

**ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ імені ІВАНА ФРАНКА**

Галина Клепач

Основи генної і клітинної інженерії

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

до проведення практичних занять

для здобувачів магістерського рівня вищої освіти

спеціальностей 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я

людини) та 091 Біологія та біохімія

Дрогобич, 2024

УДК 57.02
К 48

Рекомендовано до друку вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (протокол № 2 від 29 лютого 2024 р.)

Рецензенти:

- **Голуб Наталія Ярославівна**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка;

- **Філь Віталій Михайлович**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри медико-біологічних дисциплін, географії та екології Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка;

Відповідальна за випуск: Бриндзя Ірина Володимирівна, кандидат біологічних наук, доцент, завідувачка кафедри біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Клепач Галина.

К 48 **Основи генної і клітинної інженерії** : методичні рекомендації до проведення практичних занять [для здобувачів магістерського рівня вищої освіти спеціальностей 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини) та 091 Біологія та біохімія]. Дрогобич : Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка, 2024. 134 с.

Методичні рекомендації написані відповідно до робочої програми навчальної дисципліни “Основи генної і клітинної інженерії” для підготовки здобувачів магістерського рівня вищої освіти спеціальностей 014 Середня освіта (Біологія та здоров'я людини) і 091 Біологія та біохімія, що затверджена вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. Посібник укладений відповідно до програми навчальної дисципліни з метою забезпечення високого рівня сформованості знань, умінь і навичок у студентів. Містить методичні поради до проведення практичних занять, практичні заняття з короткими теоретичними відомостями, завдання теоретичної й практичної спрямованості, а також підвищеної складності, питання для самостійного опрацювання, словник основних термінів, додатки.

Бібліографія 16 назв

ВСТУП

Генна і клітинна інженерії є сучасними напрямками новітньої біотехнології, які визначають стрімкий розвиток цієї науки. Останніми роками досягнення генної та клітинної інженерій стали значними не тільки у науці, господарстві та медицині, але й почали здійснювати вплив на соціальну свідомість, поведінку та активність людей.

Курс “Основи генної та клітинної інженерії” знайомить з сучасними напрямками та основними завданнями, методами і досягненнями, із застосуванням рекомбінантних молекул та сконструйованих біологічних систем у новітніх технологіях народного господарства, діагностиці, біоінформатиці, біомедицині, а також з економічними та соціальними аспектами.

Предметом генної та клітинної інженерій є вивчення методів та підходів, які застосовуються для удосконалення сформованих та конструювання нових біологічних систем з метою їх практичного використання у наукових дослідженнях, молекулярній діагностиці, біомедицині, новітніх технологіях народного господарства, у розв’язанні екологічних та енергетичних проблем. Генна та клітинна інженерії нерозривно пов’язані з більшістю біологічних дисциплін, які формують її теоретичну та фундаментальну основу, зокрема такі, як “Молекулярна біологія”, “Біохімія”, “Генетика і селекція”, “Фізіологія людини та тварин”, “Мікробіологія”, “Вірусологія”, “Імунологія”, “Фізіологія та біохімія рослин”.

Мета посібника – сформулювати уявлення про напрями генної і клітинної інженерій, що мають фундаментальне та прикладне значення; ознайомити з основними технологічними процесами отримання біологічно активних речовин і продуктів за використання біооб’єктів; поглибити знання про сучасні принципи і підходи скерованого конструювання одного із компонентів біотехнологічної системи – біологічного агента (продуцента) із використанням рекомбінантної техніки, клітинної, метаболічної, білкової та хімічної інженерій.

Практичні заняття охоплюють різні актуальні теми генної і клітинної інженерії, в рамках яких розглядаються питання фундаментального та практичного змісту. Відповідно до них наводяться теоретичні, практичні й тестові завдання. Останні укладені відповідно до змісту робочої навчальної програми курсу та

передбачають застосування знань і вмінь, які були сформовані під час вивчення інших біологічних дисциплін.

На практичних заняттях студентам пропонується розглянути властивості деяких ензимів та методи генної інженерії, у яких вони використовуються, технологічні процеси отримання рекомбінантних білків і сфери їхнього застосування, технології отримання клітинних культур та їх застосування у біомедицині, промисловій біотехнології та лікувальній практиці, методи конструювання трансгенних організмів (мікроорганізмів, рослин і тварин) та напрямки їх використання, методи генетичної інженерії, скеровані на конструювання нових біологічних систем та перспективи їх застосування, деякі молекулярно-генетичні методи, які застосовуються у діагностиці генних та інфекційних захворювань, генотипуванні, видовій ідентифікації, методи секвенування ДНК, бази геномних і протеомних даних, а також алгоритми розв'язків задач з генної інженерії.

Значна увага на практичних заняттях приділяється застосуванню новітніх досягнень у генній і клітинній інженеріях з метою поліпшення добробуту та стану здоров'я людей, екології навколишнього середовища. Розглядаються питання використання рекомбінантних штамів мікроорганізмів для отримання біопалива, препаратів і біоматеріалів, які знаходять застосування у народному господарстві, переробці відходів.

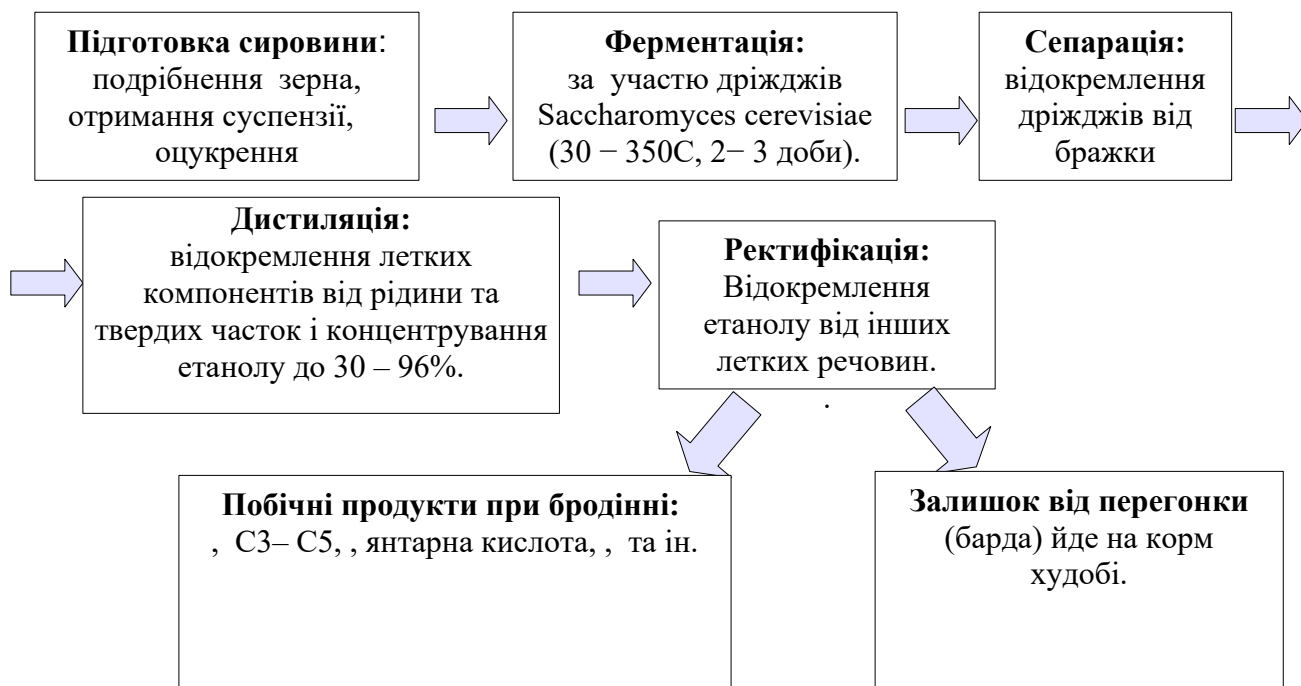
Матеріал посібника базується на знанні навчального матеріалу із “Мікробіології і вірусології”, де студенти ознайомились із розмаїттям світу мікроорганізмів та вірусів, особливостями їхньої організації та життєдіяльності, “Біохімії”, де опанували перебіг метаболічних процесів у клітині, “Генетиці з основами селекції” та “Молекулярній біології”, де вивчили механізми передачі та реалізації генетичної інформації, “Біотехнології”, де ознайомились із традиційними технологіями та її сучасними напрямками.

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

МЕТОДИЧНІ ПОРАДИ ДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

Кожне практичне заняття передбачає знання відповідної теми навчального матеріалу дисципліни, до якого укладені завдання різного типу та рівнів складності.

У завданнях одного типу потрібно зобразити етапи технологічної схеми отримання деяких речовин (наприклад, етанолу) та подати відповідь у такому вигляді:



Завдання іншого типу вимагають заповнити таблицю чи схему на основі самостійно вивченої та опрацьованої теми. Наприклад, у наведеній схемі потрібно вписати напрямки, у яких використовується культура тваринних клітин:



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

Методи введення ДНК у клітини рослин	Принцип методу
Трансформація <i>Ti</i> -плазмідом <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Ti</i> -плазмідом <i>A. tumefaciens</i> обумовлюють перенесення <i>T</i> -ДНК, яка інтегрується у геном клітини рослин і викликає пухлини. На основі <i>Ti</i> -плазмід сконструйовані <i>Ti</i> -вектори.
Векторні системи на основі <i>Ti</i> -плазмід	<i>Ti</i> -вектори позбавлені генів, що відповідають за синтез фітогормонів, опінів та генів <i>vir</i> . Вони не здатні самостійно проникати у клітини рослин і обумовлювати інтеграцію чужорідних генів у їхній геном. <i>Ti</i> -вектори містять ділянки <i>ori</i> (відповідають за реплікацію в клітинах <i>E. coli</i>), правий кінцевий повтор <i>T</i> -ДНК (необхідний для інтеграції <i>T</i> -ДНК у геном рослини); деякі вектори містять обидва повтори, полілінкер для клонування генів у <i>T</i> -ДНК, а також гени-маркери для бактерійних та рослинних клітин. Наявні бінарна і коінтегративна векторні системи.
Бомбардування мікрочастинками	Клітини чи тканину рослини бомбардують хімічно інертними частинками золота (діаметром 0,6 – 3 мкм), які містять на своїй поверхні адсорбовані молекули ДНК. Цими частинками заряджають генну пушку; після вистрілу, частинки пробивають клітинні стінки, а ДНК потрапляє всередину клітини, далі – у ядро (чи пластиди). Через годину після бомбардування, у тканинах рослини може бути виявлена експресія трансгена, однак його стабільна інтеграція у хромосому спостерігається у невеликій кількості клітин.

ПРАКТИЧНІ ЗАНЯТТЯ

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1

Ензими генної інженерії, їх характеристика та застосування

Мета: ознайомитися з видами та властивостями ензимів, що використовуються у генній інженерії, а також методами, у яких вони використовуються.

Теоретичні відомості

Технологія рекомбінантних ДНК (її називають також молекулярним клонуванням) – це сукупність експериментальних процедур, які дають змогу здійснити перенесення генетичного матеріалу з одного організму до іншого є основним методом генної інженерії. Роком її народження вважається **1972 р.**, коли група дослідників у Станфордському університеті (США) під керівництвом **Пола Берга** отримала **першу штучно створену рекомбінантну молекулу ДНК in vitro**. Вона складалася із фрагментів двох різних молекул ДНК: вірусної (мавпячого вірусу SV40) і фагової *λdvgal* (фага λ) з галактозним опероном кишкової палички (*Escherihia coli*). Стратегія переносу структурно-функціональної одиниці спадковості – гена з одного організму в інший була розроблена американськими ученими **Стенлі Коеном** і **Гербертом Бойєром** у 1973 р. і стала основою методу генної інженерії – **трансгенозу** [1; 3].

У 1976 р. учені невеликої американської фірми Genentech розпочали дослідження з отримання рекомбінантних ДНК. Через два роки вони розробили основні етапи методу молекулярного клонування генів:

- 1) виділили фрагменти гена інсуліну із геному людини;
- 2) отримані фрагменти гена перенесли у генетичні елементи (вектори), що здатні реплікуватися у клітинах *E. coli*;
- 3) підтвердили, що клітини *E. coli* синтезували людський інсулін за програмою введених фрагментів гена інсуліну;
- 4) отриманий інсулін очистили та використали як лікувальний препарат для хворих на діабет, які мають алергічну реакцію на інсулін свині.

До середини 90-х рр. 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 р. до 60 млрд доларів у 2000.

Станом на сьогодні, генна інженерія слугує основою для отримання багатьох біотехнологічних продуктів (біополімерів, метаболітів, лікарських препаратів, вакцин, діагностичних наборів), високопродуктивних і стійких форм рослин і тварин сільськогосподарського призначення [1].

Завдання генної інженерії такі:

1) конструювання штамів мікроорганізмів, які продукують різні за природою та властивостями хімічні сполуки, антибіотики, полімери, амінокислоти, ензими;

2) розробка методів точної діагностики, а також технологій профілактики і лікування інфекційних та генетичних (спадкових) захворювань;

3) значне підвищення урожайності сільськогосподарських культур шляхом конструювання форм, стійких до шкідників, грибкових і вірусних інфекцій, стрес-чинників навколишнього середовища;

4) конструювання нових форм сільськогосподарських та інших тварин із поліпшеними ознаками;

5) конструювання нових форм мікроорганізмів, які здійснюють розщеплення токсичних речовин, прискорюють переробку 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 кодовані ними амінокислотні послідовності поліпептиду;

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

4) клонування ДНК, суть якого зводиться до введення ДНК-фрагмента в самореplikативний генетичний апарат (векторна молекула плазмідного чи вірусного походження), який

використовують для трансформації бактерій. Бактеріальна клітина після трансформації здатна відтворювати цей фрагмент у багатьох мільйонах ідентичних копіях;

5) конструювання модифікованих версій генів з наступним їх клонуванням у клітини або організми.

Усі маніпуляції з генами *in vitro* здійснюються за участю різноманітних ензимів. До основних ензимів, які застосовуються у генній інженерії, належать специфічні ендонуклеази рестрикції, ДНК-лігази, ДНК-полімерази, зворотна транскриптаза (РНК-залежна-ДНК-полімераза) [4].

Ендонуклеази рестрикції (*син.* рестриктази) – бактерійні ензими, які розщеплюють молекулу ДНК у чітко визначених сайтах з утворенням тупих і липких кінців (див. додаток I). Рестрикційна активність ендонуклеаз може бути асоційована з метилазою. Рестриктази використовують для побудови рестрикційних карт геномів та виявлення поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (див. додаток II). 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 у складі ензиму, потреба у кофакторах, специфічність сайтів розпізнавання) рестриктази поділяють на чотири класи. Із них, у технології рекомбінантних ДНК головно використовують ендонуклеази рестрикції (RE) II типу. Зауважено, що системи рестрикції – модифікації (RM) типу II широко розповсюджені серед бактерій. Їх можуть кодувати геноми архебактерій, фагів та віруси водоростей. Описано більш як 3500 RE типу II, які розпізнають понад 240 різних послідовностей у ДНК. Системи RM типу II є простими і найкраще вивченими. Рестрикційні ензими зазвичай є гомодимерами і співіснують у клітинах з окремими білками – метилтрансферазами. Для вияву активності RE потребують лише Mg^{2+} . Відповідні метилтрансферази (MT) потребують S-аденозилметіоніняк кофактор, та метилують обидва ланцюги ДНК, формуючи залишки N6-метиладеніну, 5-метилцитозину або N4-метилцитозину. RE розпізнають паліндромні послідовності довжиною 4–8 п.н., або паліндромні послідовності, перервані неспецифічними нуклеотидами, або частково паліндромні, чи несиметричні послідовності. Багато RE типу II розпізнають специфічні послідовності ДНК і розщеплюють її у постійних позиціях – у цих послідовностях, або на певній короткій

віддалі від них, у результаті утворюються фрагменти з 5'-фосфатами та 3'-гідроксилами на кінцях. Наприклад, *EcoRI* розпізнає та розщеплює у ДНК гексануклеотидну послідовність, утворюючи фрагменти з тетра-нуклеотидними 5'-липкими кінцями [2].

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 з іншими фрагментами. Далі визначають розміри фрагментів ДНК, порівнюючи їхню електрофоретичну рухливість із рухливістю маркерних фрагментів, розміри яких відомі. Розміщення сайтів розщеплення *RE* є постійною характеристикою молекули ДНК – її “молекулярним маркером”. Це дає змогу будувати фізичні (рестрикційні) карти геномів – схеми розміщення сайтів розщеплення *RE*. Віддаль між сайтами на картах визначають у парах нуклеотидів. Побудова рестрикційних карт є важливим методом вивчення організації геномів і передумовою дальших генно-інженерних процедур [1].

Будь-яка ДНК з відомою первинною структурою може бути охарактеризована кількістю сайтів рестрикції та їх локалізацією за допомогою спеціальної програми RestrictionMapper. Алгоритм є таким: на головній сторінці сайту Національного центру біотехнологічної інформації США (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, або <http://www.pubmed.com>) ввести запит «Enterobacteria phage lambda, complete genome», вибрати вкладку «Nucleotide» та натиснути «Enter». Скопіювати повну нуклеотидну послідовність бактеріофага λ , що складається з 48502 н.п. (GenBank, NC_001416.1). Відкрити програму RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org>) та ввести у спеціальне вікно нуклеотидну послідовність фага λ . Далі вибрати опцію “SelectedIndividualEnzymes”, вибрати ензим “EcoRI” та натиснути “Map Sites”. З поданої інформації бачимо, що ДНК бактеріофага λ має 5 сайтів рестрикції, однак фрагментів буде 6, оскільки вона є лінійною. Далі можна дізнатися розміри усіх рестриктів, натиснувши кнопку “Virtual Digest” [6].

Серед інших нуклеаз, які використовуються у методах генної інженерії, є 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 III) [2].

ДНК-лігази – ензими, що каталізують утворення фосфодиефірного зв'язку між 3'-ОН гідроксилем дезоксирибози і 5'-фосфатом сусідніх нуклеотидів у одноланцюговому розриві полінуклеотидного 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* як кофактор використовує дифосфопіридиннуклеотид, а лігаза фага Т4 – АТФ за наявності Mg^{2+} . Лігаза фага Т4 є більш універсальним ферментом, а тому використовується частіше. Вона здатна з'єднувати дволанцюгові фрагменти ДНК з “тупими” кінцями у єдину молекулу.

Полімерази – ферменти бактерійного походження, здатні синтезувати нуклеїнові кислоти у напрямку 5'→3'. Серед полімераз найчастіше використовуються:

ДНК-полімераза I *E. coli* володіє 5'→3'-полімеразною активністю, а також 5'→3' та 3'→5'-екзонуклеазними активностями. ДНК-полімераза I не може ініціювати синтезу нового ланцюга. Вона лише каталізує приєднання нуклеотидів до 3'ОН-кінця уже наявного полінуклеотидного ланцюга (праймера), згідно з принципом комплементарності.

Фрагмент Кленова – великий (76 кДа) С-кінцевий субфрагмент ДНК-полімерази I *E. coli*, має полімеразну та 3'→5'-екзонуклеазну активності. Його називають Кленов (Klenow)-фрагментом на честь Ганса Кленова, який вперше виділив та описав його властивості.

У генній інженерії використовують низку інших полімераз:

ДНК-полімеразу бактеріофага Т4 *E. coli*;

ДНК-полімеразу бактеріофага Т7 *E. coli*;

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

РНК-залежну ДНК-полімеразу (зворотна транскриптаза);

Полі(А)-полімеразу;

РНК-полімерази фагів Т3, Т7 і SP6.

Усі зазначені ферменти відрізняються активностями, темпом, з яким проходить полімеризація ланцюга та процесивністю – здатністю

ензиму 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) [1].

Окрім зазначених ензимів, у технології рекомбінантних ДНК можуть використовуватися різні ендо- та екзонуклеази, термінальна дезоксинуклеотидил-трансфераза з тимусу теляти, лужні фосфатази, полінуклеотидкіназа фага та ін. Важливо зазначити, що описані ензими, позбавлені видової специфічності, а тому з їх допомогою може поєднувати в єдине ціле фрагменти ДНК будь-якого походження у бажаній послідовності. Це дає змогу генній інженерії долати встановлені природою видові бар'єри і здійснювати міжвидові схрещування [6].

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 °С полінуклеотидні ланцюги ДНК розходяться (денатурація ДНК, плавлення ДНК), при поступовому охолодженні можливе відновлення двоспіральної структури за наявності комплементарних полінуклеотидних ланцюгів – **реактивація ДНК** (гібридизація ДНК, відпал ДНК);

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

– паліндромні ділянки ДНК – це ділянки, які містять інвертовані послідовності (послідовності-“перевертні”; вони розпізнаються багатьма рестриктазами та розщеплюються).

