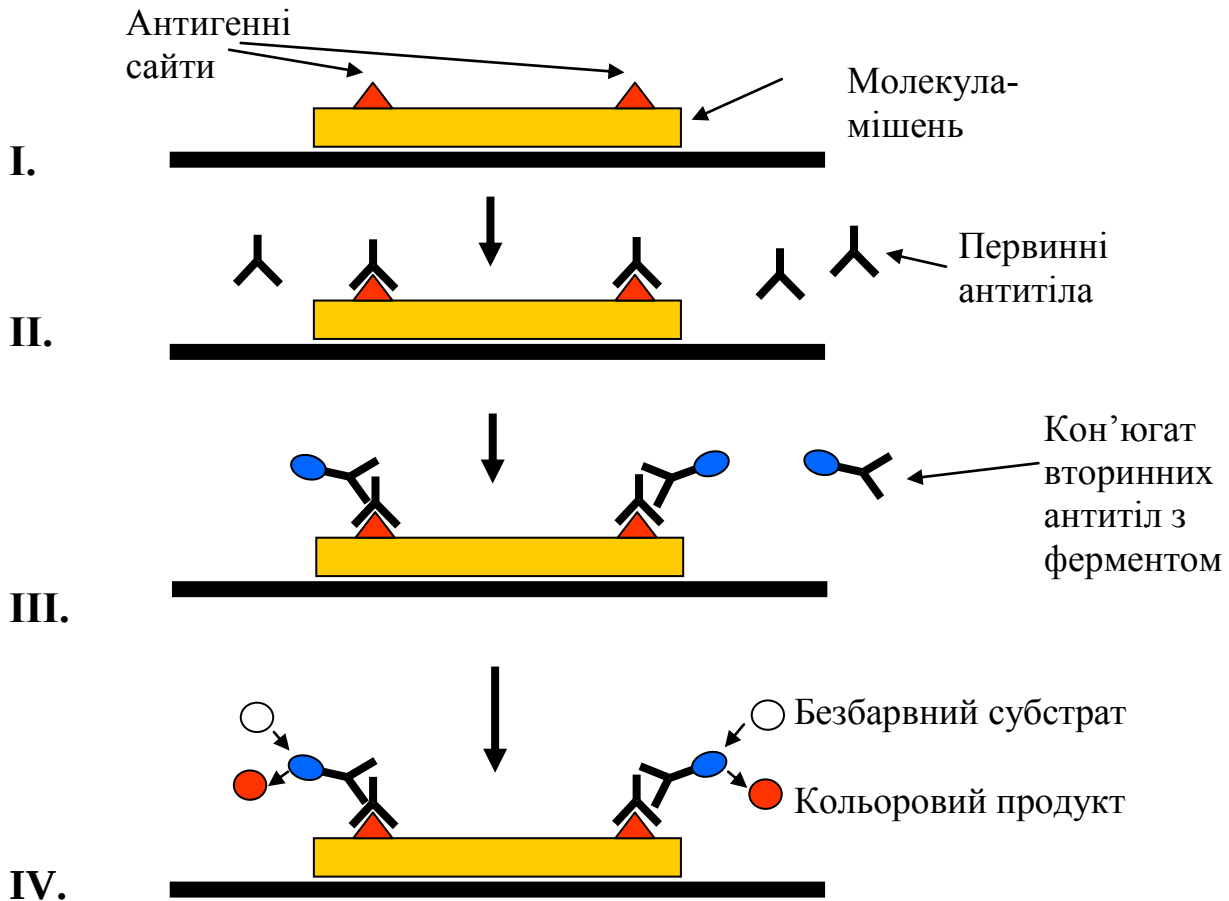
Хемілюмінісцентний метод виявлення ДНК-мішені



Хемілюмінісцентний метод виявлення ДНК-мішені*: Б – біотин, ЩФ – лужна фосфатаза; А – зв'язування біотинільованого зонда із ДНК-мішенню; Б – зв'язування стрептавідину з біотином; В – зв'язування біотинільованої лужної фосфатази зі стрептавідином; Г – утворення люмінесцентного продукту під впливом лужної фосфатази.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Процедура імуноферментного аналізу ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)



Схематичне зображення етапів процедури ELISA*:

I. Зв'язування зразка, який тестується на наявність специфічної молекули (молекули-мішені), на твердій поверхні (пластмасовій пластинці).

