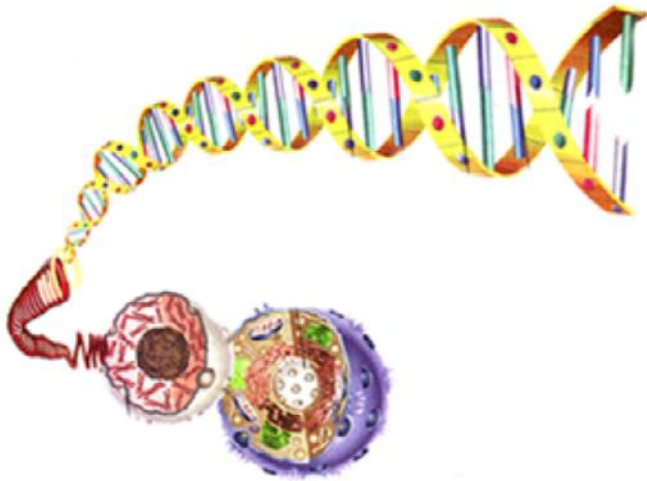


**Кравців Р.Й., Колотницький А.Г.,  
Буцяк В.І.**

# **Генетична інженерія**



**Львів - 2008**

**УДК 577.2**

**ББК 2805 К 78**

*Рецензенти: декан біолого-технологічного факультету, завідувач кафедри генетики і розведення с.-г. тварин, д-р с.-г. наук, професор Щербатий З.Є.,*

*д-р біол. наук, професор, завідувач лабораторії обміну речовин Інституту біології тварин УААН Сологуб Л.І.*

*Відповідальний за випуск: д-р с.-г. наук, проф. Буцjak В.І.*

Навчальний посібник містить дані про генетичну інженерію – напрям молекулярної біології та молекулярної генетики, метою якого є створення організмів із новими комбінаціями спадкових властивостей, у тому числі й таких, що не трапляються в природі. Це здійснюється спрямованим перенесенням людиною конкретних генів або їх комплексів з одного організму в інший, закріпленням цих генів у новому генетичному оточенні й забезпеченням їх вираження у даній генетичній системі. Методи генетичної інженерії дають можливість об'єднувати геноми досить віддалених видів рослинних і тваринних організмів, що призводить до створення нових форм з цінними властивостями, для яких характерні корисні господарські ознаки.

Навчальний посібник розрахований на студентів та аспірантів вищих аграрних навчальних закладів III – IV рівня акредитації, які вивчають курс “Біотехнології”.

Львівська національна академія ветеринарної медицини  
імені С.З.Гжицького

© Кравців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцjak В.І., 2007 р.

## ВСТУП

За останніх тридцять років біотехнологія збагатилась новим перспективним напрямком – генетичною інженерією. На відміну від клітинної інженерії, яка має справу з маніпуляцією клітин або їх структур, у центрі цього напрямку біотехнології лежать молекули ДНК із запрограмованою генетичною інформацією про даний організм.

Генетична інженерія – це розділ біотехнології, що базується на розробці методів спрямованого синтезу нових, таких, що не існують у природі, поєднань генів (рекомбінатних ДНК), які розмножуються в клітині і синтезують кінцеві продукти обміну. Принципова відмінність генетичної інженерії від традиційних прийомів, які використовувались для зміни генотипу, полягає в тому, що вона дає можливість контролювати функціонально активні генетичні структури *in vitro* у формі рекомбінатних ДНК. Сама ж генетика як наука про спадковість пройшла складний шлях свого розвитку. Фактичні дані та її обґрунтовані гіпотези були, на превеликий жаль, використані для утвердження таких соціально-політичних доктрин, які йшли всупереч науковим істинам, етиці й здоровому глуздові (наприклад, намагання обґрунтувати переваги одних рас людей над іншими; повне заперечення генів як надуманих “міфічних”, неіснуючих структур у клітинах; домінуючу залежність спадковості від умов зовнішнього середовища; заперечення внутривидової за аналогією до класової боротьби. Сумнівні сторінки в історії генетики канули у вічність, і допомогло цьому виникнення молекулярної біології та молекулярної генетики у зв’язку із видатною подією у науці, коли Дж. Уотсон і Ф. Крік у 1953 р. запропонували тривимірну модель структури ДНК та

підвели матеріальну базу під раніше згаданий “магічний” ген.