Найважливішими методами технології рекомбінантних ДНК є:

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 (вектор плазмідного чи вірусного походження), який використовують для трансформації бактерій. Бактерійна клітина після вдалої трансформації здатна відтворювати цей фрагмент у багатьох мільйонах ідентичних копіях (**явище молекулярного клонування**);

5) генна інженерія дає змогу отримувати модифіковані версії генів, а потім їх вносити у клітини або організми [6].

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

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

2. Чи не завдадуть трансгенні організми шкоди традиційному сільському господарству?

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

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

5. Які можливі віддалені ефекти використання генетично модифікованої їжі?

Ці та багато інших питань потребують державної регламентації наукових і виробничих робіт із використанням технологій рекомбінантних ДНК [5].

План заняття

1. Характеристика екзо- та едонуклеаз як ензимів генної інженерії. Вкажіть відмінності у їх властивостях та наведіть приклади.

2. Опишіть застосування едонуклеаз рестрикції II типу у наступних методах генної інженерії: рестриктазному, рестриктазно-лігазному, фізичному картуванні ДНК, а також під час отримання генотек.

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

4. Опишіть застосування ДНК- та РНК-полімераз у методах генної інженерії: синтез кДНК на матрицях РНК, нік-трансляції, випадкових гексануклеотидних праймерів, полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР), а також під час отримання клонотек.

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

5.1. _____ розрізають дволанцюгову спіраль ДНК у специфічних послідовностях, які складаються із чотирьох – восьми нуклеотидів (паліндроми), розділяючи її на фрагменти чітких розмірів, які називаються _____.

5.2. 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.

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

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

5.5. 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.

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. 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: _____.

6.2. Ензим генної інженерії нуклеаза S1:

- а) здійснює полімеризацію нуклеотидів;
- б) руйнує ділянки у 2S ДНК навпроти прогалин;

- в) розпізнає паліндромні послідовності у ДНК і гідролізує їх;
- г) гідролізує «шпилькові» структури у складі ДНК та РНК;
- д) розщеплює 2S ДНК з 5' та 3'-кінців.

Правильна відповідь: _____

6.3. 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: _____

6.4. Найчастіше сайтами розщеплення ендонуклеаз рестрикції II типу є:

- а) регуляторні послідовності;
- б) ТАТА-послідовності;
- в) паліндромні послідовності;
- г) тандемні послідовності;
- д) переривчасті послідовності.

Правильна відповідь: _____

6.5. 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: _____

7. Розв'яжіть задачі.

7.1. 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?

7.2. 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. Основні етапи становлення генної інженерії.
2. Відкриття рестриктаз, лігаз та інших ензимів, що використовуються у генній інженерії.
3. Основні напрями розвитку сучасної генної інженерії.
4. Хто є засновником генної інженерії та чому?
5. Рестриктази та лігази, які використовуються у генній інженерії.
6. Характеристика ДНК-полімераз, зворотної транскриптази.
7. Характеристика методів генній інженерії, у яких застосовуються ДНК-полімерази.
8. Характеристика явищ трансформації та трансдукції як основа методів молекулярного клонування генів.
9. Метод векторної трансформації. Основні етапи методу та ензими, задіяні у ньому.
10. Опишіть явище рестрикції-модифікації, виявлене Лурієм (1952 р.) під час вивчення взаємодії бактеріофага λ та клітин *Escherichia coli*.

Література

1. Божков А.І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.
2. Задачі та вправи з генетики : навч. посіб. / В. О. Федоренко та ін. Львів : Оріяна-Нова, 2008. С. 523–568.
3. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченк С. С. Клітинна та генна інженерія : підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. С. 50–115. URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf
4. Кравців Р. Й., Колотницький А. Г., Буця В. І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.
5. Ларичева О.М., Цвях О.О. Лабораторний практикум з молекулярної біології. В-во МНУ ім. В.О. Сухомлинського, 2020. С. 30–34. URL: <http://surl.li/otfld>.
6. Glik B.R., Pasternak J.J., Patten C. L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Washington : ASM Press, 2010. P. 47–97. URL: <https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

Методи конструювання рекомбінантних ДНК

Мета: ознайомитися з генно-інженерними методами конструювання рекомбінантних ДНК, організацією векторних молекул, їх властивостями та застосуванням.

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 уведенням цих нових (рекомбінантних) генетичних структур до живої клітини, де новостворений генетичний матеріал здатний розмножуватися і забезпечувати синтез кінцевих продуктів (див. додаток VI).

Уперше синтез рекомбінантної молекули ДНК було здійснено у 1972 р. групою американських генетиків зі Стенфордського університету під керівництвом Пола Берга. Вони отримали *in vitro* гібридну молекулу, що складалася з ДНК вірусу SV40 і ДНК фага λ dvgal. У 1980 р. за своє відкриття Пол Берг був удостоєний Нобелівської премії в галузі хімії [1].

Функціонально активні рекомбінантні молекули ДНК мікроорганізмів уперше (у 1973 р.) були сконструйовані **С Коеном, Д. Хелінським, Г. Бойєром** та їхніми співробітниками. Одночасно науковою групою С. Коена була розв'язана проблема об'єднання фрагментів ДНК різного походження з векторними молекулами ДНК. За допомогою ензимів рестриктаз і лігаз були сконструйовані перші **“химерні” плазмиди**, які містили “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 та ампліфікації генів, їх секвенування й клонування, а також підходи до їх експресії у гетерологічних системах – бактерійних клітинах, клітинних лініях тваринного і рослинного походження (див. додатки VIII–XII) [1].

Для конструювання рекомбінантних молекул використовують конекторний та рестриктазно-лігазний методи. Залежно від структури

кінців фрагментів ДНК застосовують різні модифікації рестриктазно-лігазного методу.

Конекторний метод синтезу рекомбінантних молекул ДНК вперше застосував Пол Берг, який використовується у генно-інженерних маніпуляціях для поєднання різних фрагментів ДНК з “тупими кінцями” в єдину молекулу. Основним інструментом конекторного методу є використання ензиму ДНК-лігази, яка з’єднує фрагменти ДНК [1].

Принцип конекторного методу: до 3'-кінця одного з рекомбінантних фрагментів ДНК приєднують оліго-dA-послідовність за допомогою термінальної трансферази, а до 5'-кінця іншого – оліго-dT-послідовність приблизно однакової довжини. При змішуванні таких фрагментів формуються водневі зв’язки між оліго-dA- та оліго-dT-послідовностями. Одноланцюгові прогалини сформованої гібридної молекули забудовують ДНК-полімеразою та з’єднують ДНК-лігазою.

Однією з переваг конекторного методу є його висока точність та ефективність при поєднанні різних ДНК-фрагментів. Цей метод дає змогу створювати нові генетичні конструкції (в т. ч. рекомбінантні плазмиди, віруси), які можуть бути використані для клонування генів, дослідження їхніх функцій, отримання гетерологічних білків, створення генетичних бібліотек (**генотек**).

Інший американський біохімік С. Коен зі співробітниками запропонував більш простий метод конструювання гібридних молекул ДНК, заснований на застосуванні двох ензимів: рестриктази і ДНК-лігази. Рестриктазно-лігазний метод став більш популярним і використовується як більш простий і надійний.

Рестриктазно-лігазний метод складається з трьох етапів: 1) фрагментація молекул ДНК ендонуклеазою рестрикції II класу; 2) препарати фрагментів різних молекул ДНК, гідролізовані однією рестриктазою, змішують; вони за певних умов реасоціюють завдяки комплементарній взаємодії “липких” кінців; 3) лігування фрагментів за допомогою ДНК-лігази [1].

Рестриктазно-лігазний метод, порівняно з конекторним, є простішим у виконанні та дає можливість легко вирізати вбудований фрагмент ДНК з гібридної молекули, що є важливим при його перенесенні в інше генетичне оточення. Цей метод також уможлиблює застосування двох рестриктаз одночасно. Утворені фрагменти двох молекул ДНК у цьому разі можуть мати різні липкі

кінці, і їх об'єднують у строго визначеній орієнтації відносно один одного. Недоліком є те, що при змішуванні тих самих фрагментів ДНК, отриманих після гідролізу однією рестриктазою, можливі їх різні орієнтації у сформованих гібридних молекулах. Більше того, у процесі лігазної реакції може відбуватися ковалентне об'єднання не тільки двох, але й трьох і більше фрагментів, їх називають **контакameraми** – вони є баластними продуктами лігазної реакції.

За такою схемою *in vitro* можуть бути ковалентно з'єднані два і більше фрагменти будь-якого походження, які отримують гідролізом молекул ДНК однією рестриктазою. Однак, у первісному вигляді метод має суттєві обмеження, пов'язані з тим, що за допомогою рестриктаз (особливо, одного ензиму) можна отримати лише специфічний, строго певний набір фрагментів досліджуваної ДНК. Для подолання цього недоліку була розроблена модифікація рестриктазно-лігазного методу, заснована на використанні лінкерних молекул (**лінкерів**) – синтетичних сегментів ДНК, що містять послідовності сайтів рестрикції для багатьох рестриктаз. Метод запропонували Р. Шеллер зі співробітниками в 1977 р., який уможлиблює досить просто рекомбінувати *in vitro* практично будь-які фрагменти ДНК [1].

Модифікований рестриктазно-лігазний метод з використанням лінкерів включає такі етапи: 1) до “липких” чи “тупих” кінців фрагментів ДНК за допомогою лігази фага T4 пришивають короткі синтетичні дволанцюгові сегменти, які містять послідовності (сайти рестрикції) для розпізнавання певної рестриктази; 2) отриманий фрагмент обробляють обраною рестриктазою, у результаті чого утворюються “липкі” кінці; 3) утворені фрагменти рекомбінують *in vitro* з іншими молекулами ДНК за звичайною схемою рестриктазно-лігазного методу.

Використання лінкерних молекул робить рестриктазно-лігазний метод рекомбінації фрагментів ДНК універсальним, оскільки вихідні фрагменти можна отримувати різноманітними способами [3].

У технологіях рекомбінантних ДНК використовують векторні молекули (вектори). **Вектори** – це молекули ДНК, які здатні переносити включені в них гени у клітину, де вони реплікуються автономно чи після інтеграції їх із геномом. Історично першими векторами слугували плазмідні бактерій, зокрема плазмідні *E. coli*, наприклад *pS1101* чи *CoIE1*. На їх основі синтезували рекомбінантні плазмідні, які містять два чи три гени стійкості, кілька унікальних

сайтів рестрикції. Прикладом популярного вектора 80-х рр. ХХ ст. може бути *pBR322* та *pUC19* (Додаток V). Здебільшого позначення плазмідного вектора включає прописну букву *p* (від англ. *plasmid*) і ще кілька букв, що мають стосунок до опису вектора чи до історії його створення. Наприклад, букви *BR* в позначенні плазмиди *pBR322* вказують на авторство Ф. Болівара і Р. Родрігеса, а число 322 – її цифрове позначення, зазначене у дослідницьких протоколах.

Довжина плазмиди (далі, вектор) *pBR322* – 4361 п. н. (Додаток V, рис. 1); містить гени стійкості до двох антибіотиків, зокрема, ампіциліну (*Amp^r*) і тетрацикліну (*Tet^r*), унікальні сайти для кількох рестриктаз, зокрема, *BamHI*, *HindIII* і *SalI* в гені *Tet^r*, один *PstI*-сайт в гені *Amp^r*, один *EcoRI*-сайт, що знаходиться за межами кодуєчих послідовностей, а також сигнал початку реплікації (*ori C*), що забезпечує реплікацію виключно в клітинах *E. coli*. Плазміда реплікується з утворенням великої кількості копій, в інші бактерійні клітини переноситься дуже погано [3].

Більш досконалим є вектор плазмідного походження *pUC19* (Додаток V, рис. 2) довжиною 2686 п. н. Він містить: ген стійкості до ампіциліну, регульований сегмент гена β -галактозидази (*lacZ'*) лактозного оперону *E. coli*, ген *lacI*, який кодує репресор, що контролює експресію *lacZ'*, полілінкер – коротку послідовність із великою кількістю унікальних сайтів розпізнавання для ендонуклеаз рестрикції (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *XmaI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *HincII*, *AccI*, *BspMI*, *PstI*, *SphI* і *HindIII*), точку початку реплікації плазмиди *pBR322*. Вектори *pBR322* та *pUC19* називаються **векторами інактивациї**.

У багатьох випадках, у вектори, які функціонують в *E. coli*, можна вбудувати другий сайт ініціації реплікації, що забезпечує їх реплікацію в інших клітинах. Це так звані **човникові вектори**, які уможливають здійснити перші етапи клонування генів в клітинах *E. coli*, а потім їх перенести у інші клітини. До того ж, сконструйовано багато плазмідних векторів, які містять один сайт початку реплікації ДНК, функціональний у клітинах широкого спектру. Такі вектори використовують для роботи з різними мікроорганізмами [2].

Наявні сьогодні векторні молекули (вектори) класифікують за багатьма ознаками [4]:

- 1) за застосуванням: клонувальні, експресійні та спеціалізовані;
- 2) за походженням: плазмідні, фагові (вірусні) та гібридні;

- 3) за структурою: кільцеві та лінійні;
- 4) за способом підтримання в клітині: автономні та інтегративні;
- 5) за рівнем експресії: моно-, оліго- та мультикопійні;
- 6) за кількістю репліконів у клітині: моно- і бірепліконні.

Хоча деякі вектори побудовані досить своєрідно, усі системи клонування відповідають двом основним вимогам: 1) присутність кількох сайтів для клонування і 2) можливість достатньо простої ідентифікації (**скринінгу**) клітин із рекомбінантними ДНК. Доцільно зазначити, що унікальні сайти рестрикції виконують у дослідах із рекомбінантною ДНК подвійну функцію. Вони забезпечують: 1) вбудовування чужорідної ДНК у вектор та 2) вирізання клонованої послідовності із вектора. Інакше кажучи, після вбудовування фрагмента ДНК у певний локус вектора, цей фрагмент можна вирізати з нього після проведеного клонування тією ж самою рестриктазою, оскільки на його кінцях є два аналогічних сайти рестрикції. Іноді вихідний сайт рестрикції модифікується, тоді вирізання клонованого фрагмента утруднюється. Вирізаний фрагмент ДНК у подальших маніпуляціях можна вбудувати у вектори, призначені для секвенування, чи забезпечення високого рівня експресії клонованого гена [2].

План заняття

1. Ознайомтеся із методологією конекторного методу синтезу рекомбінантних молекул ДНК, охарактеризуйте його та дайте відповіді на запитання:

1.1. Що таке конектори та яку функцію вони виконують у конструюванні рекомбінантних молекул?

1.2. Для чого та яку ДНК-полімеразу застосовують у конекторному методі?

1.3. Які ензими використовують для фрагментації ДНК? Охарактеризуйте їх.

1.4. Що таке “липкі” і “тупі” кінці фрагментів ДНК?

1.5. Як можна об'єднати фрагменти ДНК з “тупими” кінцями в одну рекомбінантну молекулу?

2. Ознайомтеся із методологією рестриктазно-лігазного методу синтезу рекомбінантних молекул ДНК, його модифікацією, охарактеризуйте їх та дайте відповіді на запитання:

2.1. Як отримують фрагменти ДНК з однаковими “липкими” кінцями?

2.2. На чому ґрунтується об’єднання фрагментів ДНК з “липкими” кінцями в одну рекомбінантну молекулу?

2.3. Які недоліки має типовий рестриктазно-лігазний метод?

2.4. Як застосування лінкерів у рестриктазно-лігазному методі підвищило його ефективність?

2.5. Які функції виконує лігаза у модифікованому рестриктазно-лігазному методі

3. Охарактеризуйте основні підходи до класифікації векторів молекулярного клонування та дайте відповіді на запитання:

3.1. Які існують вектори за застосуванням? Яке походження вони можуть мати? Як вони можуть підтримуватися в клітині?

3.2. Перерахуйте основні вимоги, що висуваються до векторів молекулярного клонування.

3.3. Яку функцію виконують гени стійкості до антибіотиків у складі векторів молекулярного клонування?

4. Виберіть правильну відповідь:

4.1. Що має містити плазмід як вектор молекулярного клонування:

- а) суїцидний ген;
- б) ориджин реплікації (*ori C*);
- в) сайт зв’язування РНК-полімерази;
- г) унікальний сайт рестрикції;
- д) ген-маркер.

Правильна відповідь: _____.

4.2. Вектор pUC19 у своєму складі містить:

- а) множинний сайт рестрикції;
- б) фрагмент гена трансацетилази;
- в) ген тетрациклін-резистентності (*Tet^r*);
- г) ген стрептоміцин-резистентності (*Amp^r*);
- д) суїцидний ген.

Правильна відповідь: _____.

4.3. У генно-інженерних методах ДНК-лігази застосовують:

- а) для каталізу водневих зв’язків у дуплексах ДНК;
- б) для ренатурації ланцюгів ДНК;
- в) для об’єднання вектора та фрагмента ДНК в єдину молекулу ;
- г) для каталізу водневих зв’язків у ланцюгах ДНК;
- д) для з’єднання одно- з дволанцюговими фрагментами ДНК.

Правильна відповідь: _____.

4.4. Що відрізняє вектор молекулярного клонування від інших молекул ДНК:

- а) наявність генів;
- б) присутність промоторів;
- в) наявність селективних генів;
- г) здатність до трансгенезу;
- д) здатність до автономної реплікації?

Правильна відповідь: _____.

4.5. Полілінкерна ДНК – це фрагмент ДНК, що:

- а) використовується для рекомбінації;
- б) містить кілька сайтів для різних лігаз;
- в) містить кілька унікальних сайтів рестрикції;
- г) впливає на ефективність трансформації;
- д) містить ориджин реплікації (*ori C*).

Правильна відповідь: _____.

5. Розв'яжіть задачі.

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

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

Ензим	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 ДНК піддали гель-електрофорезу і визначили їхні розміри. Використовуючи дані, наведені у таблиці, побудуйте рестрикційну карту вірусної ДНК.

5.3. Препарат кільцевої плазмідної ДНК обробили ендонуклеазами рестрикції та їх комбінацією (див. таблицю), а потім проаналізували фрагменти за допомогою гель-електрофорезу:

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

Використовуючи ці дані, побудуйте рестрикційну карту даної плазміди.

Питання для самостійного опрацювання

1. Характеристика ендонуклеаз рестрикції II класу, які використовуються у технологіях конструювання ДНК.
2. Опишіть методи отримання фрагментів ДНК.
3. Отримання фрагментів ДНК за застосування зворотної рестриктази та полімеразно-ланцюгової реакції.
4. Характеристика ДНК-лігаз, які використовуються у технологіях конструювання ДНК.
5. Вектори молекулярного клонування, їх організація.
6. Класифікація векторів, їх види.
7. Функціональна характеристика генетичних елементів у складі векторів молекулярного клонування.
8. Застосування конекторного методу для конструювання рекомбінантних ДНК. Вкажіть його переваги й недоліки.
9. Застосування рестриктазно-лігазного методу для конструювання рекомбінантних ДНК. Вкажіть його переваги й недоліки.
10. Опишіть особливості застосування модифікованого рестриктазно-лігазного методу для конструювання рекомбінантних ДНК.

Література

1. Божков А.І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.
2. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. посібник [для студентів біологічних

факультетів університетів] / В.О. Федоренко та ін. Львів : Вид. центр ЛНУ ім. І. Франка, 2007. С. 178 – 236.

3. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія : підручник. Київ: Фітосоціоцентр, 2010. С. 50–115. URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf

4. Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцяк В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.

5. Glik B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2010. P. 47–97. URL: <https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 3

Генна інженерія рекомбінантних білків

Мета: ознайомитися з генно-інженерними методами отримання рекомбінантних білків за використання прокаріотичних та еукаріотичних систем, а також підходами до їх скринінгу.

Теоретичні відомості

Серед багатьох біологічних об'єктів, що переважно використовуються як системи для клонування чужорідних генів, значиться *E. coli*, а також інші, зокрема бактерії *Bacillus subtilis* і *Agrobacterium tumefaciens*, одноклітинні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, різні клітинні системи тваринного походження (комах, рослин і ссавців)

Для всіх рутинних процедур молекулярного клонування широко використовується *E. coli*. У багатьох випадках, у вектори, які функціонують в *E. coli*, можна вбудувати другий сайт ініціації реплікації, який забезпечує їх реплікацію в інших клітинах. Це так звані **човникові вектори**, які дають змогу здійснити клонування як в клітинах *E. coli* та інших клітинах організмів завдяки присутньому у їх складі ориджинів реплікації, які підтримуються у них. Крім того, створено багато плазмідних векторів, які містять один сайт початку реплікації ДНК для широкого спектру господарів. Ці вектори можна використати для роботи з різними мікроорганізмами [3].