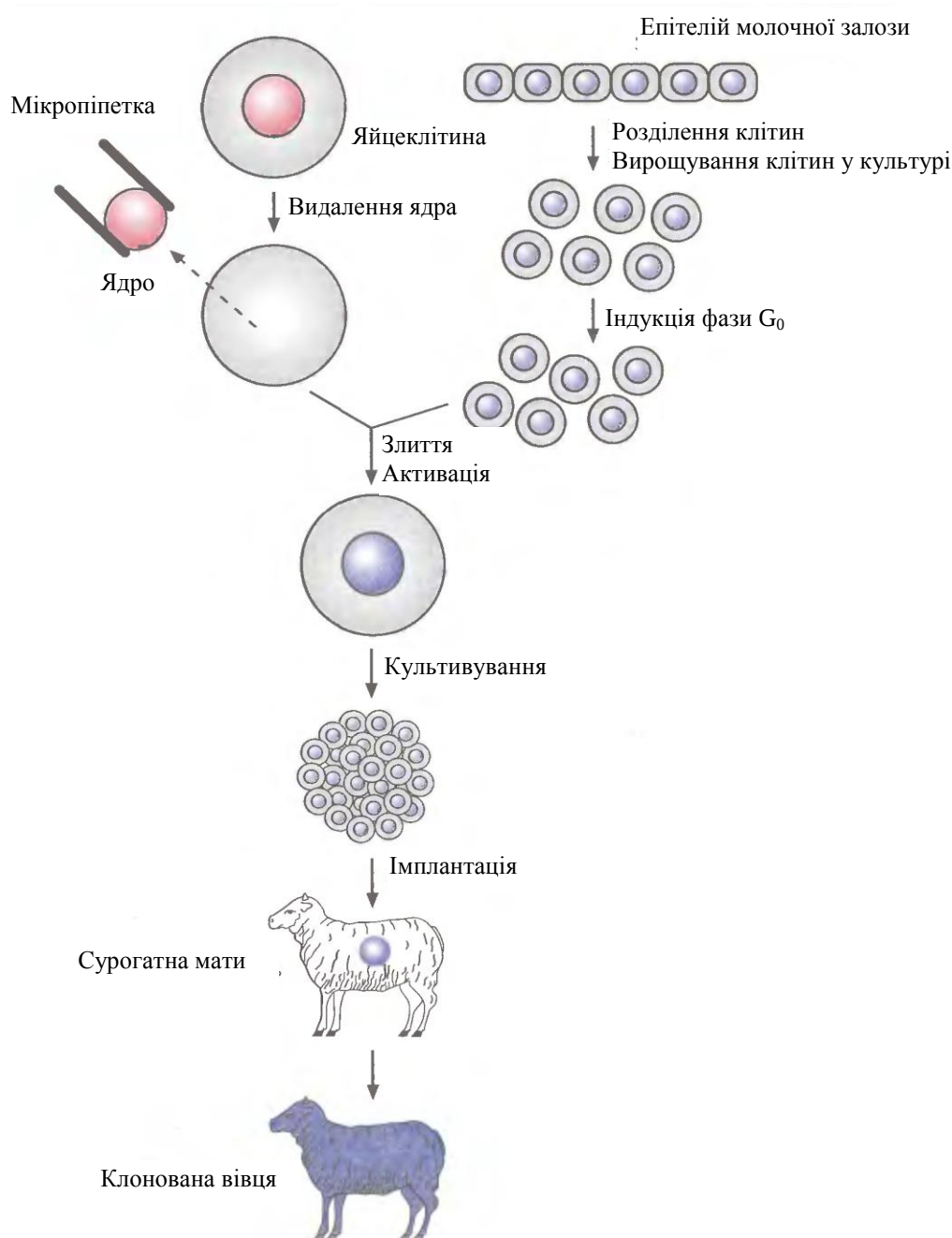
II. Додавання антитіл, специфічних до антигенів молекули-мішені (первинних антитіл). Промивання зразка для видалення антитіл, які з ним не зв'язалися.

III. Додавання вторинних антитіл, які специфічно зв'язуються з первинними антитілами, але не з антигенами молекули-мішені. Вторинні антитіла зв'язані з ферментами, що перетворюють безбарвний субстрат у кольоровий продукт. Промивання зразка для видалення вторинних антитіл, які з ним не зв'язалися.