Приблизно через 20 років, у 1972 році, П.Берг із співробітниками вперше сконструювали гібридну ДНК на основі досягнень молекулярної генетики, що й стало датою виникнення генетичної інженерії. А через 10 років Food and Drug Administration (FDA) схвалила і дозволила використання першого біотехнологічного продукту – інсуліну, який синтезували генно-інженерним методом. Згодом з’явилися інші генно-інженерні препарати: два варіанти гормону росту людини, два варіанти 2 $\alpha$ -інтерферону, активатор тканинного плазміногену, вакцина проти гепатиту В, до кінця 1988 року було схвалено 300 наборів моноклональних антитіл.

Зараз генетична інженерія розробляє методи прикладних досліджень у галузі розведення і селекції сільськогосподарських тварин, в тому числі цілеспрямованої корекції спадковості та одержання на цій основі тварин із зміненим генотипом, так званих трансгенних тварин, які володіють кращими продуктивними якостями та більш стійкі до захворювань.

# **I. ТЕОРЕТИЧНІ (МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ) ОСНОВИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

## **1.1. Фундаментальні дослідження структури і функції ДНК**

У формуванні генетичної інженерії найпершу роль відіграла генетика мікроорганізмів, виникнення якої датується 40-ми роками ХХ століття. Перші дослідження з конструювання рекомбінантних молекул ДНК *in vitro* датуються серединою 70-х років. Таким чином, знадобилося тридцять років, щоби пройти шлях від перших дослідів з грибами, бактеріями і фагами як генетичними об'єктами, до повного розшифрування складної структури їх генетичного матеріалу, принципів його організації та функціонування. Більшість відкриттів у галузі генетики мікроорганізмів удостоєні Нобелівських премій.

Першим об'єктом дослідження генетики мікроорганізмів була плісень *Neurospora crassa*, потім стали гриби, бактерії і віруси бактерій (бактеріофаги). Найбільш вдалим виявився штам К-12 *Escherichia coli*, тому що до складу бактеріальної культури входив, як виявилось пізніше, профаг  $\lambda$ , майбутній класичний об'єкт генетичної інженерії. Крім того, в цих же клітинах були виявлені плазміді так званого статевого фактора, що прискорило відкриття статевого процесу у бактерій.

Для більш повної характеристики основних віх розвитку генетичної інженерії слід повернутися у ХІХ століття до дослідів хімічного складу гною ран Ф. Мішера. Вимочуючи бинти з ран у слабкому сольовому розчині, він зауважив, що гнійні клітини, в основному лейкоцити, осідали на дно посудини. Тому що розчин був гіпотонічний, оболонки клітин руйнувалися і в рідину переходили ядра, які й осідали на дно. Якраз із них

Ф.Мішер виділив невідому речовину, яку 1868 р. назвав нуклеїном. Результати роботи опубліковані в 1871 р., це і стало формальною датою відкриття нуклеїнових кислот. Нуклеїн мав високий відсоток фосфату та володів кислотними властивостями, в 1889 році С.Альтманом він був названий нуклеїною кислотою.

Відкриття нуклеїнових кислот стало поштовхом до широкого вивчення їх складу та властивостей. А.Коссель у кінці XIX століття визначив окремі складові частини цих кислот. З гідролізату нуклеїнових кислот він одержав невідомі раніше речовини – аденін та ксантин. Остання була не мономером нуклеїнової кислоти, а продуктом перетворення іншого мономера – гуаніну (рис.1.1). У подальших дослідженнях А.Коссель виявив у нуклеїнових кислотах тимін і цитозин, які належать до класу піримідинів. У 1890 році Аскалі виділив з нуклеїнових кислот ще одну основу – урацил.

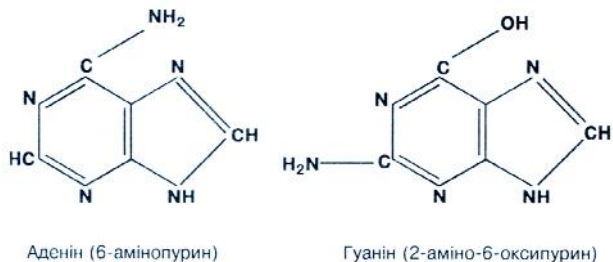


Рис.1.1. Пуринові основи

До кінця XIX століття стало відомо, що нуклеїнові кислоти містять дві пуринові основи – аденін і гуанін та три піримідинові – тимін, цитозин і урацил (рис.1.2). Крім цього, в гідролізаті виявлено велику кількість фосфатної кислоти та вуглеводів. Р.Левен виділив і кристалізував вуглеводний компонент нуклеїнової кислоти дріжджів. Ним виявився моноцукорид D-рибоза. Пізніше виділено

ще один моноцукорид з класу пентоз - дезоксирибоза. Нуклеїнові кислоти, що містили дезоксирибозу, стали називатися дезоксирибонуклеїновими, або скорочено ДНК, а ті, що містили рибозу – рибонуклеїновими, або РНК.