Клонування еукаріотичних структурних генів. Для клонування еукаріотичних структурних генів потрібні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони із первинних РНК-транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК в бактерійній клітині неможлива. Крім того, експресія еукаріотичної ДНК може здійснюватися тільки за присутності прокаріотичних сигнальних послідовностей, які регулюють транскрипцію і трансляцію. До того ж, кінцеві ділянки еукаріотичних мРНК особливим чином модифіковані: їх 5'-кінці кеповані (містять "кеп" із залишку G, часто метильованого), а 3'-кінці поліаденільовані (містять poly(A)-"хвіст" із приблизно 200 залишків аденозину).

Присутність poly(A)-"хвоста" уможливорює відрізнити мРНК від рибосомальної і транспортної РНК. Для цього сумарну еукаріотичну

РНК пропускають через колонку, заповнену целюлозою, до якої “пришиті” короткі олігонуклеотидні ланцюжки з тимідинових залишків *oligo(dT)* довжиною приблизно 15 мономерів. *Poly(A)*-хвости молекул мРНК спарюються з *oligo(dT)* і затримуються у колонці, а молекули тРНК і рРНК вільно проходять через неї. Потім колонку промивають буфером, в якому розриваються водневі зв'язки між А і Т, і мРНК вивільняється [1].

Оскільки безпосередньо мРНК не можна вбудувати в ДНК-вектор, то спочатку на її основі необхідно синтезувати дволанцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотню транскриптазу і фрагмент Кленова ДНК-полімерази I. Спочатку в реакційну суміш з очищеною мРНК додають короткі *oligo(dT)*, зворотню транскриптазу і суміш чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів, dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). *Poly(A)*-хвіст мРНК спарюється з *oligo(dT)*, що має вільну 3'-ОН-групу, яка ініціює синтез комплементарного ланцюга. Матрицею в цьому синтезі є молекула мРНК, а каталізує його зворотна транскриптаза. Вона послідовно приєднує до ростучого ланцюга залишки Т, С, G чи А, комплементарні А, G, С чи U мРНК. *In vitro* синтез кДНК проходить не до кінця, при цьому зворотна транскриптаза перед зупинкою здебільшого повертається заново і приєднує ще кілька нуклеотидів у зворотному напрямі, в результаті чого утворюється “шпилька”. Далі в реакційну суміш вносять фрагмент Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, який добудовує другий ланцюг ДНК, використовуючи перший як матрицю. Він приєднує дезоксирибонуклеотиди до ростучого ланцюга, починаючи з 3'-ОН-кінця шпильки. Після закінчення синтезу, препарат обробляють ензимами РНКазою Н (руйнує молекули мРНК) і нуклеазою SI (відщеплює односторонні кінці ДНК). Отриманий препарат є сумішшю частково і повністю дволанцюгових комплементарних ДНК-копій (кДНК) мРНК, які переважають у вихідному зразку. Отримані у такий спосіб різні кДНК вбудовують у плазмідний вектор і отримують кДНК-бібліотеку. Для скринінгу кДНК-бібліотеки із метою ідентифікації клонів, які містять специфічні гібридні плазміди, використовують метод гібридизації чи імунологічні методи. В останньому випадку, кДНК має бути вбудована у сайт, який перебуває під контролем бактерійного промотора, що забезпечує ефективну транскрипцію. Проте практично жоден вектор не гарантує, що у вбудованій кДНК збережеться правильна рамка зчитування і

синтезуватиметься «правильний» поліпептидний ланцюг. Однак усі позитивні клони, виявлені тим чи іншим методом, необхідно піддати наступній перевірці та ідентифікувати ті з них, що містять цільову повнорозмірну нуклеотидну послідовність [5].

За допомогою плазмідних векторів можна клонувати фрагменти ДНК завдовжки до 10 т.п.н. Однак при конструюванні геномних бібліотек часто доводиться працювати з більшими за розмірами фрагментами. Для цього були розроблені **вектори на основі бактеріофага λ *E. coli***. Розмір ДНК фага $\lambda \approx 50$ тис. п. н., причому відомо, що його значна частина (ділянка $I/E \approx 20$ тис. п. н., що відповідає за вбудовування у ДНК-хазяїна) не суттєва для розмноження в *E. coli*, а тому може бути замінена на чужерідний фрагмент ДНК еквівалентного розміру. Така утворена рекомбінантна молекула буде реплікуватися у клітині як ДНК “рекомбінантного” фага λ , який почав літичний шлях розвитку [51].

У результаті досліджень із вивчення збирання фага λ була розроблена система упаковки молекул ДНК *in vitro* з утворенням інфекційних фагових частинок. Змішавши в пробірці очищені пусті головки, фагову ДНК і зібрані відростки, можна отримати інфекційні фагові частинки [5].

Один із багатьох λ -векторів для клонування має два *Bam*H1-сайти, які фланкують ділянку довжиною 20 т.п.н. При гідролізі очищеної фагової ДНК рестриктазою *Bam*H1 утворюються три фрагменти. Так зване L-плече (область L) містить генетичну інформацію про головку і відросток фага, праве плече R (область R) відповідає за реплікацію і лізис, а середній сегмент містить гени, які відповідають за процеси інтеграції і вирізання (сегмент I/R, від англ. *integration/excision*). Даний центральний сегмент може бути замінений на нуклеотидну послідовність довжиною приблизно 20 т.п.н. клонованої ДНК. ДНК, призначену для клонування також обробляють рестриктазою *Bam*H1 і отримують фрагменти розміром від 15 до 20 т.п.н. Обидва препарати – фагову і чужерідну ДНК – об'єднують і додають ДНК-лігазу T4, а потім – пусті головки і уже зібрані відростки. Фрагменти ДНК завдовжки 50 т.п.н. упаковуються у головки, до них приєднуються відростки, у результаті чого утворюються інфекційні фагові частинки. Фрагменти більшого (>52 т.п.н.) чи меншого (<38 т.п.н.) розмірів упаковуватися не можуть. Рекомбінантний фаг λ може розмножуватися тільки у тих штаммах *E. coli*, які не забезпечують розмноження фага з інтактною

плазмідною. Для збереження рекомбінантного фага λ його періодично пересівають на свіжу культуру *E. coli* [5].

Для скринінгу бібліотек на основі фага λ використовують ДНК-зонди чи імунологічні методи. Зони лізису (бляшки) переносять на фільтр і відповідним чином тестують. Якщо використовується ДНК-гібридизація, то спочатку усувають фагові білки, потім ДНК денатурують і фіксують на фільтрі. При тестуванні імунологічним методом білки, які кодуєть клонованими генами, переносять і фіксують на фільтрі разом із бляшкою. Зіставивши плями на фільтрі, які дають позитивну реакцію, з бляшками на вихідній чашці, відбирають позитивні бляшки і проводять субкультивування. Субкультури слугують джерелом рекомбінантних бактеріофагів, які можна окремо культивувати в *E. coli* [3].

Вектори, що називають **космідами**, можуть вміщати до 40 т.п.н. чужерідної ДНК; вони активно ампліфікуються в клітинах *E. coli* як плазміди. Косміди поєднують у собі властивості плазмідних векторів і векторів на основі фага λ . Наприклад, широко використовувана плазміда *pLFR-5* (\approx 6 т.п.н.) має два *cos*-сайти фага λ , розділених сайтом рестрикції для *ScaI*, полілінкер із шістьма унікальними сайтами рестрикції (*HindIII*, *PstI*, *Sall*, *BamHI*, *SmaI* і *EcoRI*), точку початку реплікації ДНК (*ori*) і ген стійкості до тетрацикліну (*Tet^r*). Призначені для клонування фрагменти ДНК завдовжки до 40 т.п.н. очищають центрифугуванням в градієнті густини сахарози від продуктів часткового гідролізу донорної ДНК рестриктазою *BamHI*, а *pLFR-5* спочатку піддають гідролізу за допомогою *ScaI*, а потім *BamHI*. Препарати ДНК змішують і лігують. Ті продукти лігування, які містять вставку завдовжки 40 т.п.н. та мають сумарний розмір, близький до 50 т.п.н., можуть упаковуватися *in vitro* в головки фага λ . Реасоційовані молекули *pLFR-5*, що не містять вставок, упаковуватися у головки не будуть через невідповідність генетично детермінованим розмірам. Після збирання фагових частинок, ними інфікують клітини *E. coli*.

Потрапивши в бактерійну клітину, лінійна молекула *pLFR-5* зі вставкою замикається в кільце завдяки спарюванню *cos*-сайтів. У такій стабільній конфігурації вона може довгий час існувати в клітині автономно і реплікуватися як гібридна плазміда, оскільки містить усі необхідні для цього елементи. Більше того, ген стійкості до тетрацикліну забезпечує ріст колоній, які містять дану косміду, на

середовищі з антибіотиком, а нетрансформовані клітини при цьому гинуть. Існують також інші космідні вектори на основі фага λ .

Косміди мають велику перевагу порівняно з плазмідами: у них можна вбудовувати довші фрагменти ДНК, а це означає, що для створення геномної бібліотеки потрібно менше число клонів і потрібно менше часу на їх скринінг.

Векторні системи, що здатні інтегрувати великі вставки (>100 т.п.н.), мають особливу цінність у аналізі складних еукаріотичних геномів. Вони застосовуються, наприклад, у картуванні геному людини чи у ідентифікації окремих генів. На відміну від бібліотек із невеликими вставками (**клонотек**), у геномній бібліотеці (**генотеки**) з великими вставками, ймовірніше, буде представлений увесь генетичний матеріал організму. У цьому випадку, зменшується кількість клонів, які потрібно підтримувати, і збільшується можливість того, що кожний із генів буде присутнім у “своєму” клоні. Для клонування фрагментів ДНК розміром від 100 до 300 т.п.н. був сконструйований низькокопійний плазмідний вектор на основі бактеріофага P1 – химерна конструкція, що називається штучною хромосою на основі фага P1. Був сконструйований також дуже стабільний вектор, здатний інтегрувати вставки довжиною від 150 до 300 т.п.н., на основі F-плазміди (F-фактора, чи фактора фертильності) *E. coli*, яка представлена в клітині однією чи двома копіями, із селекційною системою *lacZ'* векторів *pUC*. Ця конструкція називається бактерійною штучною хромосою (BAC, від англ. *Bacterial artificial chromosomes*) [5].

Прокаріотичні системи експресії успішно використовуються для синтезу багатьох гетерологічних білків. Однак для отримання функціонально активних еукаріотичних білків потрібні спеціальні ензиматичні системи, які відсутні у прокаріот. Зауважено, еукаріотичні білки зазнають специфічних посттрансляційних модифікацій – глікозилування, фосфорилування чи ацетилювання та інших для набуття біологічно активної форми. Тому було розроблено нову стратегію у клонуванні генів за допомогою спеціально сконструйованих еукаріотичних експресибельних векторів. Для цього було використано дріжджі *S. cerevisiae*, геном яких добре вивчений, і, до того ж, є розроблена промислова технологія їх культивування у біореакторах. Щоб спростити очистку білків, були сконструйовані вектори, що забезпечують їхню секрецію клітинами *S. cerevisiae*, у результаті чого було отримано багато різноманітних **аутентичних**

білків. Однак чимало рекомбінантних білків у цій системі не зазнавали посттрансляційних модифікацій, і до того ж їх вихід був невисокий. Водночас, було розроблено інші дріжджові системи для синтезу рекомбінантних білків, зокрема на основі **бакуловіруса** *AcMNPV*, який інфікує клітини багатьох комах. У результаті трансфекції клітин комах транспозибельним вектором з клонованим геном, який є фланкований *AcMNPV*-специфічними послідовностями, відбувається подвійний кросинговер між вектором і геном *AcMNPV*. Результатом інтеграції клонованого гена є його вбудовування в ген *AcMNPV* і потрапляння під контроль сильного промотора, що функціонує на останніх стадіях літичного циклу. Клітини комах, інфіковані рекомбінантним бакуловірусом, синтезують гетерологічний білок [2].

На основі бакуловірусів розроблена більш досконала система експресії – **бакміда** – човниковий вектор *E. coli* / клітини-комахи, який уможлиблює виконання усіх генно-інженерних маніпуляцій у клітинах *E. coli*. Для цього клітини комах трансфікують рекомбінантною бакмідою тільки для отримання гетерологічного білка. За використання експресибельної системи отримують приблизно 95 % гетерологічних білків із відповідними посттрансляційними модифікаціями [4].

Позахромосомні експресибельні вектори ссавців здебільшого використовують для синтезу гетерологічних білків, які використовуються для науково-дослідницьких потреб, біомедицині, діагностиці. Вони є човниковими векторами із сайтами ініціації реплікації вірусу тварин і *E. coli*-плазміді. Регуляторні елементи транскрипції здебільшого походять від геному вірусу тварин чи ссавців. Для відбору трансфікованих клітин використовують доміантні селективні маркерні гени. Наприклад, деякі системи добору базуються на введенні у середовище зростаючої кількості цитотоксичної сполуки. Остання забезпечує добір клітин із великою кількістю копій вектора, що сприяє збільшенню синтезу гетерологічного білка [4].

Розроблено **системи експресії генів ссавців**, що дають можливість отримувати гетеродимерні білки. Для цього клітини трансфікують одразу двома векторами, кожен з яких містить ген однієї субодиниці. Альтернативний підхід полягає у використанні одного вектора, який містив ці два гени у вигляді окремих одиниць транскрипції, чи у вигляді одного транскриптона з обома генами [4].

Розроблені методи дають уможливлють конструювання трансгенних організмів, штамів, клітинних ліній, які володіють цінними властивостями, наприклад, отримано бактерійні штами, здатні синтезувати еукаріотичні білки терапевтичного, діагностичного та іншого призначення. Серед білкових продуктів, отриманих генно-інженерними методами, – гормони (інсулін, соматотропін, соматостатин тощо), інтерферони, антигени, антитіла, ензими [3].

Завдяки технології рекомбінантних ДНК стало можливим створювати нові біополімери, замінювати синтетичні продукти їх біологічними аналогами, модифікувати існуючі біополімери та покращувати їх фізичні і біологічні властивості, збільшувати ефективність деяких промислових процесів, зменшувати їх собівартість та багато іншого [1].

План заняття

1. Ознайомтеся із видами біологічних об'єктів, які використовуються для отримання рекомбінантних білків та дайте відповіді на запитання:

1.1. Які прокариотичні та еукаріотичні об'єкти використовуються у генетичній інженерії для отримання рекомбінантних білків?

1.2. Якими перевагами володіє *E. coli* як об'єкт молекулярного клонування чужерідних генів?

1.3. Які застосовуються методи введення рекомбінантних плазмід до клітин *E. coli*?

1.4. Які чинники визначили вибір *S. cerevisiae* як об'єкта молекулярного клонування генів?

1.5. Що таке селективні маркерні гени та для чого їх застосовують у молекулярному клонуванні?

2. Зарисуйте схему та охарактеризуйте основні етапи клонування гена інсуліну людини у клітинах *E. coli*. Опишіть стратегію скринінгу інсулін-продукуючих клонів.

3. Ознайомтеся з підходами для оптимізації експресії гетерологічних генів у прокариотичних системах, та дайте відповіді на запитання:

3.1. Як можна вплинути на експресію гетерологічних генів, що клоновані у клітинах *E. coli*?

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

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

3.4. У чому перевага локалізації гетерологічних білків на поверхні клітин-продуцентів? Які стратегії використовуються для того, щоб зробити рекомбінантні білки секреторними?

3.5. Послідовність-мішень може бути вбудована у ДНК клітини-господаря двома способами: сама собою, або у складі плазміди. Які переваги чи недоліки має інтеграція плазмідного вектора у ДНК клітини-господаря?

4. Ознайомтеся з методами отримання рекомбінантних білків за допомогою еукаріотиних систем та дайте відповіді на запитання:

4.1. Чому для отримання рекомбінантних білків лікувального призначення вважаються пріоритетнішими еукаріотичні, а не прокаріотичні системи?

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

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

4.3. Що таке бакуловіруси? бакміда?

4.6. Що таке афінна мітка? Вкажіть її призначення.

5. Заповніть пропуски у таких твердженнях:

5.1. Щоб з'ясувати, чи містить певний клон клітин цільовий ген, що кодує раніше охарактеризований білок, часто здійснюють _____. У ході цього клоновану ДНК використовують для відбору відповідної мРНК, продукт трансляції якої можна потім порівняти з відомим білком.

5.2. Новий гібридний ген, який кодує _____, можна синтезувати шляхом з'єднання частин кодуючих послідовностей двох різних генів.

5.3. У клітинах зародкової лінії _____ мишей, наявні хромосоми зі стабільними змінами, які є результатом інтеграції клонованої ДНК.

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

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

6. Виберіть правильну відповідь:

6.1. Вкажіть гени, які заміщуються клонованим фрагментом у ДНК фага λ під час конструювання фагмідного вектора:

- а) гени білків оболонки фага;
- б) гени реплікації фагової ДНК;
- в) гени інтеграції / ексциції фагової ДНК у бактерійний геном;
- г) гени лізису бактерійної клітини

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. На етапі скринінгу трансформантів використовується гібридизація як селективний метод для ідентифікації:

- а) міслоїдних клітин;
- б) антитіл;
- в) білків;
- 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 унеможливають синтез аутентичних еукаріотичних білків бактерійними клітинами:

- а) наявність хроматинових структур;
- б) наявність системи поліаденілювання мРНК;
- в) відсутність системи РНК-редагування;
- г) відсутність систем посттрансляційних модифікацій білків.

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. Божков А. І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.
2. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. С. 50–115. URL: https://library.udru.edu.ua/library_files/428513.pdf
3. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій. Київ : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. С. 13–81.
4. Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцяк В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.
5. Glik B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2010. P. 47–97. URL: <https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 4

Генетична інженерія мікроорганізмів

Мета: ознайомитись з основними методами генно-інженерного конструювання штамів мікроорганізмів – продуцентів біологічно активних речовин, а також методами їх селекції та скринінгу.

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 IV). 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, ензимів, 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 **генній інженерії мікроорганізмів** більша частина досліджень спрямована на скринінг продуцентів ензимів, вітамінів, антибіотиків, органічних кислот та інших корисних речовин. Відомо, що ензими, 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» ензимів, є обов'язковою.

З 70-х рр. минулого століття починається цілеспрямоване конструювання штамів продуцентів різних біологічно активних речовин з використанням методів генної інженерії. Перші штами-продуценти конструювалися на основі клітин *E. coli*. У 1977–1979 рр. на основі цих бактерій були сконструйовані штами продуценти соматостатину, інсуліну та гормону росту людини, щоспонукало 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 штами-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* та *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 V), що є основою **методу векторної трансформації клітин**. Для виявлення генетичної інформації цієї ДНК, її вносять у клітини шляхом векторної трансформації. Якщо гібридна плазмід, проникнувши у бактерійну клітину, буде

копіюватися, то разом з нею копіюватиметься й чужорідна ДНК. Потомство клітини, що містить гібридну ДНК, генетично однорідне, воно утворює клон. Відповідно, цей метод отримав назву **молекулярного клонування генів** (див. додаток VI). Він дає змогу вносити у клітини бактерій не тільки генетичну інформацію інших мікроорганізмів, а й вищих організмів, та отримувати 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 (такі, що не ревертують) мутацій у певному гені застосовують **метод інсерційного локалізованого мутагенезу**. Для цього ген клонують на плазміді і вбудовують у неї фрагмент ДНК, що кодує стійкість до антибіотика. Потім клітини трансформують сконструйованою гібридною плазмідною з зазначеним детермінантом, фланкований послідовностями, гомологічні 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 методика 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 заміні.

Традиційна схема сайт-специфічного мутагенезу:

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

Існує кілька типів олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу з використанням: 1) ДНК фага $\mu 13$, 2) плазмідної ДНК, 3) ПЛР-ампліфікації. Конструювання *in vitro* має на меті створення клітинних клонів, які містять рекомбінантні молекули ДНК із заданими властивостями.

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

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

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 повинен 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 $\mu 13$.

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

На другому місці після *E. coli* 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 і 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 екзоензимів (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 з них, не містить селективних маркерів і є генетично нестабільними. Однак деякі мультикопіювальні плазміди *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: рЕ194 (3,7 т.п.н.; Em^R), рТ127 (4,5 т.п.н.; Tc^R), рС 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 рBR322 і PUB110 сконструювали бірепліконний вектор рJJ10. Цей плазмідний вектор трансформує обидва типи клітин, однак експресія його генів нерівнозначна. Стійкість до канаміцину проявляється як в *E. coli* так і в *B. subtilis*. Гени Cm^r і Km^r бацилярних плазмід проявляються як в *E. coli*, так і в бацилах, тоді як ген Ap^r експресується тільки в клітинах природного господаря – *E. coli*. На жаль, ці вектори не відрізнялися функціональною і структурною нестабільністю, яка була пов'язана з тим, що використовувалися реплікатори, які не специфічні для *B. subtilis*.