IV. Додавання субстрату. Поява кольорового продукту вказує на наявність молекули-мішені.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Схема клонування методом переносу ядра

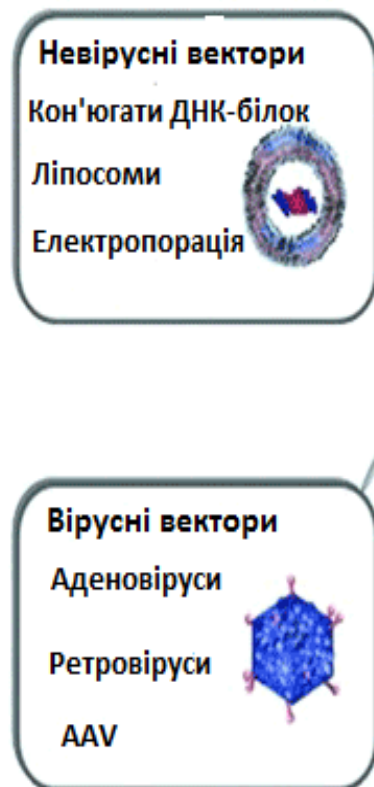


Клонування вівці методом переносу ядра*. Ядро яйцеклітини усувають за допомогою мікропіпетки. Культивують епітеліальні клітини молочної залози дорослої особини й індукують їхній перехід у фазу G₀. Здійснюють злиття клітин у G₀-фазі і яйцеклітин, позбавлених ядра, вирощують відновлені яйцеклітини у культурі чи яйцеводі з накладеною лігатурою до ранніх стадій ембріогенезу, а потім імплантують їх у матку “сурогатної” матері, де відбувається подальший розвиток.

*[Глик Б., Пастернак Дж., 2002].