Рис.1.2. Піримідинові основи

Таким чином були відкриті всі низькомолекулярні речовини, з яких складалися нуклеїнові кислоти, і залишалось зрозуміти, як вони сполучені між собою.

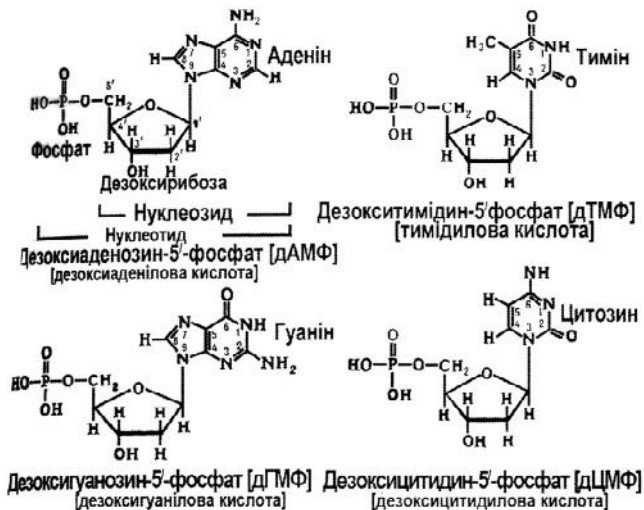


Рис.1.3. Нуклеотиди, які входять до складу ДНК

Цим займався Р.Левен. Застосувавши м'які методи гідролізу нуклеїнових кислот, він виділяв сполуки вуглеводів з фосфатною кислотою, або азотисті основи з вуглеводами. Останні були названі нуклеозидами. Вдалося одержати з гідролізату РНК під дією неконцентрованого лугу фосфатні естери нуклеозидів. Ці сполуки названо нуклеотидами. До їх складу входять азотисті основи, за якими вони і названі. На основі цих результатів автор прийшов до висновку, що нуклеїнові кислоти є полімірами, в яких мономерами виступають нуклеотиди. Він вважав, що ДНК складається з чотирьох нуклеотидів (рис.1.3), сполучених послідовно, і, на його думку, формула ДНК повинна мати вид: (А-Г - Т-Ц)<sub>n</sub>.

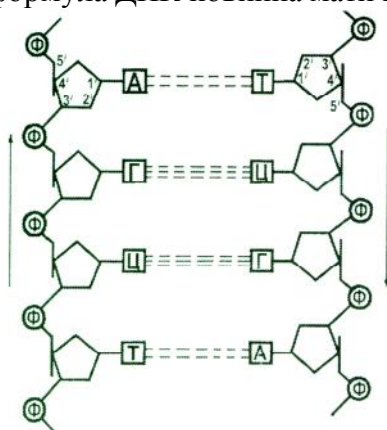


Рис.1.4. Схематична структура поліпептидного ланцюга

На той час було встановлено присутність нуклеїнової кислоти в рослинних і тваринних клітинах, але не була відома їх біологічна роль, хоча О.Гертвіг (1884) вважав, що нуклеїн є речовиною, яка відповідає за передачу спадкових властивостей із покоління в покоління. Він першим спостерігав злиття ядер яйцеклітини і

спермія при заплідненні. Послідовність розташування чи порядок чергування залишків нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі визначає первинну структуру ДНК і РНК (рис.1.4). В її утворенні беруть участь глікозидний зв'язок, що з'єднує азотисті основи з пентозою, естерний зв'язок між рибозою чи дезоксирибозою і фосфатною кислотою та фосфодіетерний зв'язок між нуклеотидами.