Бірепліконний вектор рHP13 має усі ознаки сучасних векторів. З плазмід рUC9 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 рС194, взяті з плазмід рЕ194, забезпечують експресію в обох видах клітин. Число плазмідних копій у клітинах *B. subtilis* – 5, а в *E. coli* – приблизно 200.

На основі вектора рHP13 сконструйований **вектор прямої селекції рHP59**, 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 ДНК, що містить 10⁴ 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. spinosus*. 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 плазмиди, що містять селективні маркери стійкості до тиострептоніну 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) [2].

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 плазмиди 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 плазміди, що володіють широким колом господарів, наприклад, RK2 і RSF1010.

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

Плазміда RSF1010 є некон'югативною і має невеликий розмір 8,68 т.п.н. Вона є мультикопійна і містить маркери стійкості до стрептоміцину і сульфонамідів. Ця плазміда за допомогою кон'югативних плазмід може ефективно мобілюватися у багатьох видів бактерій, включаючи грамозитивні. На основі цих плазмід сконструйовані вектори серії ПКТ і ФРК, що дають змогу проводити клонування в сайтах *EcoR*I, *Sst*I, *Hind*III, *Bam*HI і ін. Ці вектори здатні реплікуватися у грамнегативних бактеріях *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida* і ін. [3].

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. [3].

До перспективних об'єктів генетичної інженерії належать фототрофні ціанобактерії, які асимілюють сонячну енергію, а тому є потенційно вигідними продуцентами будь-якого виду речовин. На основі застосування цих мікроорганізмів розвивається фотобіотехнологія, завданням якої є виробництво біомаси як джерела 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 ісільського господарства.

Застосування методів генетичної інженерії стосовно ціанобактерій відіграє важливу роль у розшифруванні фундаментальних проблем регуляції процесів азотфіксації і клітинної диференціації, які характерні для нитчастих форм ціанобактерій. Ці мікроорганізми є важливими об'єкти молекулярної генетики, про що

свідчить той факт, що сьогодні клоновано понад 30 різних генів ціанобактерій [3].

Останніми десятиліттями зростає зацікавленість дослідників дріжджами як об'єктами 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 клонованими індивідуальними генами дріжджів. Ці вектори інтегрують у хромосому шляхом гомологічної рекомбінації. Реплікативні вектори містять реплікон 2-мкм плазмід дріжджів, або реплікон 3-мкм плазмід, 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 [3].

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, глісер-альдегідфосфат-гідрогенази 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 -фактора, 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* [4].

Успіхи генної інженерії і генетики дріжджів створили реальну основу для втілення їх у 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 III).

План заняття

1. Ознайомтеся з промисловими штамми 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 штамма-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 штамма-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
<ul style="list-style-type: none"> • pBR325 • pUC18/19 • косміда • λ-вектор • штучна хромосома на основі фага P1 • бактерійна штучна хромосома 		

4. Ознайомтеся з методами скринінгуштамів 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 ензимів 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. Види мутагенезу, що застосовуються для конструювання штамів мікроорганізмів.
3. Ступінчаста селекція промислових штамів мікроорганізмів.
4. Методи селекції мутантів-надсинтетиків амінокислот.
5. Плазмиди і кон'югація у бактерій.
6. Косміди і фагміди. Переваги фагових векторів.
7. Фенотипова селекція клонів, що містять рекомбінантні ДНК.
8. Використання імунологічних методів у скринінгу клонів.
9. Використання ДНК-ДНК і ДНК-РНК гібридизації у скринінгу клонів.
10. Конструювання та скринінг геномних бібліотек.
11. Секреція генно-інженерних білків штами мікроорганізмів, їх стабільність і деградація.
12. Характеристика векторів на основі фага $\mu 13$.

Література

1. Божков А.І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.
2. Компанець Т.А. Віруси як векторні системи : курс лекцій Київ : В-во Фітосоціологічного центру, 2007. С. 13–81.
3. Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцjak В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.

4. Промислова мікробіологія: навч. посібник / Г.В. Яворська та ін. Львів, 2008. С. 21–38.
5. Glik B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2010. P. 195–288. URL: <https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5

Генетична інженерія культур клітин

Мета: ознайомитися з методами отримання соматичних клітин різних видів, їх селекцією та культивуванням, конструюванням генно-інженерних культурних клітин (тканин) для отримання цінних речовин, їх використанням у промисловій біотехнології, діагностиці та біомедицині.

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 [1].

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) [1].

Інтенсивному розвитку клітинної інженерії сприяла розробка *методу культур тканин* у 50-ті рр. ХХ 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. ХХ ст. З цього періоду почалося масове виробництво препаратів антитіл, які базуються на біотехнології клітин [2].

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 [3].

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 канадійських учених (Ернеста Мак Кулоха) та (Джеймса Тілла) у 1960 р. [4].

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 [4].

Стовбурові клітини мають такі основні властивості:

- **Самовідновлення** – здатність до численних клітинних поділів без ознак диференціації.

- **Потентність (потенціал)** – можливість диференціюватися у будь-який клітинний тип, тобто бути тотипотентними чи

плюрипотентними. Мульти- чи уніпотентні клітини можуть бути попередниками деяких клітинних ліній, тоді їх іноді називають стовбуровими клітинами.

Залежно від потенціалу розрізняють такі групи стовбурових клітин:

- **Тотипотентні** 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** клітини походять від тотипотентних клітин і можуть утворити клітини трьох зародкових шарів. Існують індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, які є особливим типом стовбурових клітин, отриманих штучно в лабораторних умовах зі зрілих диференційованих клітин організму ссавців, зокрема людини.

- **Мультипотентні** клітини виникають в області тільки одиничного зародкового шару. Ці клітини можуть розвиватися у всі типи клітин тільки в межах певного зародкового шару, з якого походять. Наприклад, у межах мезодерми можуть дати початок клітинам кісткового мозку, крові, або м'язів. Вони можуть утворювати лише близькі типи клітин (наприклад, гематопоетичні стовбурові клітини утворюють червоні кров'яні тільця, білі кров'яні тільця, тромбоцити тощо).

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

Оскільки стовбурові клітини можна культивувати та перепрограмувати з однієї на іншу спеціалізацію (наприклад, отримати м'язи чи нервову тканину), їх стали використовувати у біомедицині для лікування хворих.

Завдяки своїм властивостям до безмежного розвитку і плюрипотентності ембріональні стовбурові клітини є потенційним матеріалом для регенеративної медицини і заміщення тканин після ушкоджень чи хвороб (так звана **клітинна терапія**) [4].

Сьогодні в Україні дозволено проведення клінічних випробувань (Наказ МОЗ України № 630 «Про проведення клінічних випробувань стовбурових клітин», 2008 р.) із застосуванням стовбурових клітин для лікування таких патологій: 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 успішно проводять лікування пацієнтів із цими захворюваннями [5].

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, вирішують 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 (БАР). Останнє обумовлено здатністю диференційованих клітин, що спеціалізуються на виконанні певної функції до синтезу тих чи тих речовин. Зокрема, клітини ендокринних залоз синтезують та виділяють гормони, клітини кишкового епітелію – травні ензими, лімфоцити – антитіла, імунокомпетентні клітини – імунорегуляторні речовини, в тому числі інтерлейкіни, Т- і В-активіни, імуноглобуліни [5].

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 [1].

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** [5].

У селекції сільськогосподарських тварин із великим успіхом застосовують **метод трансплантації ембріонів** у поєднанні з **методом генетичних аналогів** – методи **ембріональної інженерії**. Використання такого комплексного підходу уможливорює покращити відтворювальний потенціал перспективних порід деяких видів тварин.

Використовуючи техніку маніпуляції з ембріонами, отримують **химери** (т. зв. 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 уможливорює отримання химерів, що мають трьох – чотирьох і більше батьків. Химери володіють ознаками тварин різних генотипів [4].

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 отримані між лініями лабораторних мишей агуті і не агуті – вони були крапчастими. Сьогодні існують внутрішньовидові і міжвидові химери не тільки лабораторних (мишей, хом'яків, пацюків), але й сільськогосподарських тварин (корів, кіз, овець). Вивчення химер дає змогу зрозуміти процес реалізації геному у становленні фенотипу тварин. Припускається, що удосконалення методів отримання химер може мати практичне втілення у практику тваринництва. Таким способом можна отримати тварини з вищою резистентністю до низки хвороб, та іншими ознаками, які зазвичай погано поєднуються під час схрещування в одному організмі [4].

Наприклад, було отримане чотирьох-батьківське химерне телятко у результаті введення кількох клітин зародка виду *Bos aurus* (звичайні домашні форми тварин) у зародок виду *Bos indicus* (зебувидні тварини). Крім свого прямого призначення – збільшення чисельності нащадків

від тварин із високою продуктивністю, техніка трансплантації ембріонів використовується як ефективний селекційний інструмент при акліматизації ввезених порід тварин та отриманні не тільки міжпородного, а й міжвидового потомства [5].

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 XIII) клонував більше півсотні жаб. Важливим досягненням у цьому напрямі було отримання **Я. Вільмутом** (Шотландія, 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 в **енуклейовані** яйцеклітини (позбавлені власного ядра). Отримані таким способом ембріони здатні до розвитку і перетворюються у дорослу особину [5].

План заняття

1. Ознайомтесь з основними методами, які використовуються у генетичній інженерії культур клітин та дайте відповіді на запитання:

- Що таке клітинні лінії?
- Які існують основні групи клітинних культур?
- Як отримують, розмножують і підтримують культури клітин?

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 клітинних культур рослин / тварин, заповніть таблицю:

Клітинна культура	Назва БАР	Функціональне призначення БАР

4. Виберіть правильну відповідь:

4.1. Тотипотентністю клітин називають...:

а) здатність клітин до фенотипових змін;
б) здатність клітин до реалізації повної генетичної програми розвитку;

в) здатність клітин синтезувати вторинні метаболіти.

4.2. Клонуванням організмів називають...:

а) внесення гену до клітини організму-донора;

б) імплантація генетично чужорідних ембріонів у матку сурогатних матерів;

в) розмноження генотипово однорідних особин.

4.3. 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.

4.4. 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*.

4.5. 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.

4.6. 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.

4.7. Трансплантацією називають...:

а) пересадку тканини, органів в організм реципієнтів;

б) імплантацію генетично чужорідних ембріонів у матку сурогатних матерів;

в) розмноження генотипово однорідних особин;

г) уведення гену до клітини організму-реципієнта.

4.8. Гібридами – це:

а) клітини, утворені злиттям В-лімфоциту і мієлоїдної клітини;

б) гібридні енуклеювані клітини з високою продуктивністю антитіл;

в) відбирають на середовищі з 8-азогуаніном;

г) відбирають на середовищі зі стрептоміцином;

д) продукують моноклональні антитіла.

4.9. 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.

4.10. Ознаки і властивості химерного організму нащадкам:

а) передаються;

б) частково передаються;

в) неповно передаються;

г) не передаються.

5. 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 внесенням 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 енуклеювану 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 ензимів, 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.І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.
2. Біотехнологія: підручник / Герасименко В.Г. та ін./ під заг. ред. В. Г. Герасименка. Київ: Інкос, 2006. С.137–193 .
3. Основи біотехнології: підручник / укладачі: В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. Львів: Тріада плюс, 2010.С. 101–173.
4. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. С. 50–115. URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf.
5. Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцяк В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 6

Генетична інженерія рослин

Мета: ознайомитися з методами генетичної інженерії, які застосовуються при конструюванні нових форм рослин, а також із 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 поєднуються ознаки, що наближають рослини до “ідеального сорту”. Важливими методами хромосомної інженерії також є отримання гаплоїдних і поліплоїдних рослин [1].

Метод гаплоїдів заснований на вирощуванні гаплоїдних рослин із подальшим подвоєнням хромосом. Наприклад, з пилкових 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 [2].

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 р., коли була отримана перша у 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 (ГМО) значно зріс, насамперед серед класу дводольних, хоча сьогодні вченими проводяться активно дослідження і з однодольними рослинами (пшеницею, рисом, кукурудзою, бананами) [2].

Уже виділено і детально охарактеризовано приблизно сотні різних структурних генів рослин. Методами молекулярної біології, головно через етап синтезу кДНК на інформаційній РНК, отримані копії генів, 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 [4].

Деякі методи генної інженерії детально розроблені і можуть бути застосовані на різних рослинних об'єктах, хоча й потребують доопрацювання у застосуванні до конкретних видів рослин. Серед методів генної інженерії рослин виділяють **методи векторної трансформації і фізичного переносу ДНК** [1].

Методи векторної трансформації включають коінтегративну та бінарну векторні системи, які базуються на використанні *Ti*-плазмиди ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (див. додаток V). Агробактерії мають здатність інтегрувати свій генетичний матеріал у клітини дводольних рослин завдяки наявним у них великих (≈ 200 тис пар основ) *Ti*-плазмід (*tumor inducing*). Останнімістять так звану *T*-ДНК – ділянку, здатну інтегрувати в ядерний геном рослинної клітини. У складі *T*-ДНК є гени фітогормонів, продукти експресії яких індукують у трансформованих рослинах утворення пухлин – **корончастих галів**. Гени, що відповідають за перенесення та інтеграцію *T*-ДНК у геном рослин (***vir*-гени**), містяться в іншій ділянці *Ti*-плазмиди. Трансгенні рослини отримують методом, у якому використовують модифіковану *T*-ДНК (її 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 вводять 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 [1].

Методи фізичного переносу ДНК (безвекторні системи) дають можливість прямого (безвекторного) перенесення чужорідної ДНК у будь-які рослинні клітини або протопласти (клітини, у яких відсутня клітинна стінка). У безвекторному перенесенні використовують методи електропорації, мікроін'єкції та біолістичний метод. **Мікроін'єкцію** проводять під мікроскопом за допомогою скляної голки, уводячи нею ДНК у ядро клітини. Бомбардування клітин (**біолістика**) – інший ефективний метод уведення ДНК у рослинну клітину. При цьому золоті або вольфрамові сферичні кульки діаметром 0,4–1,2 мкм покривають шаром ДНК, співсадженом з кальцій хлоридом (CaCl_2), спермідіном або поліетиленгліколем, і вистрілюють кульками у суспензію клітин зі спеціальної “рушниці”. Кульки пробивають клітинну стінку, завдяки чому ДНК потрапляє всередину клітини та з певною імовірністю інтегрується в геномну ДНК. Пряме введення ДНК у протопласти рослин можна здійснювати й за допомогою **ліпосом** – сферичних частинок, мембрани яких містять фосфоліпіди. Частинки обволікають трансформуючу ДНК, тим самим захищаючи її від нуклеаз. За допомогою ліпосом у протопласти рослин вдається ввести ДНК Ті-плазмід, а також цілі хромосоми [1].

Досягнення генетичної інженерії застосовуються насамперед у трьох практичних напрямках: реакція на гербіциди, стійкість до шкідників і хвороб, якість продукції. У подальшому, планується поліпшити симбіотичну фіксацію азоту бобовими і небобовими культурами, підвищити ефективність фотосинтезу і стійкість до стресових чинників середовища. Зокрема, 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 ензими, що знищують гербіцид; третій – у ампліфікації генів, які визначають продукт, на який діє гербіцид [3].

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, або увесь час).
3. Створення сортів с/г культур, токсичних для деяких видів шкідників (наприклад, отримано сорти картоплі, листя яких є дуже 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, що синтезує лактоферрин людини) [4].

Досягнуто деякий прогрес у конструюванні сортів низки культур, які стійкі до деяких груп гербіцидів: триазину і його похідних (пригнічують фотосинтез); сульфонал сечовини, гліфосатів, імідозолінонів (пригнічують амінокислотний метаболізм). В інституті Вейсмана (Ізраїль) шляхом соматичної гібридизації із стійким дотриазину біотипом пасльону чорного отримали триазинстійкий гібрид картоплі сорту *Mirka* [5].

Донором стійкості до II групи гербіцидів слугують як мутантні бур'яни, 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 ензимів (EPSPS) біосинтезу ароматичних амінокислот. Зміна структури ензиму EPSPS без зміни його функції забезпечила стійкість цих рослин до гліфосфату, так 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 р. секвеновано перший геном рослини *Arabidopsis thaliana*, у 2005 р. – геном рису *Oryza sativa* (430 Mb). У 2010 р. опубліковано 19 не повністю секвенованих геномів рослин, з них 13 – сільськогосподарського призначення. Секвенований геном *A. thaliana* уможливив: перенесення та експресію генів *CRT binding factors* (CBFs) з *Arabidopsis* в томатах (*Solanum lycopersicum*), полуницях (*Fragaria sp.*), рисі і пшениці, що підвищило їхню морозостійкість, а також поліпшило стійкість до засолення та посухи;

рецептор елонгаційного фактора *Tu(EFR) Arabidopsis* був експресований у томатах та тютюні (*Nicotiana tabacum*) – це підвищило їхню стійкість до широкого спектру захворювань; Nelsonetal досягли посухостійкості у кукурудзи після трансформації її клітин ортологом кукурудзи (*ZmNF-YB2*) транскрипційним фактором *Arabidopsis AtNF-YB1*, який був виявлений у процесі скринінгу геному на можливі гени посухостійкості [2].

Поряд із значними досягненнями і перспективами є низка труднощів: розмір та динамічна структура рослинних геномів додає проблем або ще більше ускладнює ті, що 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 унеможлиблює вирізнення алельних варіантів між близькоспорідними видами. Зокрема, описано високий рівень нуклеотидної різноманітності для рису. Для порівняння, геном людини і рису приблизно однакового розміру, але 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 *Shotgun*-секвенування неефективним. *Shotgun*-секвенування може забезпечити секвенування чотирьох геномів *Drosophila melanogaster*, а також секвенування геному пшениці [7].

Генетична інженерія має неабияке значення у конструюванні сільськогосподарських культур, які здатні захищати себе від комах-шкідників. У 1985 р. спеціалісти фірми PGS (США) 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 рр. 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, деяких овочевих. Ведуться дослідження щодо переносу у

рослини генів різних захисних білків, а також токсичних для патогенів із інших організмів (рослин, бактерій, грибів і комах) [5].

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 [7].

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 культурах, особливо у злаків [7].

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, ріпаку 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 складних та вартісних досліджень стосовно 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. [6].

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*-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*. Механізми переносу T-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 сайленсингу.

7. Характеристика світового ринку трансгенних рослин.

8. Виберіть правильну відповідь:

8.1. Вкажіть правильне застосування *Ti*-плазмід:

а) клонування ДНК за допомогою T-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 ферменти:

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 внесення 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*-плазмідом, 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 є активним у коренях рослини?

9.3. Сконструйовано трансгенні рослини тютюну. Як вектор використали *Ti*-плазмід, 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 I 50 % були стійкими до канаміцину, 50 % чутливими до нього. Натомість 75 % нащадків трансгенної рослини II 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, хвороб.

6. Бінарна та векторна система на основі *Ti*-плазмід *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 продуктів, що містять ГМО.

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

Література

1. Божков А.І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.

2. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин : підручник. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.

3. Основи біотехнології / укладачі: В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. Львів : Тріада плюс, 2010. С. 101–173.

4. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. С. 50–115. URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf.

5. Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцяк В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.

6. Буценко Л.М., Пирог Т. П. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник. Київ : Вид- Ліра-К, 2018. с. 120–139.

7. Glik B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2010. P. 725–843. URL: <https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 7

Генетична інженерія тварин

Мета: ознайомитися з деякими генно-інжерними методами, які застосовуються у конструюванні нових форм тварин, а також різноманітністю та застосуванням трансгенних тварин.

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 [1].

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* [1].

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 [1].

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 [1].

Друга стратегія – *таргетинг генів*. За цієї стратегії трансгенна послідовність заміщує гомологічну ділянку в геномі. Ця стратегія дає змогу елімінувати 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. Останні здатні розвиватися у клітини будь-якого типу, в тому числі і 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 зародки на ранніх стадіях розвитку. Дорослі особини, які виростили з них, схрещують із нормальними мишами. Отримане потомство є химерним, оскільки організм має певні тканини від оригінальних, нетрансгенних особин, а деякі від трансгенних ембріонально-клітинних ліній. Химерні миші далі схрещують з їх сибсами для отримання гомозиготного потомства з нокаутованою (*knock-out*), 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 [2].