Методи генної терапії

Генна терапія *in vivo*



Генна терапія *ex vivo*



Принципова схема біосенсора*

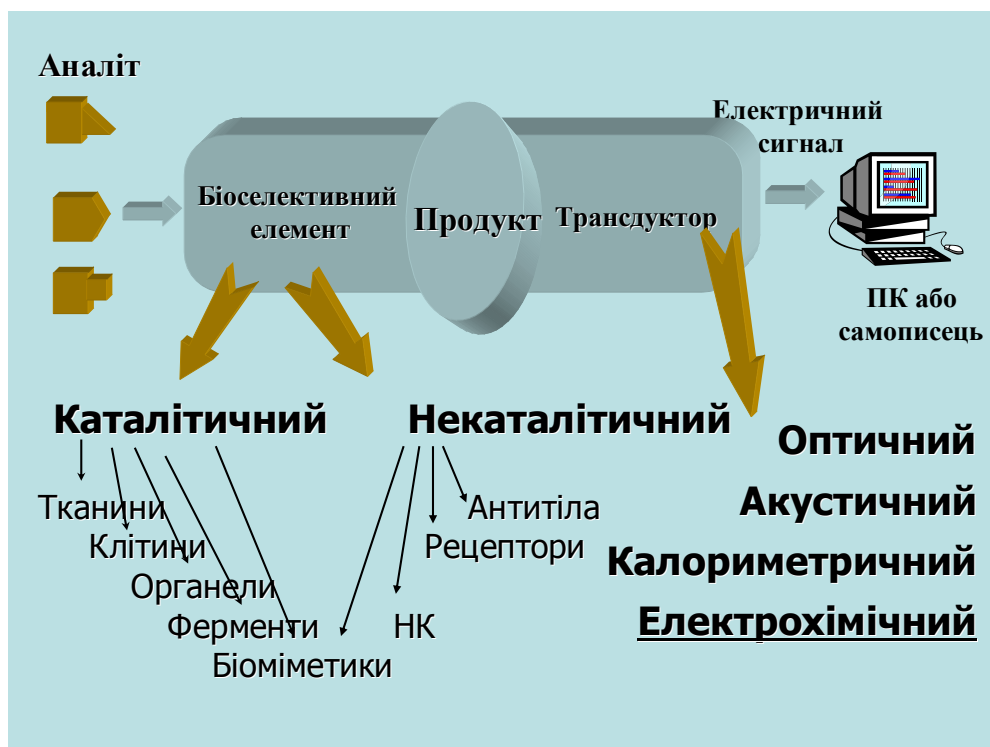
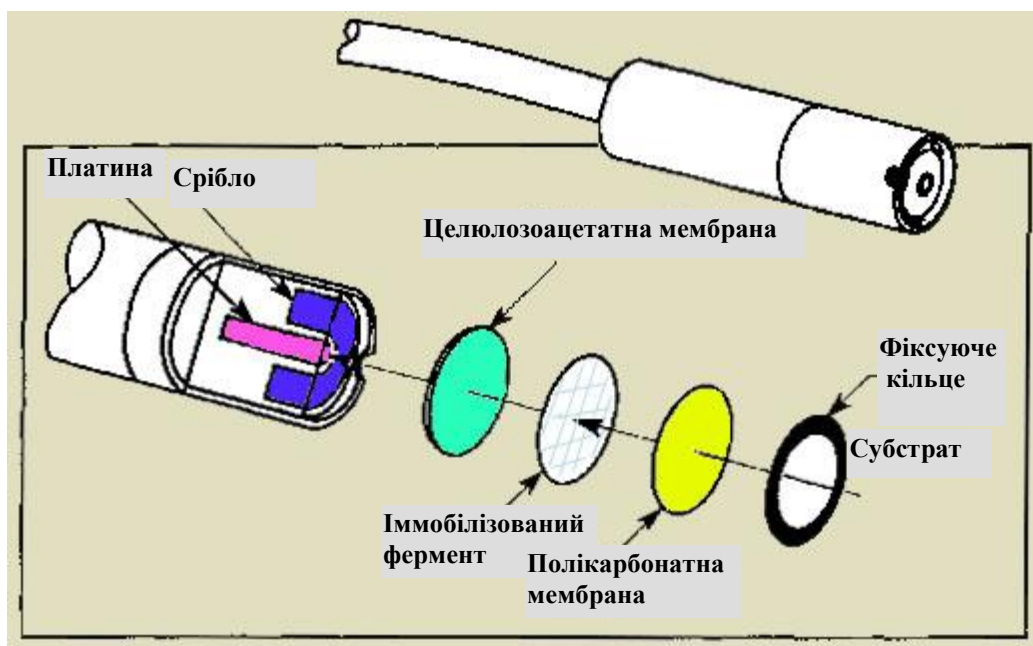
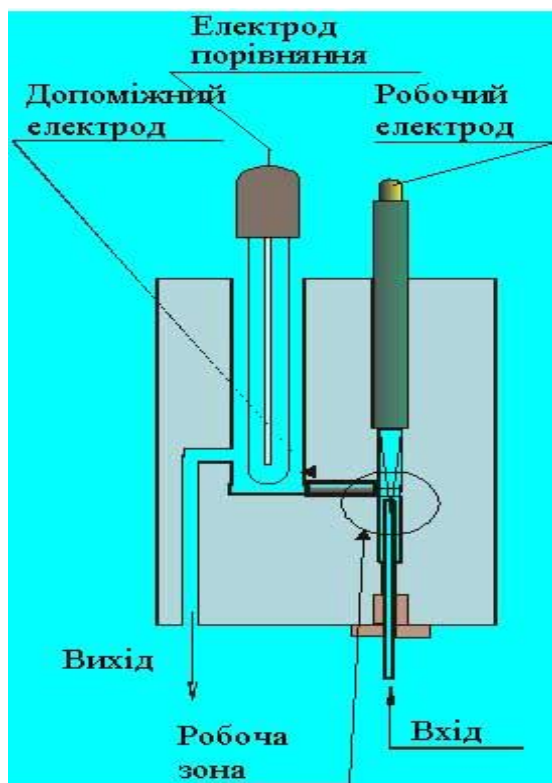


Схема амперометричних біосенсорів на основі O_2 - і H_2O_2 -селективних електродів*