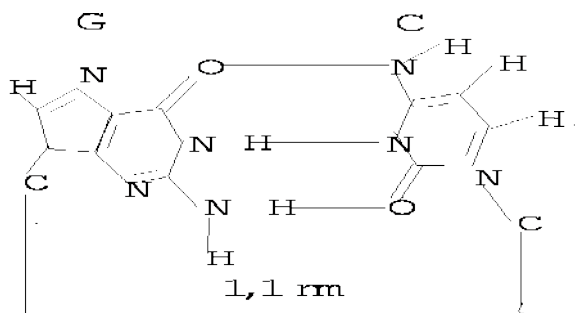


Рис.1.5. Пурин-піримідинова пара основ у ДНК, за Р.Бохінські, 1986 (G (гуанін) - C (цитозин) – три водневі зв'язки)

Ці зв'язки ковалентної природи, що є фактором міцної стабільної структури. Встановлено, що нуклеотиди в поліпептидних ланцюгах ДНК та РНК зв'язані 3',5' – фосфодіетерними зв'язками. Взаємодії між пуриновими і піримідиновими основами, що забезпечують зв'язок поліпептидних ланцюгів у ДНК, зображені на рис.1.5-1.6.

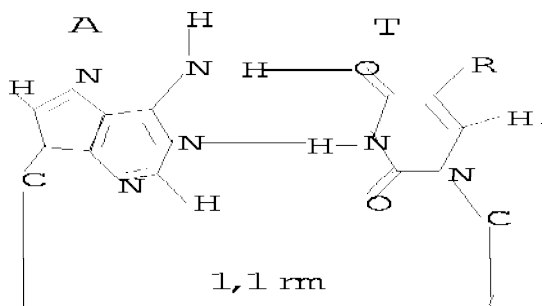


Рис.1.6. Пурин-піримідинова пара основ у ДНК, за Р.Бохінські, 1986 (A (аденін) - T (тимін) – два водневі зв'язки, R – CH<sub>3</sub>)

У 1944 році М.Макарті й М.Евері довели, що ДНК є носієм спадковості. Це послужило поштовхом до подальших досліджень її структури. Одним із перших дослідників у цьому напрямку був Чаргаф. Вивчаючи

нуклеотидний склад ДНК з різних тварин та організмів, він одержав результати, на основі яких сформулював правила:

1) число основ з аміногру-пами у шостій позиції дорівнює числу основ з кетогрупами у тій же позиції, тобто А (аденин) + Ц (цитозин) = Г (гуанін) + Т (тимін). Це єдине правило, стосовно до ДНК і до більшості РНК, в яких Т замінений на У (урацил);

2) молекулярний вміст аденіну дорівнює молекулярному вмістові тиміну ( $A=T$ , або  $A/T = 1$ );

3) молекулярний вміст гуаніну дорівнює молекулярному вмістові цитозину ( $G=C$ , або  $G/C = 1$ );

4) сума пуринових основ дорівнює сумі піримідинових основ, тобто  $A+G = T+C$ ;

5) у бактерій відношення  $A/T$  і  $G/C$  близькі до одиниці, тоді як відношення  $A/G$  змінюється в інтервалі 0,4 - 2,7. Інтервал зміни  $A/G$  для рослин (1,1 – 1,7) і тварин (1,3 – 2,2) менший, ніж для ДНК бактерій. За співвідношенням нуклеотидів виділені АТ – тип ДНК ( $A+T > G+C$ ) і ГЦ – тип ДНК ( $G+C > A+T$ ).

Ці дані вчений одержав у 1950 році, хоча не зміг пояснити значення відкритих ним правил. Це зробили в 1953 році Дж.Уотсон і Ф.Крік. Вчені застосували метод моделювання структур молекул з урахуванням рентгенограм ДНК, одержаних М.Уілкінсом і Р.Френклін. Виходячи з аналізу рентгенограм, Дж.Уотсон і Ф.Крік зрозуміли, що структура ДНК знаходиться в спіралізованій формі. Залишалося з'ясувати зі скількох полімерних лінійних ланцюгів складається спіраль. Електронно-мікроскопічні світлинні показали, що діаметр спіралі складає 20. ангстрем, а один виток цієї спіралі займає 34 ангстреми (рис.1.8).

Оскільки віддаль між сусідніми нуклеотидами 3,4 ангстрема, то в одному витку повинно бути десять нуклеотидів (рис.1.7). Моделюючи різні положення

азотистих основ, автори зробили висновок, що спіраль ДНК має два ланцюги, в яких аденін одного ланцюга сполучений із тиміном другого, а гуанін – з цитозином.