За “відкриття принципів уведення специфічних генних модифікацій в організм мишей за допомогою ембріональних стовбурових клітин” Маріо Каппеккі, Мартін Аванс, Олівер Смітіс 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. М. Капеккі і О. Смітіс показали можливість гомологічної рекомбінації за участю штучно синтезованих фрагментів ДНК, що мають певну послідовність нуклеотидів та відповідають ділянці цільового гена. За допомогою методу нокауту гена можна дослідити роль кожного конкретного гена у розвитку організму за його нормального та патологічного функціонування, а також вивчати різні захворювання людини, використовуючи його для моделювання захворювань людини на тваринних об'єктах [2].

Для *C. elegans* – рекДНК ін'єктується 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 [2].

Загальна схема отримання **трансгенних ссавців** розроблена добре. 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 [3].

Для тварин встановлено, що рекомбінантні молекули ДНК у лінійній формі інтегрують у ДНК реципієнта у кілька разів краще, ніж кільцеві. Вбудовування векторної 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 послідовності з “липкими кінцями”. 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 [3].

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 [3].

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 37° С у повітрі з 5 % CO₂.

Для трансплантації ембріонів використовують псевдовагітних самок (тих, що спарені зі стерильними (вазектомованими) 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 [41].

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 виявилась експресія внесених генів. З’ясувалось, що тільки чотири

промотори із багатьох досліджених, здатні активувати приєднані до них гени. Тому обов'язковим є етап перевірки експресії трансгена за його фенотиповим проявом. Фенотиповий аналіз трансгенного потомства є дуже важливим, оскільки трансген, що є присутній в геномі трансгенної тварини може з певних причин не виявлятися фенотипово (**явище “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 % потомкам.

Іншим способом отримання трансгенних тварин є **використання ретровірусів**. За їх використання як переносників транс генів здійснюють наступні маніпуляції: 1) ранні морули позбавляють оболонки; 2) піддають короткочасному впливу інфекційного вірусу, в геном якого попередньо вбудовано трансген; 3) морула трансплантується псевдовагітним самицям. Трансгенні тварини, отримані із застосування ретровірусів завжди є мозаїчними з одним сайтом інтеграції, оскільки інфікування відбувається на стадії 8 – 16 клітин. Використання ретровірусів є дуже зручним, коли необхідно здійснити перенесення генів у клітини дорослого організму, наприклад, в клітини крові для усунення генетичних дефектів. Перспективним є використання ретровірусів як векторів для вбудовування трансгенів у клітини зародкового шляху та стовбурові клітини ссавців і людини, які здатні після низки мітотичних поділів заміщувати загиблі клітини багатоклітинного організму [5].

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 ніжокта 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 чималу кількість трансгенних птахів, риб тощо [5].

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'єкції 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. Антизмістовні 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;
- 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 мікроінєкцій 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 вольфрамівих чи золотих кульок;
- г) використання гібридного цільового вектора (*targetingvector*).

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 *Drosophilamelanogaster*.

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. І. Біотехнологія. Фундаментальні та промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. С. 193–210.
2. Основи біотехнології / укладачі: В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. Львів : Тріада плюс, 2010. С. 101–173.
3. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. С. 50–115. URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf.
4. Кравців Р. Й., Колотницький А. Г., Буцяк В. І. Генетична інженерія. Львів, 2008. С. 64–153. URL: <http://surl.li/kwcoe>.
5. Glik B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2010. P. 845–939. URL: <https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 8

Молекулярна генетика людини. Генотерапія

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

Теоретичні відомості

Останніми роками на межі 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 [1].

Сьогодні активні дослідження у молекулярній генетиці людини пов'язані, перш за все, з секвенуванням геному людини, яке проводилось 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 її типування, 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 [1].

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 хвороб. 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 [2].

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 й пов’язані з іншими генами.

Порівняльна геноміка вивчає схожість та відмінності в організації генів та 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 для розробки ефективних методів

діагностики, лікування та профілактики спадкових і 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 тривалий час вважалися “мовчазними”. Сьогодні накопичується все більше відомостей про їхній вплив на експресію генів [3].

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 виділити кілька етапів [3].

I (1900–1940 рр.). На цьому етапі вивчаються менделівські ознаки людини. Основний метод – 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 рр. 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 процес розшифрування в геномі людини нових груп зчеплень генів. Останніми роками 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 для 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, її зберігання та оперативного використання дослідниками різних країн [4].

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 (незбігання даних різних дослідників), сумнівна (не уточнені остаточно дані однієї лабораторії).

Велике значення для картування генів людини мала 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 [4].

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 [5].

Значної популярності у молекулярній генетиці людини для картування генів набули методи генних зондів, ПЛР та геномна дактилоскопія [1].

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 (блотингу) 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 блотинг (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 [5].

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 як маркер, 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 у молекулярній генетиці розроблений принципово новий метод вивчення організації хромосом на молекулярному рівні – **метод флюоресцентної гібридизації in situ (FISH)** [3].

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

Генна терапія – сукупність генно-інженерних (біотехнологічних) та біомедичних 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 генних захворювань, у тому числі й інфекційних [2].

Найбільш ефективний спосіб виявлення мутацій у гені – секвенування кДНК або окремих екзонів. Для генів, що мають порівняно невеликі розміри (наприклад, мутантний ген фактора згортання крові IX детермінує гемофілію В), метод прямого секвенування використовують як основний метод сканування мутацій. Однак, незважаючи на наявність різних методик (модифіковані ПЛР, використання мРНК для отримання кДНК), секвенування відносять 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 ідентифіковані тільки шляхом прямого секвенування. Методом ПЛР та подальшим електрофоретичним аналізом продуктів ампліфікації у поліакриламідному або агарозному гелі виявляють мутації, які змінюють довжину ампліфікованих фрагментів. До таких мутацій належать делеції та інсерції [2].

Стандартна схема генокорекції спадкового дефекту включає серію послідовних етапів. Вона розпочинається з отримання генетичної конструкції, що містить змістовну (кодує білок) і регуляторну частину гена. На наступному етапі добирають вектор, що забезпечує ефективну, а за можливості, й адресну доставку гена у клітини-мішені. Потім здійснюють **трансфекцію** (перенесення отриманої конструкції) в клітини-мішені та оцінку її ефективності, у подальшому – оцінюють ступінь коригування первинного біохімічного дефекту в умовах клітинних культур (*in vivo*) і, що особливо важливо, в природних умовах на тваринах – біологічних моделях. Тільки після цього починають клінічні випробування.

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 [4].

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, очікуючи, що вона 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 [3].

Розроблено два методи генотерапії – *ex vivo* та *in vivo* (див. додаток XIV). За генної терапії *ex vivo*, клітини вилучаються з організму пацієнта, генетично модифікуються, а потім вводяться в його організм. 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. Основним недоліком сучасної генної терапії є нетривалість ефекту - від 6 до 18 місяців. Це пов'язано з елімінацією модифікованих клітин. Кардинальним вирішенням проблеми було б впровадження терапевтичного гена в статеві клітини, однак на таку технологію продовжує діяти мораторій. Хорошою альтернативою цьому є метод *генної терапії in vivo*, коли корекція генів здійснюється безпосередньо в організмі пацієнта. Для здійснення такої процедури, генетична інформація вноситься безпосередньо в клітину за допомогою векторів, якими слугують віруси. Серед них, адено- та ретровіруси.

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 дослідках на тваринних моделях розробляються підходи до такого лікування. Методи генної терапії дають змогу лікувати деякі генетичні патології і в період внутрішньоутробного розвитку.

На даний момент наявні численні розробки у цій галузі. Зокрема, компанією *Bluebird Bio* у березні 2017 року оголошено про успішне лікування пацієнта із серповидноклітинною анемією шляхом заміни дефектних генів у стовбурових клітинах кісткового мозку. Ремісія станом на 2017 р. становила 2 роки. У 2016 р. Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США (*Food and Drug Administration, FDA*) схвалило 2 нових препарати для лікування рідкісних форм раку. Тривають клінічні дослідження генотерапевтичного препарату Валрокс. Його прийом забезпечує зниження випадків кровотеч у хворих на гемофілію А.

Генна терапія успішно застосовується для лікування не тільки спадкових, але й інших, доволі поширених захворювань (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 [2].

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 *insitu*.
 - метод *QTL (Quantitative Trait Loci)*, чи картування ЛКО (локусів кількісних ознак);
 - аналіз асоціацій. Метод гена-кандидата;
 - “прогулка” по хромосомі (*chromosomewalking*) і “стрибки” по хромосомі (*chromosomejumping*).
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-типуння);
 - 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 *X* зумовлює певне спадкове захворювання. Ця зміна призводить до втрати *EcoRI*-сайту, 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 гетерозиготним за іншою мутацією гена *X*. 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. Характеристика наукових напрямків у геноміці.

8. Протеоміка. Наукові дослідження у протеоміці.

9. Біоінформатика як наука про аналіз молекулярно-біологічних даних.

10. Характеристика геномних баз даних. Пошук та аналіз інформації про нуклеотидні послідовності генів людини.

Література

1. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. С. 165–190. URL: https://library.udru.edu.ua/library_files/428513.pdf.

2. Молекулярна генетика та технології дослідження генома: навч.посібник/ М.І.Гиль та інш. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС., 2015. С. 238–268. URL:<http://surl.li/kwbwj>.

3. Помогайбо В. М., Петрушов А.В. Генетика людини: навч.посібник. Київ : Видав. центр Академія.С.67–64. URL:<http://surl.li/ozoxh>.

4. Glik B. R., Pasternak J. J. Molecular biotechnology. Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2003. P. 33–497. URL:<https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>.

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, фіцин:

- 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. Генотипу дактилоскопію (ДНК-типуювання) 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. Оберіть, 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 Таq-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 ускладі плазмідного вектора:

- а) з метою підвищення життєздатності трансформованих бактерій;
- б) для ідентифікації трансформованих бактерій;
- в) для підсилення ефективності трансформації;
- г) для підвищення стабільності плазміди; д) плазміда.

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) клітинисавців.

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) фосфіттриєфірного; 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 фосфодіефірного зв'язку всередині ланцюга;

д) руйнування одониткових петель та одониткових ділянок навпроти прогалин.

36. Як за допомогою генно-інженерних методів модифікувати *Zymomonas 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 плазмиди 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 плазмиди 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 ензими; 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 ензими 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 Карбону 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 Карбону 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*-плазміда *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-последовності, а до розщепленого вектора – полі-Т-последовності 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 атомах Карбону вуглеводневого кільця. З їх допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК методом Сенджера;

46) підвищити синтез триптофану *S. glutamicum* можна шляхом блокування утворення амінокислот одного метаболічного шляху;

47) створити такий штам *Pseudomonas* можна шляхом гібридизації вихідних штамів, які несуть різні плазмід;

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 “розброєну” *Ti*-плазмиду проводять у *E. coli*, після чого їх уводять до клітини *A. tumefaciens*; коінтегративна векторна система характеризується тим, що векторна ДНК рекомбінує у клітинах *A. tumefaciens* із “розброєною” *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 одноланцюговий 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 пришвидшує транскрипцію; використовується також назва “активаторний білок”.

Алостерична регуляція (Allosteric regulation) – регуляція активності ензиму ефекторною молекулою завдяки зв'язуванню з відповідною ділянкою, віддаленою від активного центру.

Альтернативний сплайсинг (Alternative splicing) – молекулярно-генетичне явище, яке полягає у з'єднанні екзонів однієї і тієї ж РНК у 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 $3' \rightarrow 5'$) комплементарних ланцюгів у 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 кристаликів 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 й розвитку.

Бакміда (Bacmid) – човниковий вектор на основі геному AcMNPV, що здатний існувати у клітинах *E. coli* і клітинах комах. Геном AcMNPV (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) – це геном вірусу, який інфікує гусениць

метелика *Autographa californica*. Цей вірус використовується в молекулярній біотехнології для виробництва рекомбінантних білків та вакцин.

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

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 (Biotinlabeling) – 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 (Pribnowbox) – послідовність нуклеотидів у прокариот, розташована за 10 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції. Зазвичай складається з 6 нуклеотидів: ТАТААТ.

Бокс Хогнесса (Hognessbox) – 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 гель-електрофорезу, на тверду поверхню.

“Відбиток пальців” (DNA fingerprint) – набір рестрикційних фрагментів ДНК, характерний для певного індивідуума. Для отримання “відбитка” використовують або гель-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 відмінні нуклеотиди.

vir-Гени (virGenes) – група генів Ті-плазмід, 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 локуси у геномі 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 індивідумів за характеристикою профілів їх ДНК. Профіль ДНК – це невеликий набір варіантів ДНК, який, ймовірно, може відрізнитися у всіх не споріднених осіб, і водночас, є унікальний для окремих осіб, як і відбитки пальців (звідси альтернативна назва методу).

Ген-кандидатт (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 уведення антигена, шляхом включення до клітини гена, що кодує білок-антиген.

Генна терапія *ex vivo* (Ex vivo gene therapy) – уведення гена (чи групи генів) до ізольованих клітин хворого. Після культивування і трансформації клітини вводять в організм хворого способом 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 специфічної мРНК.

Генна терапія з використанням клітин зародкової лінії (Germ line gene therapy) – уведення 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) – сукупність експериментальних процедур введення гена (чи групи генів) безпосередньо у клітини тканини або органу задля усунення генетичного дефекту.

Генна терапія соматичних клітин (Somatic cell gone therapy) – уведення 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 складають індивідуальний (груповий, видовий) геном. За наявності великого геному (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 кількох 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 вуглеводневого 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) – ензим, 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 атомах карбону вуглеводневого кільця.

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

ДНК-лігаза (DNA-lygase) – ензим, 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) – ензим, що каталізує синтез полінуклеотидного ланцюга із використанням РНК-затравки з вільною 3'-ОН-групою та іншого комплементарного ДНК-ланцюга як матриці.

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 мембранах клітин під дією електричного струму. Через ці пори до клітин проникає чужерідна ДНК.

Ендонуклеаза (Endonuclease) – ензим, 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) – уведення 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.

Зворотна 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-зонду.

Інгібування кінцевим продуктом (End-product inhibition) – інгібування ензиму 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) – спеціально сконструйований вектор, який використовується для вбудовування (інтеграції) клонованої ДНК у геном клітини-господаря.

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

Кандидатне картування (Candidate gene 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 пересівів.

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 у запліднене яйце з видаленим пронуклеусом.

Клонування генів (Gene cloning) – сукупість методів, що використовуються для отримання клонованих ДНК: виділення потрібного гена з якого-небудь організму, вбудовування його у плазмиду (вектор), уведення 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 з 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) – явище відновлення фенотипу дикого типу (чи близького до нього фенотипу) при об'єднанні в одній клітині двох ДНК з рецесивними мутаціями, що перебувають у транс-конфігурації.

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

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

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

Контрансфекція (Contransfection) – уведення 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 у конформації одноланцюгових ДНК, що різняться лише одним нуклеотидом. Аналізовані ДНК піддають денатурації. Денатуровані ланцюги набувають різної конформації і у гель-електрофорезі мігрують з різною швидкістю.

Кон'югативні плазмиди (Conjugative plasmids) – плазмиди, які здатні передаватися від клітини до клітини 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, яке викликається бактеріями роду *Agrobacterium*.

Косегрегація (Cosegregation) – генетичне явище, за якого дві ознаки успадковуються сумісно, оскільки їхні гени кросинговером не розщеплюються.

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

Косупресія (Cosuppression) – пригнічення експресії специфічного рослинного гена у результаті трансформації рослини додатковою копією цього гена.

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

Ксенобіотик (Xenobiotte) – сполука синтетичного чи природного походження, яка є чужерідною для клітини, організму чи популяції, якщо вона ними не синтезується.

Культура (Culture) – популяція клітин рослин, тварини чи мікроорганізмів, які вирощуються 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 ензиму ДНК-лігази, який каталізує утворення фосфодієфірних зв'язків.

Лігування олігонуклеотидних зондів, ЛОЗ (Oligonucleotide ligation assay) – метод виявлення одонуклеотидних 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 конструювання рекомбінантних молекул; до тупих кінців молекул ДНК приєднують лінкер, потім їх обробляють рестриктазою, а, згодом, лігазою.

Липкі кінці (Cohesive ends) – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, що виступають на кінцях

дволанцюгової молекули; утворюються у 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, ензиматична 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 геному і експресії чужорідної ДНК.

Метод відбитків (реплік) (Replica plating) – спосіб перенесення колоній мікроорганізмів з однієї чашки Петрі на іншу оксамитовою “печаткою” з повним збереженням взаємного розташування колоній.

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

Мікроін’єкція (Microinjection) – уведення ДНК або інших молекул тонкою голкою в ізольовану еукаріотичну клітину.

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) – фізичної чи хімічної природи речовина, наприклад, радіоактивний ізотоп чи ліганд, який ідентифікується біохімічними або імунологічними методами (наприклад, флуорофор) та зв’язується з макромолекулою. Дає змогу знайти мічену речовину у досліджуваному зразку.

Мішень (Target) – у широкому значенні – цільовий біологічний об’єкт (тканина, молекула, ген, клітина, мікроорганізм).

Молекулярна діагностика (Molecular diagnostic) – це наука, яка розробляє методи та способи аналізу генетичного матеріалу, уможлиблює діагностику спадкових та інфекційних захворювань, індивідуалізоване лікування та передбачення перебігу патологічного процесу.

Моноклональні антитіла (Monoclonal antibodies) – однотипні антитіла, специфічні стосовно одного епітопу (антигенної детермінанти). Синтезуються гібридомами – клітинними гібридами, одержаними при злитті нормальних антитілоутворювальних В-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 певних локусів на хромосомах певного організму.

Негативна регуляція (Negative control) – вид генетичної регуляції, у ході якої транскрипція гена пригнічується регуляторним білком (репресором); відповідно, під час інактивації білка-регулятора структурні гени залишаються в активному стані.

Неметаболізуючі індуктори (Gratuitous inducers) – речовини, що індукують синтез індукцибельних ензимів, але не слугують їхніми субстратами.

Нозерн-блоттинг (Nothern blotting) – перенесення електрофоретично розділених молекул РНК з гелю на тверду поверхню (нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) з наступною ДНК-РНК-гібридизацією.

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

Нуклеаза S1 (S1 nuclease) – ензим, 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, що містить однакову нуклеотидну послідовність у обох

ланцюгах при зчитуванні їх від 5'- до 3'-кінця. Такі ділянки часто розпізнаються ендонуклеазами рестрикції II типу.

Параспоральний кристал (Parasporal crystal) – тісно упаковані молекули токсину *Bacillus thuringiensis*, щосинтезуються даною бактерією під час спорогенезу.

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

Первинна культура (Primary culture) – культура клітин чи тканин, відібрані безпосередньо з певного організму.

Періодична ферментація (Batch fermentation) – культивування мікроорганізмів упродовж певного часу (одна – кілька діб, кілька годин). Свіже середовище інокуюють посівним матеріалом і здійснюють 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 часу з періодичним внесенням субстрату і збором продукту тільки після завершення процесу.

Перше антитіло (Primary antibody) – антитіло, щозв'язується з молекулою-мішенню при здійсненні імунологічного аналізу (наприклад, у методі 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 допомагає виконувати функції іншій плазміді в тій самій клітині. Деякі плазміди-помічники допомагають перенесенню некон'югативних плазмід із клітини-донора до клітини-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 (Yac-векторів).

Плазмідна несумісність (Plasmid incompatibility) – механізм генетичної регуляції кількості копій плазмід одного типу у бактерійній клітині. Забезпечує неможливість внутрішньоклітинного співіснування плазмід, які належать до однієї 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*, а пізніше – у інших бактерій (40%) і архей. Набір спейсерів, який є унікальним для кожного штаму бактерій. Спейсери відповідають ділянкам геномів різних вірусів. Тому вважається, що CRISPR-система, що містить Cas–CRISPR асоційовані гени, є адаптивним імунітетом прокаріот.

Позитивна регуляція (Positive control) – вид генетичної регуляції, за якої регуляторний ген транскрибується тільки за наявності білка-активатора.

Позитивний відбір (Positive selection) – відбір клітин за певним геном-маркером, 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 хвороби за відсутності даних про продукт цього гена і будь-яких генів-кандидатів. Спочатку визначають хромосому локалізацію (позицію) гена. Далі отримують геномні клони, які охоплюють картований сайт (використовуючи відповідні маркери), ідентифікують і аналізують наявні в них екзони. Використовуючи цілу 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 хвороби, коли дані про продукт цього гена є відсутні, але він картований у тій самій хромосомній ділянці, де вже є ідентифіковані гени та EST. Спочатку аналізують сучасні генетичні і транскрипційні карти, аби виявити кодуєчі послідовності (гени, внутрішньогенні EST), які містяться у цьому районі, потім аналізом мутацій або будь-якими іншими методами виявляють екзони, пов’язані з цим захворюванням.

Поліаденілювання (Polyadenylation) – ензиматичне 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 до кількох інфекційних агентів чи різних епітопів однієї молекули.