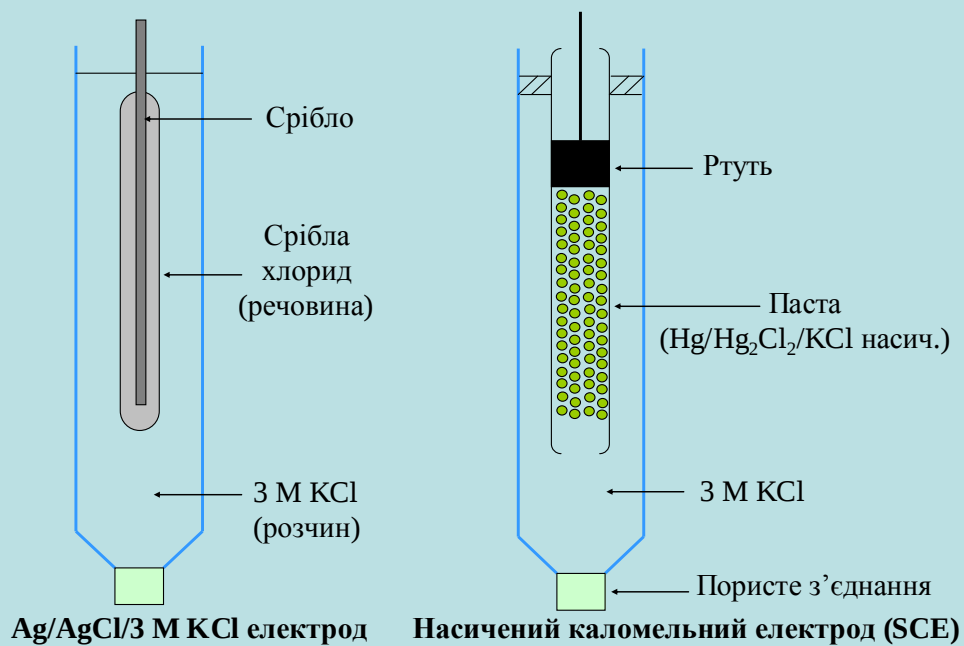


*[Дзядевич С.В., Солдатків О.П., 2006].

Схема трьохелектродного біосенсора*



Типи електродів порівняння



*[Дзядевич С.В., Солдатків О.П., 2006].

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Федорко, Харьков, 2008. – 364 с.
2. Біотехнологія : підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименка, М.І. Цвіліховський та ін. / під заг. ред. В.Г. Герасименка – К. : Інкос, 2006. – 647 с.
3. Бутенко Р.Г. Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин, Т.Г. Корженевская, Е.Н. Маркарова. – Т. 3. – М. : Высш. шк., 1987. – 343 с.
4. Буркат В.П. Сучасна біотехнологія у тваринництві / В.П. Буркат, С.І. Ковтун // Біотехнологія. – Т. 1, № 3. – 2008. – С. 7 – 13.
5. Глазко В.И. Генетически модифицированные организмы: от бактерий до человека / В.И. Глазко. – К. : 2002. – С. 98 – 200.
6. Глеба Ю.Ю. Клеточная инженерия растений / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. – К. : Наук. думка, 1984. – 245 с.
7. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
8. Дзядевич С. В. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів / С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін / за ред. акад. НАНУ Г.В. Єльської. – К. : Наук. думка, 2006. – 256 с
9. Дзядевич С.В. Кондуктометричні ферментні біосенсиори: теорія, технологія, застосування / С.В. Дзядевич // Біополімери і клітина. – 2005. – Том. 21, № 2. – С. 91 – 106.
10. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т.А. Компанець. – К. : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. – 84 с.
11. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мельничук, Т.М. Новак, А.В. Кунах. – К. : Поліграф Колсантинг, 2003. – 495 с.
12. Медична генетика : підручник для вузів / В.М. Запорожан, Ю.І. Бажора, А.В. Шевеленкова, М.М. Чеснокова. – Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2005. – 260 с.
13. Основи біотехнології / укладачі: В.І. Буцяк., А.Г. Колотницький. – Львів : Тріада плюс, 2010. – 396 с.
14. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – С. 163 – 267
15. Тоцький В.М. Генетика : підручник / В.М. Тоцький. – Вид. 3-е, випр. та доп. – Одеса : Асторопринт, 2008. – С. 475 – 505.
16. Храмцова Е. А. Селекция продуцентов : курс лекций / Е.А. Храмцова, Н.П. Максимова. – Мн. : БГУ, 2011. – 132 с.
17. Федоренко В.О. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В.О. Федоренко, Я.І. Черник, Д.В. Максимів, Л.С. Боднар. – Львів : Оріяна-Нова, 2008. – С. 523 – 568.
18. Федоренко В.О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В.О. Федоренко, Б.О. Осташ, М.В. Гончар, Ю.В. Ребець : навч. посібник [для студентів біологічних

факультетів університетів]. – Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка. – 2007. – С. 178 – 257.

19. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. из-во, 2004. – 496 с.