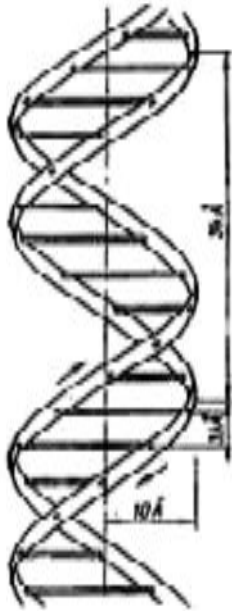


Рис.1.7.Схема спіралі ДНК

Така модель пояснювала суть правил Чаргаффа. У клітинах всіх типів живих організмів ДНК перебуває у зв'язаному з білками стані. Найбільше до складу білкових компонентів входять гістони, які представлені двома фракціями:

1) “багаті на лізин” з молекулярною масою 10000; “багаті на аргінін” з молекулярною масою 20000. В цілому ж дезоксирибозопротеїди містять біля 50% ДНК, а решта припадає на білок. Дж.Уотсон і Ф.Крік не тільки доказали, що молекула ДНК є біспіральною та її ланцюги комплементарні, тобто доповнюють один одного,

а й дослідили процес передачі спадкової інформації – в ході реплікації (подвоєння) ланцюги ДНК розходяться і на кожному з них добудовується комплементарний новий полінуклеотидний ланцюг (рис.1.9). Старий ланцюг служить матрицею для синтезу нового. Так множитьсся спадкова інформація в клітинах живих організмів. Ця модель Уотсона-Кріка одержала експериментальне підтвердження в роботах відомого вченого А.Корнберга, який вивчав ензимологію реплікації ДНК і відкрив фермент ДНК-полімеразу, що стала основною догмою молекулярної біології та генетики.

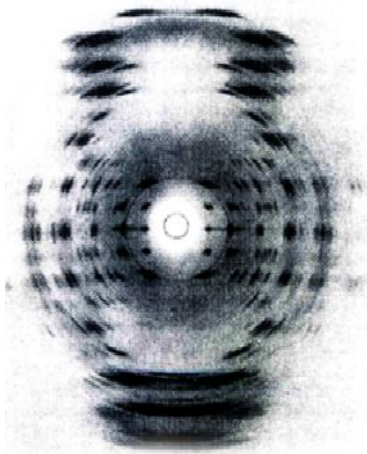


Рис.1.8.Рентгенограма кристалічного препарату натрієвої солі ДНК (А-форма ДНК)

Цією наукою доведено, що ДНК складається з двох лінійних полінуклеотидних ланцюгів, закручених у спіраль навколо осі. Сполучені ланцюги між собою водневими зв'язками нуклеотидів. Кожна пара основ повернута на  $36^\circ$  навколо осі спіралі відносно наступної пари основ. Таким чином, 10 пар основ складають повний оберт у  $360^\circ$ . Два ланцюги, які закручуються один відносно одного, утворюють подвійну спіраль, в якій є дві борозни - мала (біля 12 ангстремів

шириною) і велика (22 ангстремів шириною). Подвійна право-закручена спіраль відома як В-форма.

Згідно з такою моделлю полінуклеотидні ланцюги анти-паралельні, тобто йдуть в проти-лежних напрямках: один ланцюг йде у напрямку  $5' \rightarrow 3'$ , а другий – у напрямі  $3' \rightarrow 5'$  (рис.1.10). Місця приєднання азотистих основ до залишків дезоксирибози в комплементарних ланцюгах ДНК розташовані не суворо один проти одного стосовно осі спіралі. Це позначається на всій конформації ДНК. З одного боку від осі спіралі, де кут між дезоксирибозними кільцями менше  $180^\circ$ , міститься жолоб, іменований малою, чи глікозидною, борозною (у її бік спрямовані глікозидні зв'язки, що з'єднують дезоксирибозні залишки з азотистими основами); з протилежного боку знаходиться велика борозна, або неглікозидний жолоб.

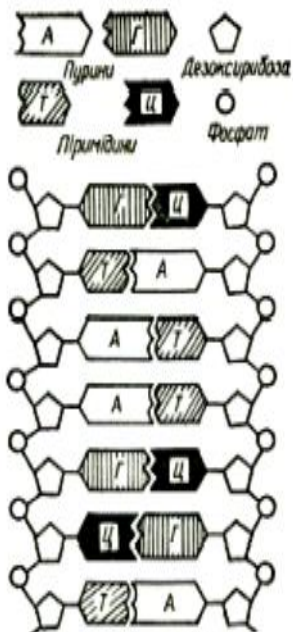


Рис.1.9. Схема комплементарного з'єднання азотистих основ у спіралі ДНК

комплементарні пари, розташування груп, здатних до утворення водневих зв'язків, різне. У парі А-Т у напрямку від аденіну до тиміну: спочатку розташовується атом азоту – акцептор гідрогену, далі  $-NH_2$  група – донор гідрогену і, врешті, атом оксигену – знову акцептор. У комплементарній парі Г-Ц спочатку йде атом нітрогену – акцептор, далі оксиген – знову акцептор і потім  $-NH_2$  група – донор гідрогену. У зв'язку з тим, що кожен комплементарну пару можна розглядати у протилежному напрямку Т-А і Ц-Г, то й можливі чотири варіанти сполучень донорських та акцепторних угруповань у