Полілінкер (Polylinker) – коротка ділянка ДНК, яка містить декілька унікальних сайтів рестрикції; сайти слугують місцями інтеграції чужорідної ДНК (під час молекулярного клонування).

Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР (Polimerase chain reaction) – метод ампліфікації специфічного сегмента ДНК термостабільною ДНК-полімеразою з використанням олігонуклеотидних ДНК-зондів, що комплементарні послідовностям протилежним ланцюгам ДНК, які фланкують ампліфікуючий сегмент. Процес складається із 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, які зустрічаються у великій популяції з частотою не менше 1 %. STRP-локуси виявляють гел-електрофорезом 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 трапляється з частотою не менш 1 %.

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

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

Посттрансляційні модифікації (Posttranslational modifications) – посттрансляційні зміни поліпептидних молекул після завершення їх синтезу рибосомами. До таких модифікацій належать: фосфорилування, гліколізування, окислення цистеїну, відщеплення сигнальних послідовностей тощо.

Праймер (Primer) – короткий олігонуклеотид, який гібридується із матрицею – відповідною молекулою ДНК, і є затравкою при її синтезі чи 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 I етапі, синтезують новий праймер, що перекривається з кінцем вже секвенованої ділянки, з подальшим його використанням для визначення нуклеотидної послідовності наступної ділянки 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 Project) – міжнародна програма, метою якої є побудова генетичної і фізичної карт геному людини, а також 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.

Регуляторний білок (Regulatory protein) – білок, який регулює експресію транскрипції, “вмикаючи” або “вимикаючи” її.

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

Рекомбінантний білок (Recombinant plasmid) – гетерологічний для клітини білок, який кодується клонованою рекомбінантною ДНК.

Реплікативна форма, РФ (Replicative form) – проміжна форма дволанцюгової вірусної нуклеїнової кислоти, яка є матрицею для синтезу ДНК і РНК та є релаксаційним (відкритим) кільцем.

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 РНК-полімерази з цими генетичними елементами та припиняється їх експресія.

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

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

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

РНК-полімераза (RNA polymerase, RNA synthetase) – ензим, який здійснює синтез РНК із рибонуклеозидтрифосфатів. Матрицею для його роботи слугують ДНК або РНК; відповідні РНК-полімерази називають ДНК- або РНК-залежними.

Сайт інтеграції (клонування) (Cloning site) – специфічна ділянка векторної молекули, яка слугує місцем вбудовування фрагменту чужорідної ДНК. Головно, це унікальний сайт рестрикції.

Сайт рестрикції (Restriction site) – специфічна нуклеотидна послідовність у молекулі ДНК, яка розпізнається відповідною рестриктазою. Здебільшого це короткий паліндром, що складається з 4 – 8 п.н.

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 проекто-заданими властивостями. Іноді називають олігонуклеотид-спрямованим мутагенезом.

Самореplikативний 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 електрофоретичне розділення оліго- і полінуклеотидів, які відрізняються за довжиною одним нуклеотидом.

СЕРН (Centred'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, у результаті якого 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 хромосомі”(Chromosome jumping) – один із варіантів методу “прогулянки хромосомою”, який полягає у вияві та аналізі нових зчеплених генів з маркерним геном, який здатен мутувати та переміщуватися (стрибати) в нове генетичне оточення межах геному.

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

Cos-сайти (Cos-sites) – нуклеотидні послідовності, які властиві для кінців геномної ДНК фага λ та необхідні для її упаковки у фагові частинки.

Тандемний повтор (Tandem array) – нуклеотидна послідовність, яка часто зустрічається у геномах еукаріот та

складається із кількох однакових генетичних елементів, з'єднаних “голова-до-хвоста”.

ТАТА-бокс (TATA-box) – ділянка, розміщена у промоторній частині генів еукаріот у позиції -25 нуклеотидів стосовно сайту ініціації транскрипції; з нею зв'язується РНК-полімераза під час транскрипції. Інша назва – бокс Хогнеса. Аналогом у прокаріот є бокс Прибнова.

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

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

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

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

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, внесений методами генної інженерії.

Трансгенез (Transgenesis) – внесення чужорідного гена в рослинну чи тваринну клітину.

Транскрипційне картування (Transcription mapping) – “прив'язка” індивідуальних транскриптів (клонів кДНК експресибельних послідовностей- мішеней) до хромосомних районів методом 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 веде 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; отримують після обробки молекул ДНК відповідною рестриктазою.

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

Ферментний імуносорбентний аналіз (Enzyme-linked immusorbent assay, ELISA) – метод виявлення специфічних молекул у зразку. Зразок фіксують на твердій підставці і додають антитіло, специфічне до маркерної молекули. До другого антитіла приєднують ензим, який перетворює безбарвний субстрат на кольоровий продукт з його подальшою детекцією.

Фізична карта (Physical map) – схема розміщення генів на хромосомі, встановлена за допомогою різних методів (електронної мікроскопії, секвенуванні, рестрикційного 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) – фрагмент ДНК-полімерази I *E.coli*, який отримують унаслідок її протеолітичного розщеплення. Має 5'→3'-полімеразну активність і 3'→5' екзонуклеазну. Використовується частково у секвенуванні ДНК.

Функціональне картування (Functional cloning) – молекулярно-генетичний метод ідентифікація гена, який виходить 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) – синтетичний організм, у якого містяться клітини, тканини й органи від генетично відмінних організмів.

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

“Цинкові пальці” (Zinc fingers) – ДНК-зв'язуючі домени, які включають по два залишки цистеїну та один гістидин. Ці

амінокислоти взаємодіють із йоном цинку, а ділянка поліпептидного ланцюга між ними утворює петлю у формі “пальця”.

Частота трансформації (Transformation frequency) – показник частки клітин, які отримали чужорідну ДНК; виражається кількістю трансформантів до загальної кількості клітин.

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

Ядерне клонування (Nuclear cloning) – метод отримання генетично ідентичного організму злиттям без’ядерної (енуклейованої) яйцеклітини з диплоїдним соматичним ядром тотипотентної клітини, виділеної з організму, який клонують.

ДОДАТКИ

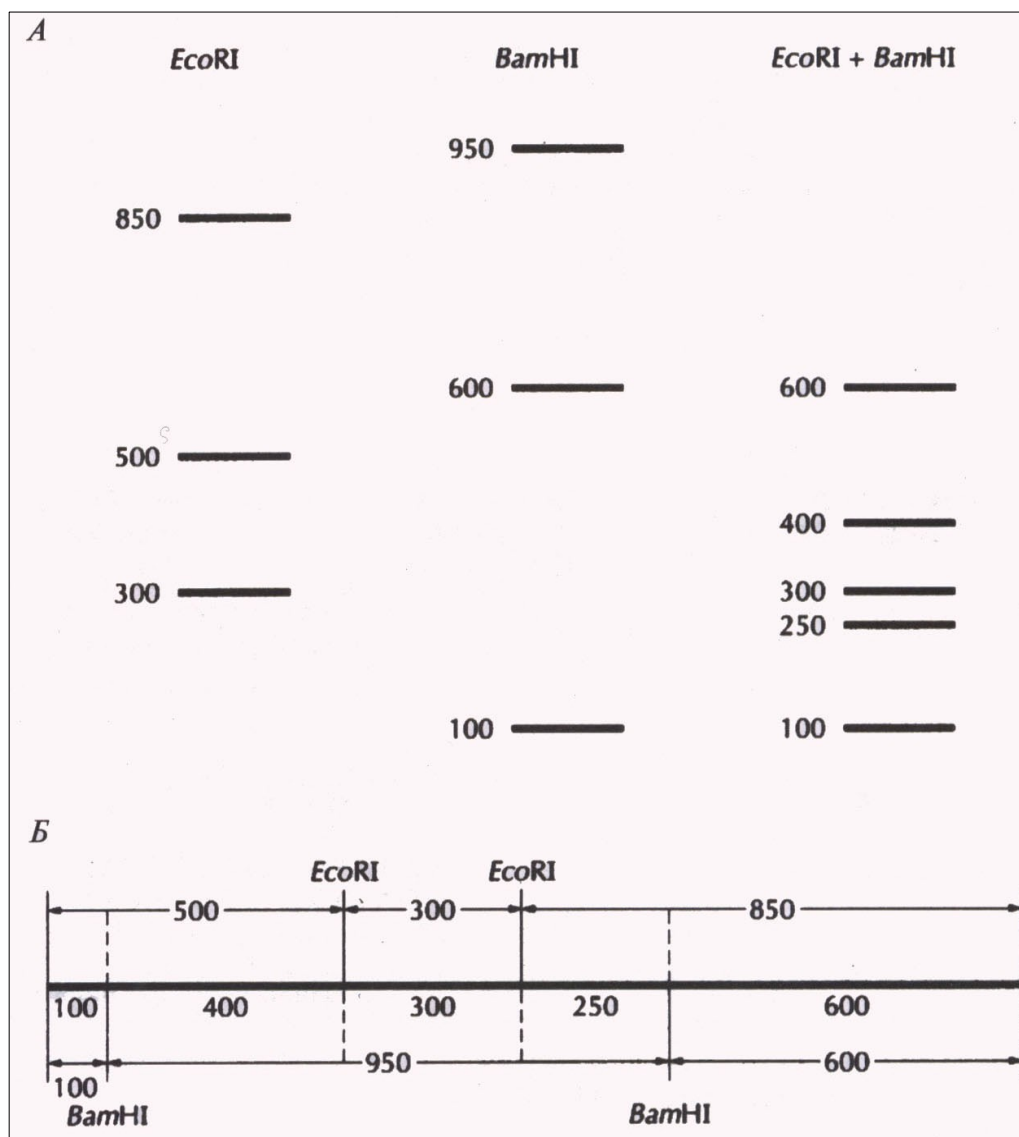
Додаток I

Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими ензимами рестрикції*

Ензим	Сайт рестрикції	Типи кінців
<i>AluI</i>	5'-AG↓CT-3' 3'-TC↑GA-5'	Тупі кінці
<i>BamHI</i>	5'-G↓GATCC-3' 3'-CC-TAG↑G-5'	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>EcoRI</i>	5'-G↓AATTC-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'-CGCCGGC↑G-	Виступаючі кінці із 5'-фосфатною групою
<i>PacI</i>	5'-T↓TAATTAA-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

*[GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

Гель електрофорез і картування сайтів рестрикції

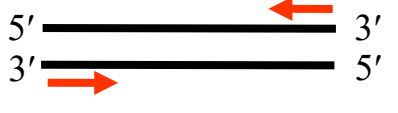
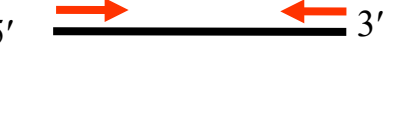
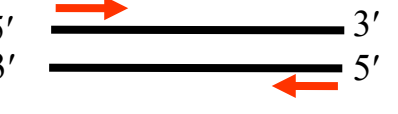

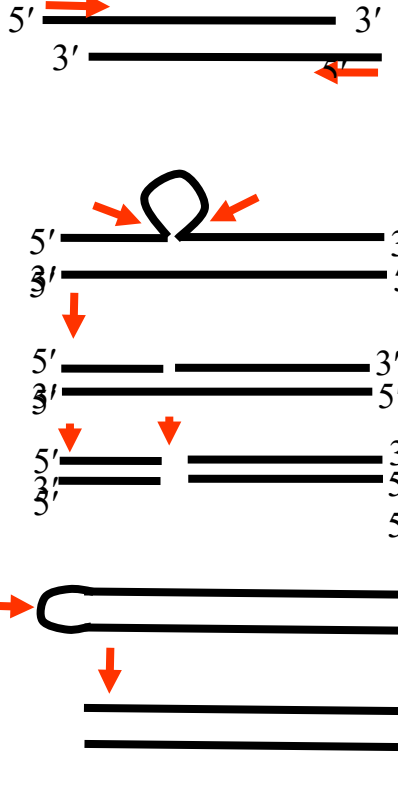


А. Гель-електрофорез фрагментів ДНК*. Фрагменти ДНК, отримані розщепленням рестриктазами *EcoRI* і *BamHI* (I і II доріжка, відповідно) та їхньою сумішшю (III доріжка). Візуалізація фрагментів ДНК – фарбуванням гелю етидій бромистим. Числа зліва від горизонтальних смуг на гелі електрофорезі – довжина фрагментів у парах азотистих основ.

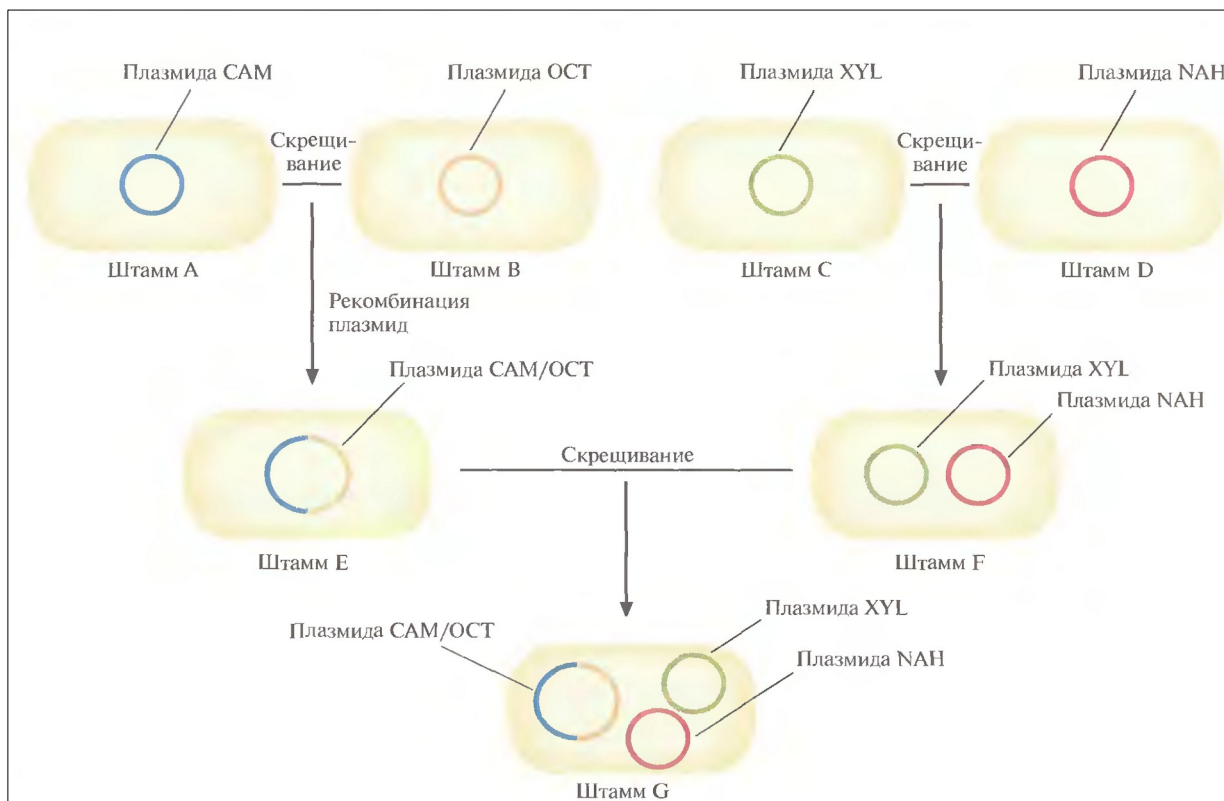
Б. Рестрикційна карта*. Отримана на основі даних електрофорезу. Числа – відстань між сайтами розщеплення відповідних ензимів.

*[Glik B. R., Pasternak J. J. & Patten C. L., 2010].

Нуклеази, які використовуються у генній інженерії*

Ензим	Принцип дії ензиму	Дія ензиму
Екзонуклеаза III а III <i>E. coli</i>		Розщеплює дволанцюгову ДНК з 3'-кінців
Екзонуклеаза VIII <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>Aspergillusoryzae</i>		Гідролізує однониткову ДНК та РНК Гідролізує однониткові петлі у складі ДНК та РНК Руйнування ділянок навпроти прогалин Гідролізує “шпилькові” структури у складі ДНК та РНК

[Федоренко В.О. Біотехнологія: курс лекцій (електронний), 2010].

Конструювання рекомбінантного штаму *Pseudomonasputida*

Конструювання рекомбінантного штаму *Pseudomonasputida**, здатного руйнувати камфору, октан, ксилол і нафталін. Штам *A*, який містить плазмиду *SAM* (відповідає за розщеплення камфори) схрещують зі штамом *B*, який містить плазмиду *OCT* (відповідає за розщеплення октану). У результаті утворюється штам *E* з гібридною плазмідною, що утворилася в результаті гомологічної рекомбінації між вихідними плазмідами і володіє функцією кожної з них. Штам *C*, який містить плазмиду *XYL* (відповідає за розщеплення ксилолу), схрещують зі штамом *D*, який містить плазмиду *NaN* (відповідає за розщеплення нафталіну), й отримують штам *F*, який містить обидві плазміди. Після цього схрещують штами *E* і *F*, у результаті чого утворюється штам *G*, у якому є плазміди *SAM/OCT*, *XYL* і *NaN*.

* [GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

Генетичні карти плазмідних векторів

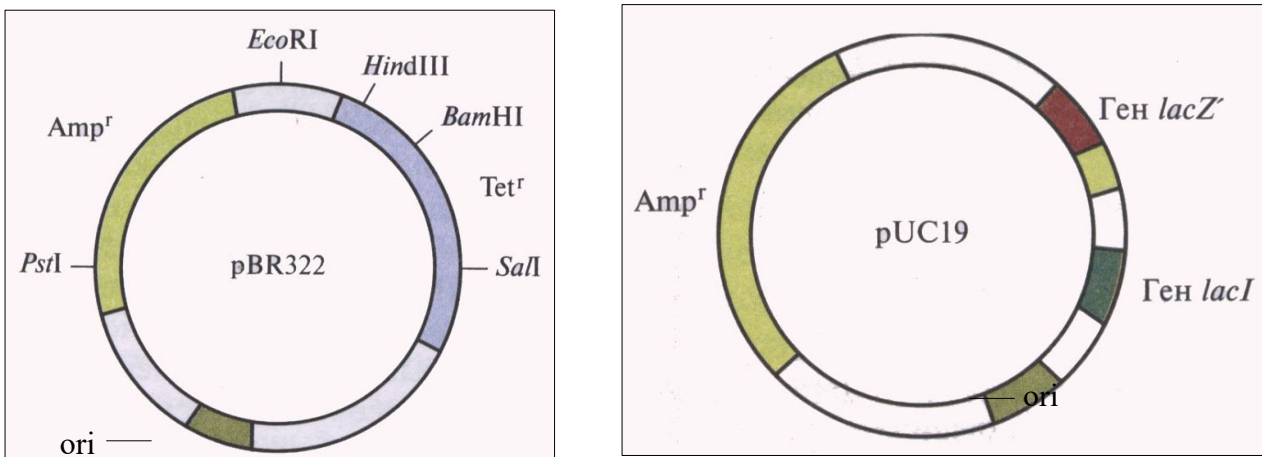
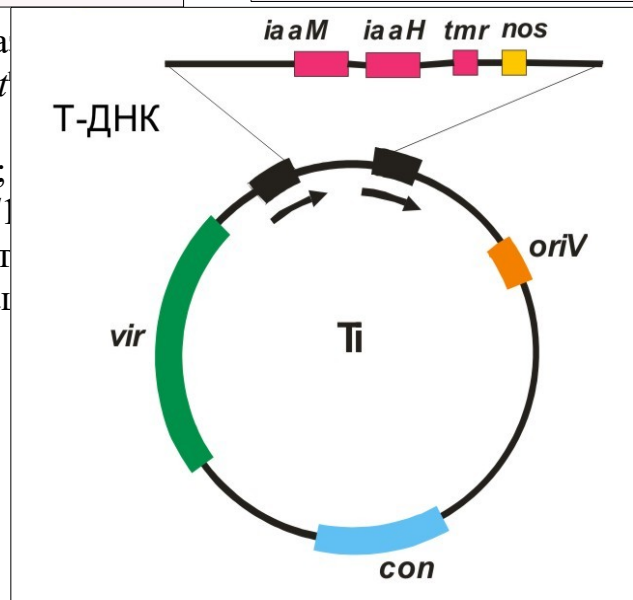


Рис. 1. Генетична карта плазмідного вектора pBR322*: *Amp^r* і *Tet^r* – гени резистентності до ампіциліну і тетрацикліну, відповідно; *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI* – рестрикційні сайти відповідних рестриктаз; *ori* – точка початку реплікації