20. Яворська Г. В. Промислова мікробіологія : навч. посіб. / Г.В. Яворська, С.П., Гудзь, С.О. Гнатуш. – Львів : Видав. центр ЛНУ, 2008. – 256 с.

21. Gazit E. Plenty of room for biology at the bottom. An Introduction to Bionanotechnology/ E. Gazit. – London: Imperial College Press, 2007. – 183 p.

22. Mardis E.R. New-generation DNA sequencing methods / E. R. Mardis // Ann. Rev. Genom. Human Genet. – 2008. – Vol. 9. – P. 387 – 402.

23. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation / M. L. Metzker // Nat. Rev. Genet. – 2010. – Vol. 11. – P. 31 – 46.

24. PCR technology: principle and applications for DNA amplification / ed. H.Erlich. – New York : W.H.Freeman and Company,1992. – 74 p.

25. Reece R.J. Analysis of genes and genomes. – Chichester: Jhon Willey and Sons, 2004. 20.Ross D.W. Introduction to molecular medicine. – New York, Springer, 2002. – P. 245 – 376.

26. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual/ J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor, New York : CSHL Press, 2001.

27. Schadt E.E. A window into third-generation sequencing / E. E. Schadt, S. Turner, A. Kasarskis // Human Mol. Genet. – 2010. – Vol. 19. – P. 227 – 240.

28. <http://www.biotechnolog.ru>.

29. <http://www.biochem.biotech.ua>.

30. <http://www.cbio.ru>.

31. <http://www.rnd.cnews.ru>.

32. <http://www.nanodigest.ru>.

33. <http://www.nanonewsnet.ru>.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Методичні поради до практичних занять.....	5
Практичні заняття.....	7
Практичне заняття № 1. Ферменти і методи генної інженерії.....	7
Практичне заняття № 2. Генна інженерія рекомбінантних білків...	15
Практичне заняття № 3. Генна інженерія мікроорганізмів.....	20
Практичне заняття № 4. Генетична інженерія культур клітин.....	30
Практичне заняття № 5. Генетична інженерія рослин.....	37
Практичне заняття № 6. Генетична інженерія тварин.....	44
Практичне заняття № 7. Молекулярна генетика людини.	
Генотерапія.....	50
Практичне заняття № 8. Біосенсорика і біонанотехнології.....	58
Завдання підвищеної складності.....	63
Відповіді до завдань.....	69
Словник основних термінів і понять.....	72
Додатки.....	88
Додаток А. Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими ферментами рестрикції.....	88
Додаток Б. Картування сайтів рестрикції.....	89
Додаток В. Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими ферментами рестрикції.....	90
Додаток Г. Конструювання рекомбінантного штаму <i>Pseudomonas putida</i>	91
Додаток Д. Генетичні карти плазмідних векторів	92
Додаток Е. Основні етапи генно-інженерного експерименту	93
Додаток Ж. Схематичне зображення різних типів біореакторів.....	94
Додаток З. Схематичне зображення ДНК-гібридизації.....	95
Додаток И. Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК методом ДНК-ДНК гібридизації.....	96
Додаток К. Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК імунологічним методом.....	97
Додаток Л. Хемілюмінісцентний метод виявлення ДНК-мішені.....	98
Додаток М. Процедура імуноферментного аналізу ELISA.....	99
Додаток Н. Схема клонування методом переносу ядра.....	100
Додаток П. методи генної терапії.....	101
Додаток Р. Принципова схема біосенсора.....	102
Додаток С. Схема трьохелектродного біосенсора*	103
Використана література.....	104

Навчальне видання

Галина Клепач

МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

(для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальностей 091 “Біологія” та 014 “Середня освіта” (Біологія))

Редакційно-видавничий відділ
Дрогобицького державного педагогічного університету
імені Івана Франка

Головний редактор
Ірина Невмержицька

Редактор
Ольга Крупа

Технічний редактор
Наталя Кізима

Коректор
Оксана Бульбах

Здано до набору 24.11.2017 р. Підписано до друку 29.11.2017 р.
Формат 60х90/16. Папір офсетний. Гарнітура Times. Наклад 300 прим.
Ум. друк. арк. 6, 75. Зам. 258.

Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. (Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5140 від 01.07.2016 р.) 82100, Дрогобич, вул. І. Франка, 24, к. 42, тел. 2 – 23 – 78.