Фосфатні групи складають ніби стінки великого і малого жолобів, а “краї” пуринових і піримідинових основ утворюють дно. Розрахунки свідчать, що  $\alpha$ -спіральні ділянки аргінінового гістону відповідають за розміри великої борозни молекули ДНК. Таким чином, аргініновий гістон локалізований у великому жолобі, а лізиновий – у малому і його роль полягає у нейтралізації фосфатних груп. На дні великої борозни йонізовані нітроген та оксиген можуть сполучатися водневими зв'язками з бічними ланцюгами амінокислотних залишків білків і відігравати важливу роль у процесі розпізнавання.

У пуринових і піримідинових основах, що утворюють

молекулі ДНК, що можуть розпізнаватися репресором чи іншими регуляторними білками.

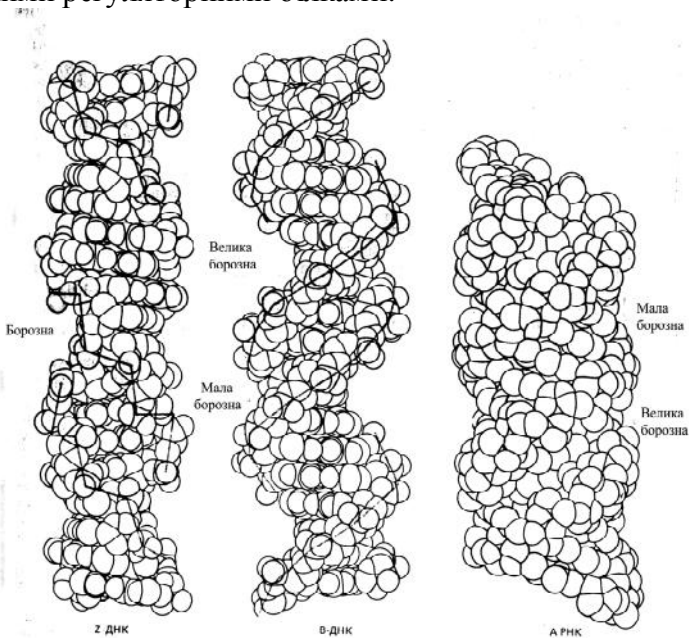


Рис. 1.10. Декілька типів двійної спіралі у нуклеїнових кислот

Отже, інформація, закована в ДНК у вигляді послідовностей азотистих основ, з боку великої борозни може бути розшифрована будь-якою іншою великою молекулою. Мала борозна менш інформативна й у В-формі ДНК вона відіграє іншу роль.

Цікавими у характеристиці вторинної структури ДНК є значні відхилення від середніх показників локальних значень кута спіралізації обертання. Так, локальні значення цього кута для В-форми ДНК коливаються від 28 - 42°, тоді як для А-форми – від 16 до 44°. На підставі цих даних формується думка, що послідовність залишків нуклеотидів впливає не тільки на генетичну інформацію, але й на регуляцію експресії, а локальний перехід

визначених регуляторних ділянок, скажімо, з правоспіральної В-комформації в лівоспіральну Z-форму може істотно впливати на доступність генетичної інформації та процес її зчитування.

Вторинна структура РНК вивчена недостатньо. Наявність гідроксилу біля другого атома карбону рибози унеможлиблює утворення подвійної спіралі В-типу. Найбільш імовірно, що вторинною структурою молекули тРНК є модель, запропонована Холлі, зображення якої за формою схоже на листок конюшини (рис.1.11).



Рис.1.11. Вторинна структура тРНК

Дослідження третинної структури ДНК вимагає одержання її в неушкодженному вигляді. Тепер виділені деякі ДНК вірусів, хлоропластів, мітохондрій. У людській хромосомі довжина двоспіральної молекули у витягнутому

стані могла б сягати 8 см, насправді її довжина 5 нм. Таке упакування досягається за рахунок суперспіралізації вторинної структури. Ступінь спіралізації (наявність додаткових супервитків чи суперспіралізації) встановлюється за зміною константи седиментації. Суперспіралі часто зустрічаються в кільцевих молекулах ДНК. Так, хромосома *E.coli* – це єдине замкнуте кільце. Кільцеві молекули закручуються самі на себе, утворюючи суперспіральні молекули із супервитками. Скручування подвійної спіралі самої на себе призводить до утворення суперскрученої правозакрученої структури.