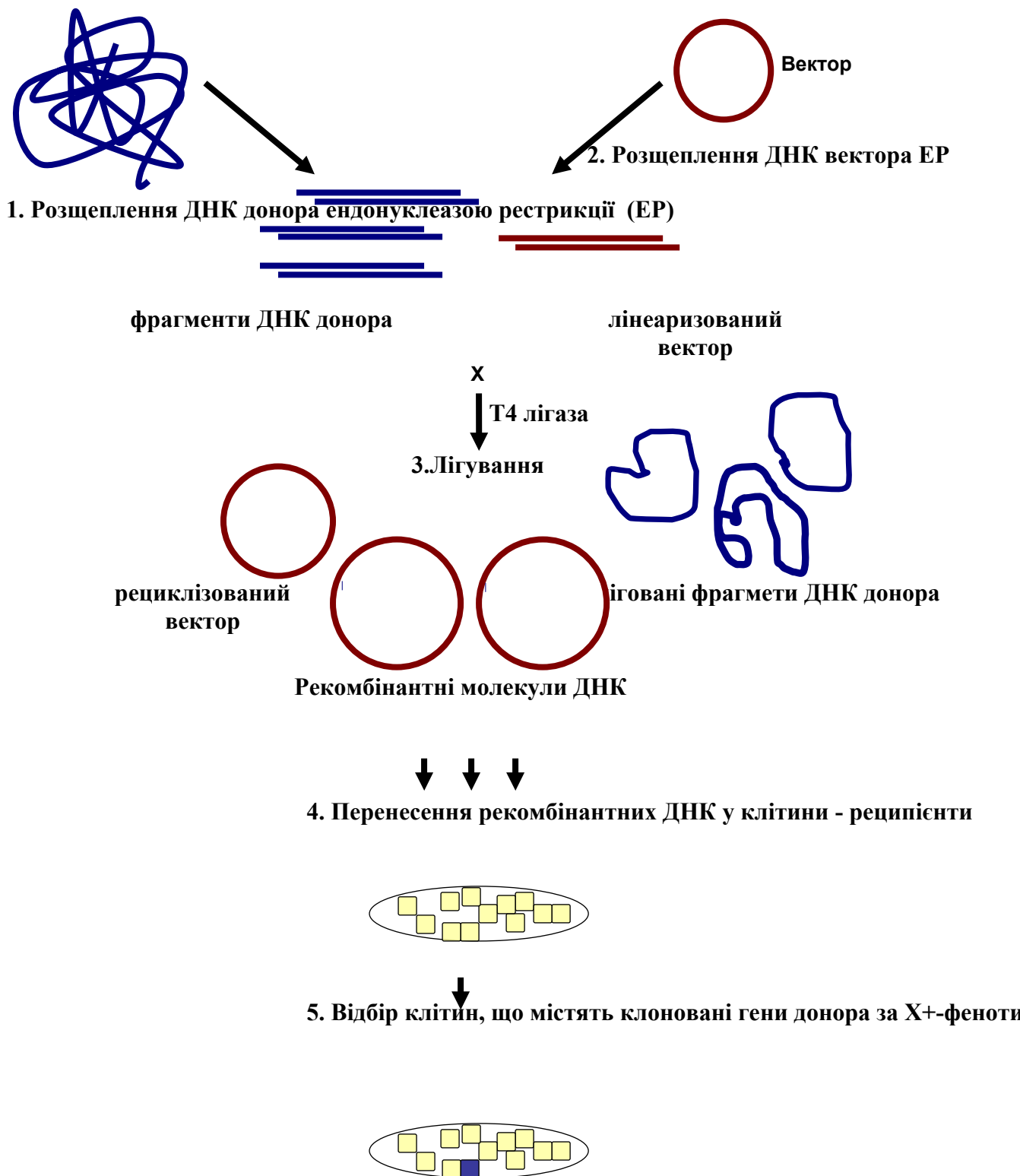


Т-ДНК
vir
 Ti
con
oriV
 мідного ампіцилін-регульований ген (*lacZ'*) і ген *lacI* – ген, що контролює

Рис. 3. Генетична карта Ті-плазмідної *Agrobacterium tumefaciens**: *iaaM* – ген триптофан-монооксигенази; *iaaH* – ген індол-3-ацетамідгідролази; *tmr* – ген ізопентеніл-трансферази; *nos* – ген нопалінсинтази; *oriV* – оріджин реплікації плазмідної

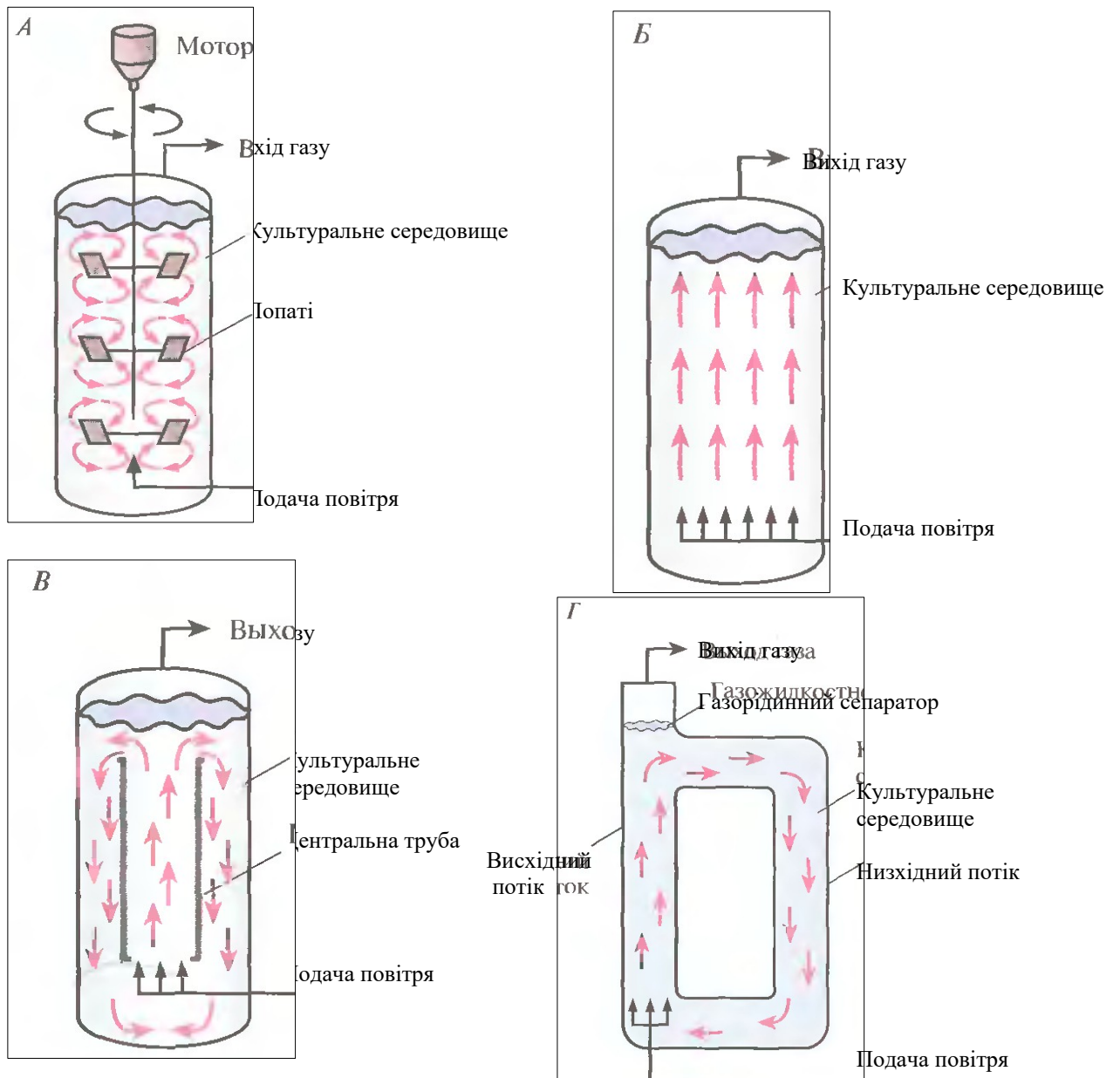
* [GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

Основні етапи генно-інженерного експерименту



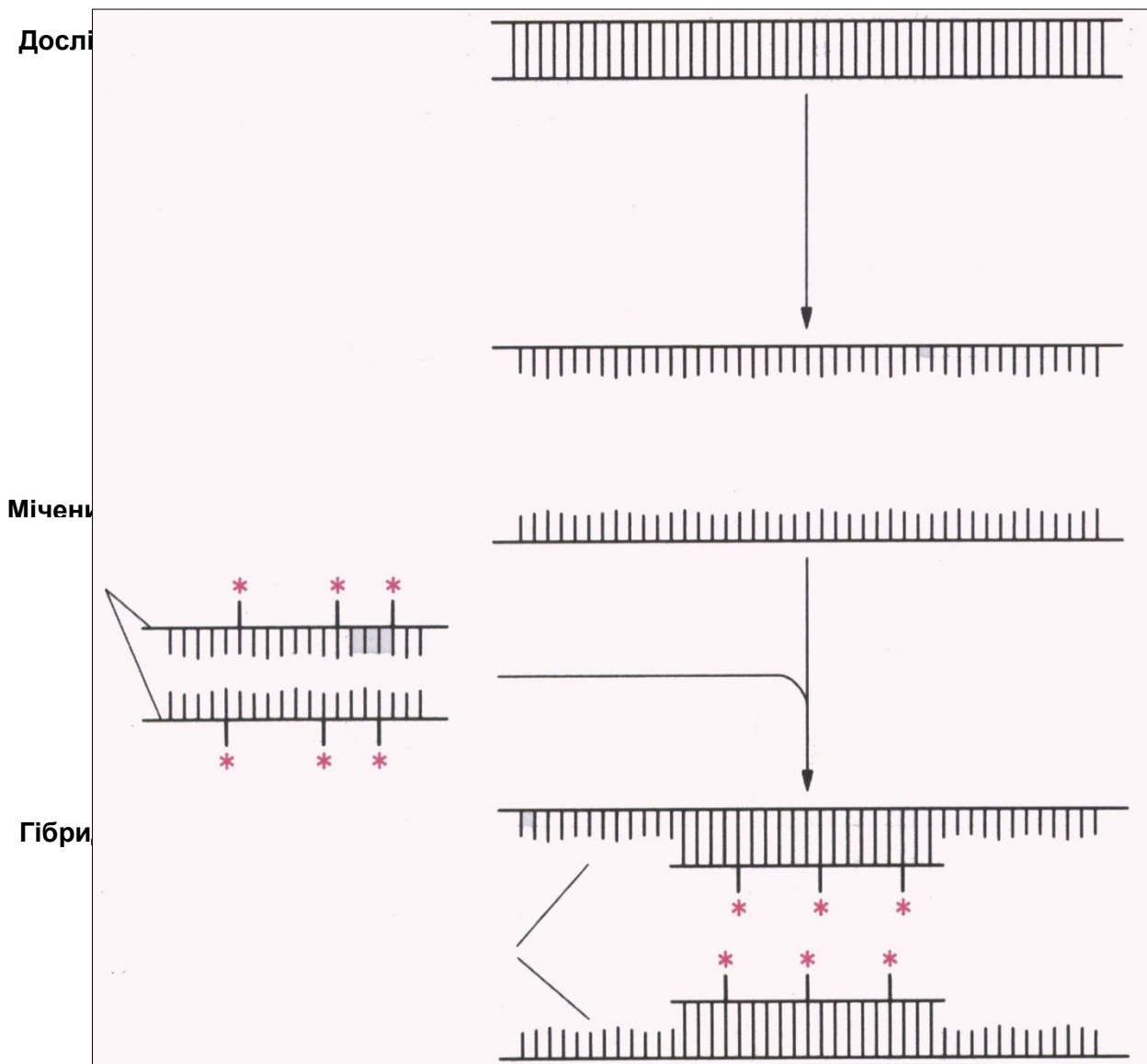
Додаток VII

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.
 * [Glik B. R., Pasternak J. J. & Patten C. L., 2010].

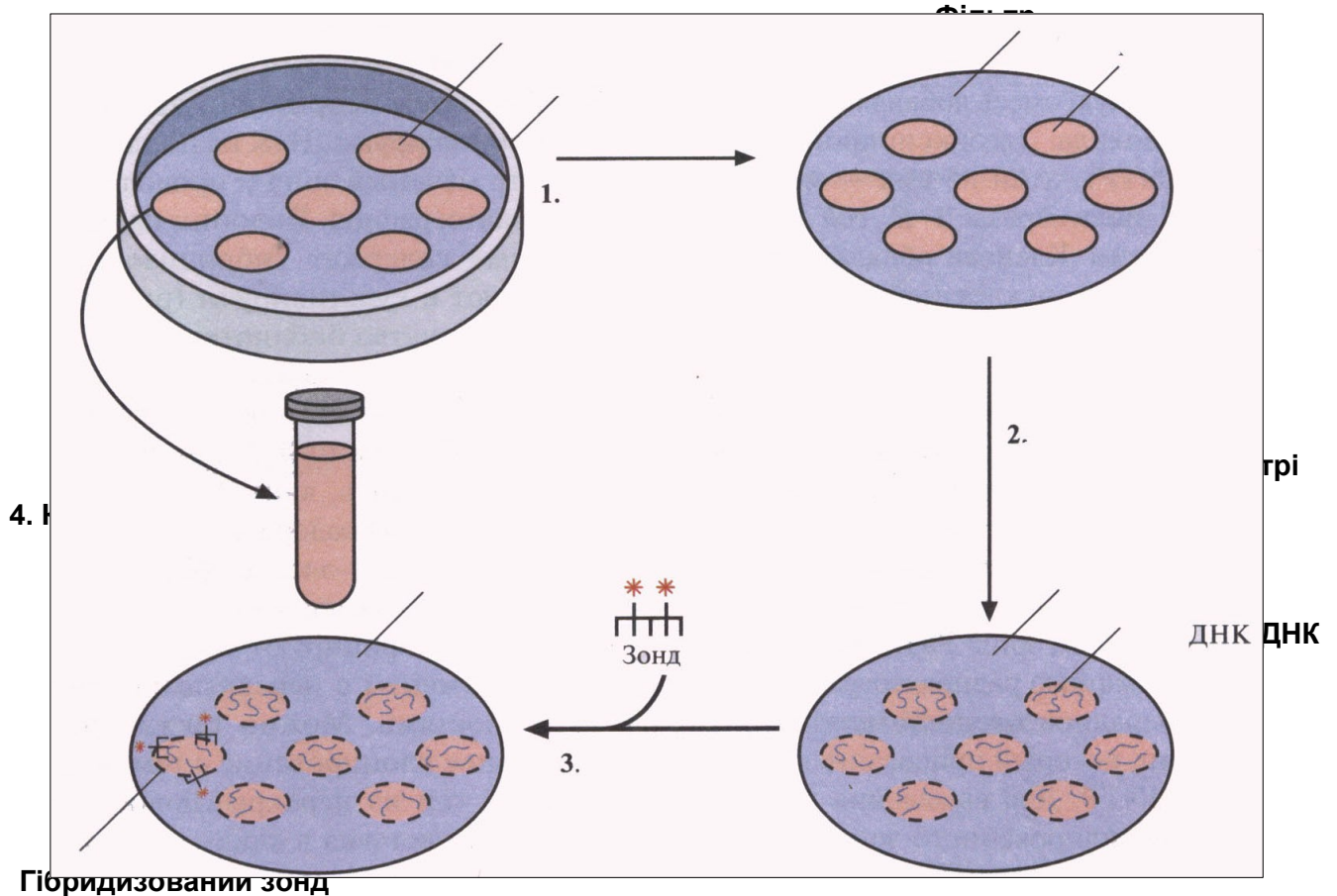
Схематичне зображення ДНК-гібридизації



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).

*[GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

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

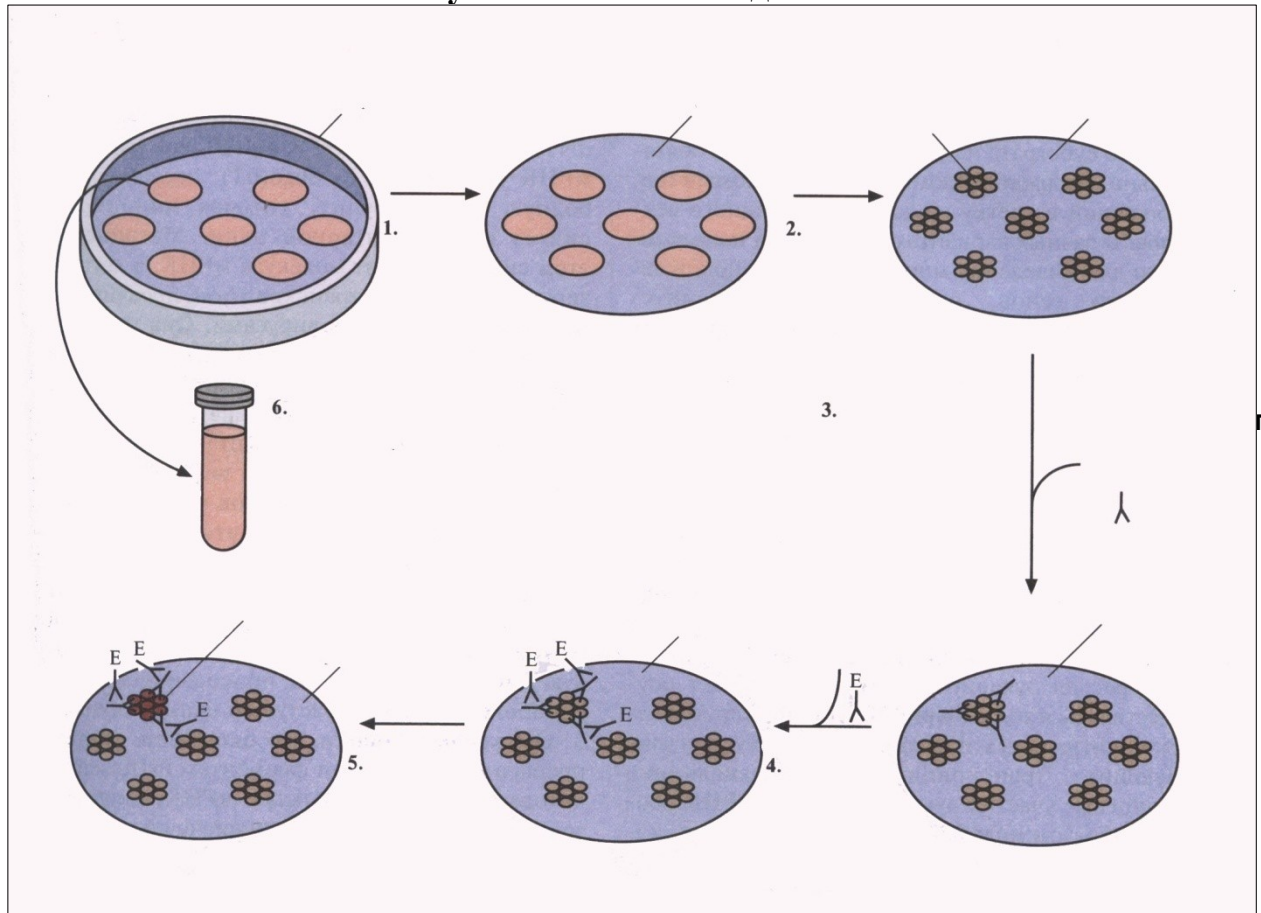


Скринінг бібліотеки геномної ДНК за використання міченого зонду*.

Клітини після трансформації висівають на тверде поживне середовище, яке забезпечує ріст тільки трансформованих клітин. 1. Переносять клітини з кожної колонії на тверду підкладку (наприклад, нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) так, щоб їхнє розміщення відповідало вихідній чашці. 2. Клітини лізують, вивільнену ДНК піддають денатурації, депротеїнізації та фіксують на фільтрі. 3. На фільтр наносять мічений ДНК-зонд і проводять гібридизацію. Змивають з фільтра негібридизований зонд і проводять радіоавтографію для ідентифікації клітин, що містять мічений ДНК-зонд. 4. Ідентифікують на чашці колонії, що містять досліджувану ДНК (позитивний гібридизаційний сигнал), відбирають їх та у подальшому культивують.