Це явище називається негативною суперспіралізацією. У результаті цього на кожен супервиток припадає 20-25 витків подвійної спіралі. Завдяки цьому дуже довга молекула ДНК (1360 мкм в *E.coli* і 990 тисяч мкм у людини) упаковується в малому об'ємі бактеріальної клітини або в ядрі клітини еукаріот. Виділені фрагменти ДНК-гідролази (ДНК-топоізомерази), що здійснюють процес суперспіралізації та переводять суперспіралізовані структури в релаксований стан (ДНК-розплігачі). Процес суперспіралізації ДНК в еукаріот відбувається за участю гістонових білків, серед яких залежно від вмісту лізину й аргініну, розрізняють п'ять основних класів (табл. 1.1).

Таблиця 1.1.  
Вміст лізину й аргініну в гістонах, %  
(за Герасиментом В., 2006)

Гістон	Лізин	Аргінін
H1	24,80	2,60
H2a	10,90	9,30
H2b	16,00	6,40
H3	9,60	13,30
H4	10,80	13,70



Полікатійонна природа гістонів забезпечує взаємодію їх з поліанійонним пентозофосфатним каркасом і разом із водневими зв'язками стабілізує структуру ДНК еукаріот. На відміну від цього, у ДНК мітохондрій, хлоропластів та прокаріотичних клітин фактором стабілізації є неорганічні катіони, а не білок. Взаємодія ДНК з гістонами призводить до формування нуклеосів – структурних одиниць хроматину. Білковим ядром нуклеосом є октамер, побудований із гістонів H2a, H2b, H3, H4, на яких ззовні намотана ДНК, довжиною 200 нуклеотидних пар (680Å ДНК у В-формі) на глобулу гістонів. Всі транскрибуючі ділянки ДНК містяться у нуклеосом. Нуклеосоми з'єднані тяжем ДНК та з гістомом H1.

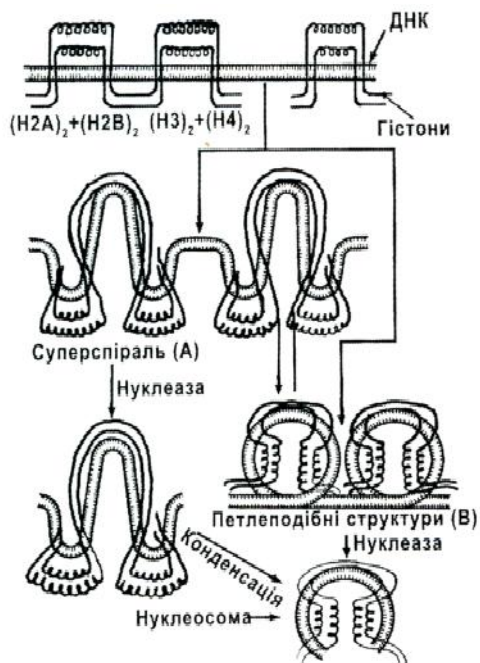


Рис.1.12. Схема будови нуклеосом хроматину (за Су Жей Лі)

Видалення цього гістону з хроматину несуттєво змінює структуру нуклеосоми, але утворюються ділянки ДНК, вільні від гістону Н1 (рис.1.12). При дискелектрофорезі нуклеосоми (мононуклеосоми) поділяються на дві дискретні смуги (МН1 і МН2). Гістон Н1 не зв'язаний безпосередньо з мононуклеосомою, але взаємодіє з прилеглою до неї мононуклеосомною ділянкою ДНК. Поряд з мононуклеосомою виявлено ди-, три- і субнуклеосоми, які різняться седиментаційними, електромікроскопічними та електрофоретичними характеристиками.

Суперспіралізовану молекулу ДНК можна перевести у відкриту (релаксовану) кільцеву форму, розірвавши один чи обидва ланцюги подвійної спіралі шляхом короточасної обробки ДНК-розплітаю. Релаксована форма молекули, що утворюється, седиментує повільніше.