*[GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК імунологічним методом

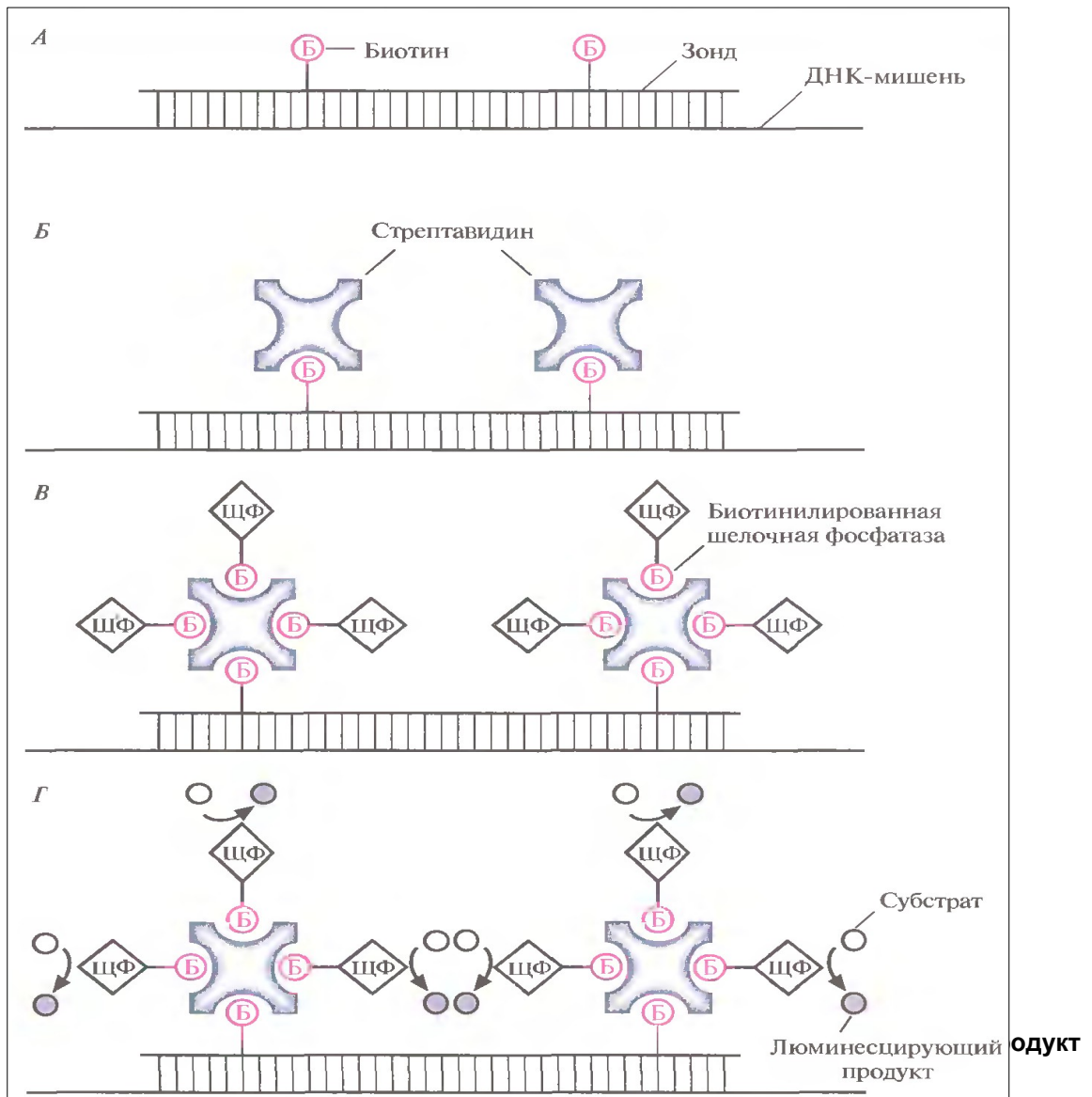


гіла

Імунологічний скринінг геномної бібліотеки (імунологічне тестування колоній)*. Клітини після трансформації висівають на тверде поживне середовище, яке забезпечує ріст тільки трансформованих клітин. 1. Переносять клітини з кожної колонії на тверду підкладку (наприклад, нітроцелюлозний чи нейлоновий фільтр) так, щоб їхнє розміщення відповідало вихідній чашці. 2. Клітини лізують, білки фіксують на фільтрі. 3. На фільтр наносять первинні антитіла, які зв'язуються тільки з цільовим білком. 4. Незв'язані первинні антитіла усувають, наносять на фільтр вторинні антитіла, специфічні стосовно первинних антитіл і зв'язані з ензимом (наприклад, лужною фосфатазою). 5. Змивають з 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 у подальшому культивують їх. У них може міститися рекомбінантна ДНК, що кодує білок, гомологічний первинним антитілам.

*[GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

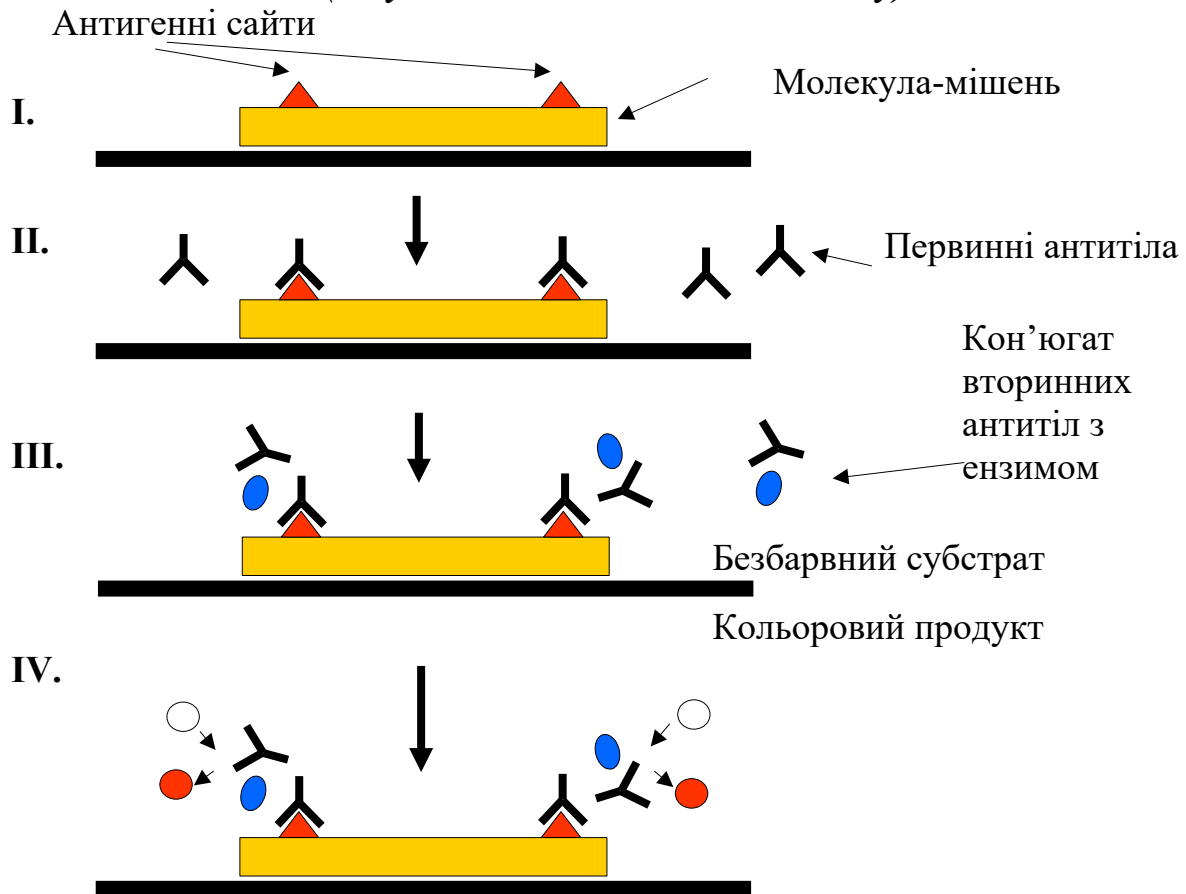
Хемілюмінісцентний метод виявлення ДНК-мішені



Хемілюмінісцентний метод виявлення ДНК-мішені*: Б – біотин, ЛФ – 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 люмінісцентного продукту під впливом лужної фосфатази.

*[GlikB. R., PasternakJ. J. &Patten C. L., 2010].

Схема імуноензимного 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).

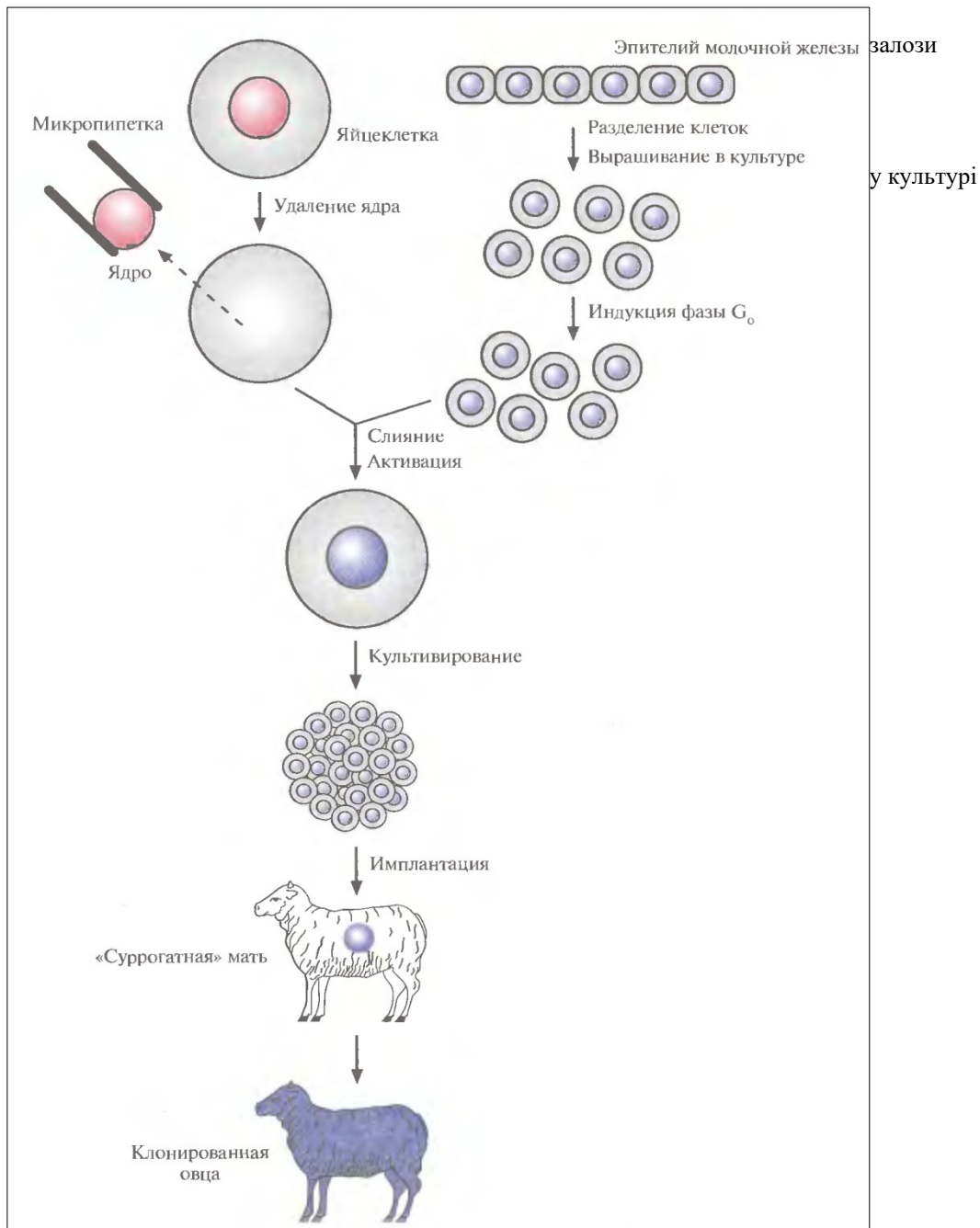
II. Додавання антитіл, специфічних до антигенів молекули-мішені (первинних антитіл). Промивання зразка для видалення антитіл, які з ним не зв'язалися.

III. Додавання вторинних антитіл, які специфічно зв'язуються з первинними антитілами, але не з антигенами молекули-мішені. Вторинні антитіла зв'язані з ензимами, 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.

* [Glik B. R., Pasternak J. J. & Patten C. L., 2010].

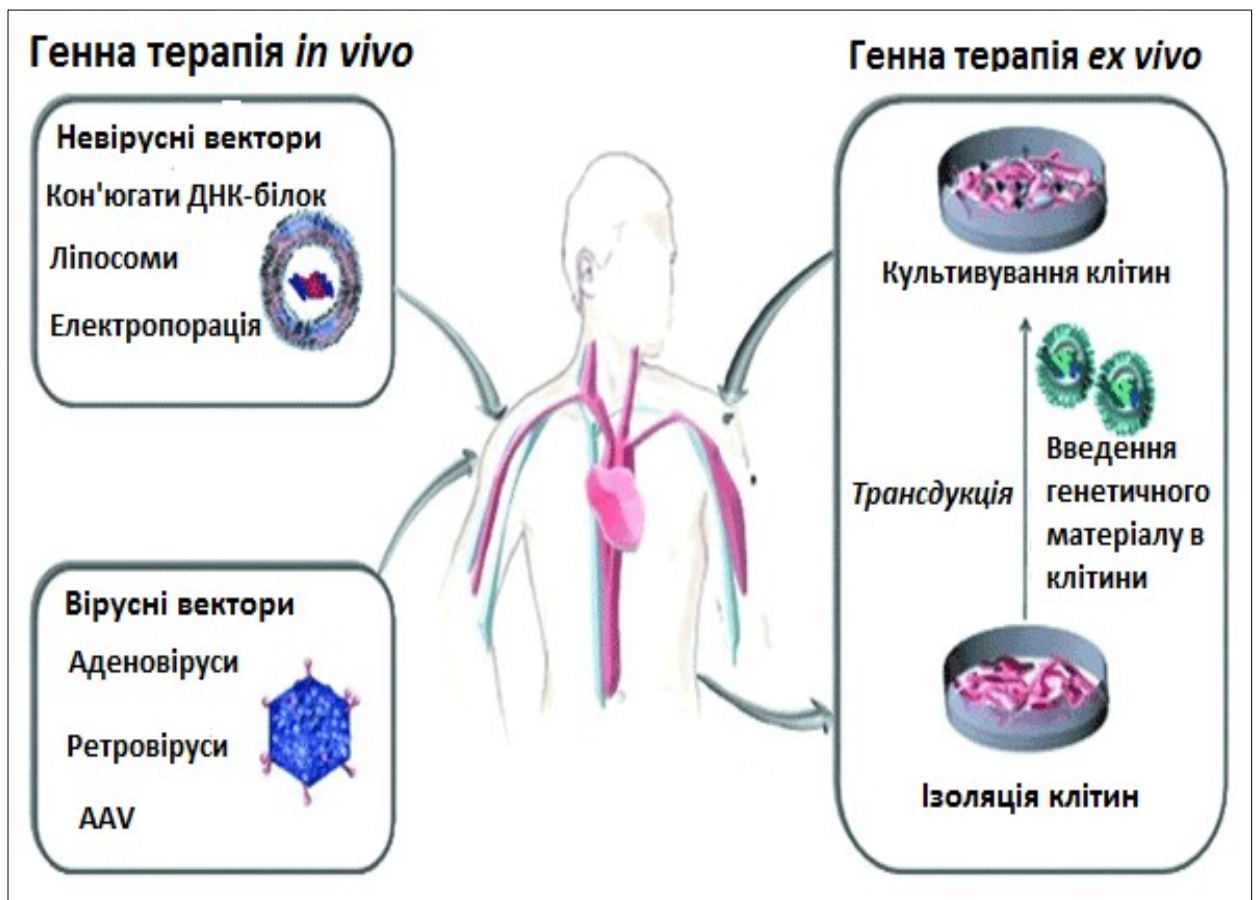
Схема ядерного клонування



Клонування вівці методом переносу ядра*. Ядро яйцеклітини усувають мікропипеткою. Виділяють та культивують епітеліальні клітини молочної залози дорослої особини, 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 їхній подальший розвиток.

* [Glik B. R., Pasternak J. J. & Patten C. L., 2010].

Методи генної терапії



*[Молекулярна генетика та технології дослідження геному, 2015].

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Біотехнологія: підручник / Герасименко В. Г. та ін.. / під заг. ред. В.Г. Герасименка. Київ: Інкос, 2006. 647 с.
2. Божков А.І. Біотехнологія. Фундаментальні і промислові аспекти. Федорко, Харків, 2008. 364 с.
3. Буценко Л.М., Пирог Т. П. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник. Київ : Вид- Ліра-К, 2018. 346 с.
4. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: підручник. Київ :Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.URL: https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf
5. Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцяк В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. 214 с.URL: <http://surl.li/kwcoe>
6. Клепач Г. Основи біотехнології та генної інженерії : методичні вказівки до практичних занять [для студентів спеціальності “ПМСО. Біологія”]. Дрогобич: Ред.-видав. відділ ДДПУ ім. І. Франка, 2011. 74 с.
7. Клепач Г. Молекулярна біотехнологія: методичні рекомендації до практичних занять. Дрогобич: Ред.-видав. відділ ДДПУ ім. І. Франка. 2017. 104 с.
8. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин : підручник. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
9. Молекулярна генетика та технології дослідження геному: навч.посібник / М.І.Гиль та інш. Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2015. С. 204–269. URL:<http://surl.li/kwbwj>.
10. Основи біотехнології / укл.: В.І. Буцяк та ін. Львів : Тріада плюс, 2010. 396 с
11. Основи біотехнології: підручник / укл.: В.І. Буцяк, А.Г. Колотницький. Львів : Тріада плюс, 2010. С. 214 с.
12. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
13. Помогайбо В.М., Петрушов А.В. Генетика людини: навч.посібник. Київ : Видав. центр Академія.282 с.URL:<http://surl.li/ozoxh>.
14. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів: навч. посібник для студ. біол. факультетів університетів / Федоренко В.О., Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Львів: Видав. центр ім. Івана Франка, 2007. 279 с.
15. GlikB.R., PasternakJ.J., PattenC.L. Molecular biotechnology: Principles and application of recombinant DNA. Ed. 4nd. Wasnington : ASM Press, 2010. 1020 p. URL:<https://www.heavenlyfuel.com/jbframework/uploads/2017/06/Molecular-Biotechnology.pdf>

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Методичні поради до практичних занять.....	5
Практичні заняття.....	7
Практичне заняття № 1. Ензими генної інженерії, їх характеристика та застосування.....	7
Практичне заняття № 2. Методи конструювання рекомбінантних ДНК.....	17
Практичне заняття № 3. Генна інженерія рекомбінантних білків...	26
Практичне заняття № 4. Генетична інженерія мікроорганізмів.....	36
Практичне заняття № 5. Генетична інженерія культур клітин	49
Практичне заняття № 6. Генетична інженерія рослин.....	58
Практичне заняття № 7. Генетична інженерія тварин.....	67
Практичне заняття № 8. Молекулярна генетика людини.	
Генотерапія.....	75
Завдання підвищеної складності.....	86
Відповіді до завдань підвищеної складності.....	93
Словник основних термінів і понять.....	97
Додатки.....	118
Додаток I. Нуклеотидні послідовності, які розпізнаються деякими ензимами рестрикції	118
Додаток II. Гель-електрофорез і картування сайтів рестрикції.	119
Додаток III. Нуклеази, які використовуються у генній інженерії...	120
Додаток IV. Конструювання рекомбінантного штаму <i>Pseudomonasputida</i>	121
.....	
Додаток V. Генетичні карти плазмідних векторів.....	122
Додаток VI. Основні етапи генно-інженерного експерименту ...	123
Додаток VII. Схематичне зображення різних типів біореакторів	124
Додаток VIII. Схематичне зображення ДНК-гібридизації.....	125
Додаток IX. Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК методом ДНК-ДНК гібридизації.....	126
Додаток X. Виявлення клонів клітин, що містять рекомбінантну ДНК імунологічним методом.....	127
Додаток XI. Хемілюмінесцентний метод виявлення ДНК-мішені...	128
Додаток XII. Схема імуноензимного аналізу ELISA.....	129
Додаток XIII. Схема ядерного клонування.....	130
Додаток XIV. Методи генної терапії.....	131
Використана література.....	132

Електронне навчально-методичне видання

Галина Клепач

**ОСНОВИ ГЕННОЇ І
КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Методичні рекомендації до практичних занять

для підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої
освіти

біологічних спеціальностей

**Дрогобицький державний педагогічний університет
імені Івана Франка**

Редактор

Ірина Невмержицька

Технічний редактор

Ольга Лужецька

Коректор

Ірина Артимко

Здано до набору 04.03.2024 р. Гарнітура Times Ум. друк. арк. 8,37.
Зам.15.

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 ДК № 5140

від 01.07.2016 р.) 82100, Дрогобич, вул. І. Франка, 24.