В цілому ж, ДНК є динамічною структурою, що легко модифікується. Перехід суперспіральної форми ДНК у відкриту кільцеву молекулу є необхідним етапом процесу реплікації. Суперспіральна структура ДНК може бути виявлена розривом спіралі (одного чи обох ланцюгів) під впливом інтеркалюючих агентів. Це хімічні сполуки, що містять у своїй структурі залишки ароматичних вуглеводнів, які здатні вбудовуватися між ланцюгами подвійної спіралі ДНК, а це призводить до порушення водневих зв'язків між парами азотистих основ та розкручення подвійної спіралі.

Найчастіше як інтеркалюючі сполуки використовують етидій бромід, дацноміцин, профлавін, гікanton тощо. Спіралі ДНК містять інформацію двох типів, що кодується і зчитується по-різному: власне генетична інформація, що визначає структуру білка та інформація, що є свого роду "інструкцією" для вибіркового читання того чи іншого фрагмента запису.



Рис.1.13. Нуклеосома, яка складається з октамеру, що містить по дві молекули кожного з гістонів H3, H4, H2а, H2в

В основі збереження і реалізації інформації обох типів лежать фізико-хімічні процеси, багато в чому обумовлені функціональними групами, що входять до складу нуклеїнових кислот. Йонізовані фосфатні групи обумовлюють їхній негативний заряд, завдяки чому ДНК в організмі знаходиться у вигляді комплексів з білками, які несуть позитивний заряд (гістони і протаміни), поліамінами і катіонами.

Наявність вільних ОН-груп біля другого атома карбону рибозного залишку РНК значною мірою визначає конформацію полімерних макромолекул. Полярні групи  $=C=O$ ,  $=NH$ ,  $\equiv C-NH_2$  азотистих основ нуклеїнових кислот здатні утворювати водневі зв'язки з білками, а також між комплементарними азотистими основами у біспіральній структурі ДНК. У зв'язку з цим ДНК і РНК є реакційно здатними сполуками. Досить легко відбуваються реакції метилювання азотистих основ, завдяки чому уявлення про ДНК як про ланцюг, що містить тільки чотири види нуклеотидів, вважається спрощеним. Метильовані азотисті основи гідроксильються і виникають їх оксиметильні похідні. Метильовання і гідроксильовання метильних похідних мають біологічний сенс. Метильовання захищає ДНК від впливу ферментів при надходженні в клітину вірусів. Припускають, що метильовані азотисті основи є маркером деяких спеціальних ділянок генетичних копій.

Існують також А- і С- і Z-форми ДНК, які є рихлішими і, вочевидь, характерні для хроматину (рис.1.14). Існування ДНК у вигляді подвійної спіралі було підтвержене найновішими експериментами, в яких вимірювалося число пар на витку. Виявилось, що їх 10,4 замість 10,0, як передбачалося класичною В-формою. Ця різниця зумовлена необхідність дещо змінити значення кута повороту між сусідніми парами основ вздовж спіралі до  $34,6^\circ$ , так що відрізок спіралі, в межах якого здійснюється повний виток на  $360^\circ$ , став дещо довший.

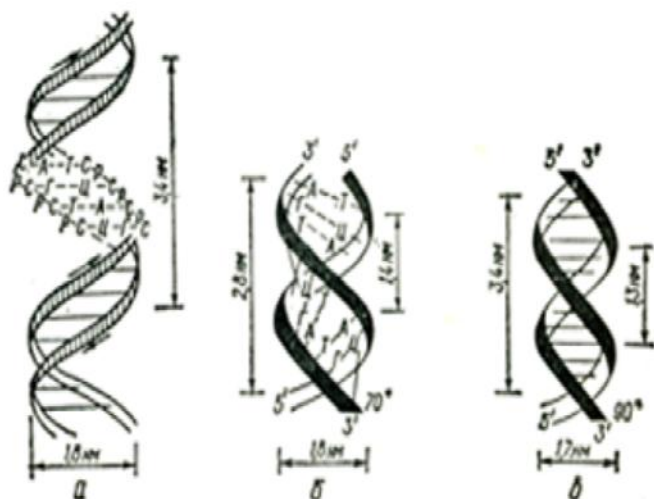


Рис.1.14. Форми ДНК:

а – за Дж. Уотсоном і Ф.Кріком; б - А-форма; в – В-форма  
(с – залишок дезоксирибози; р – залишок фосфатної кислоти)

Особливо важливо є те, що значення 10,4 є середнім для ДНК як цілої молекули при певних умовах. Зміна умов або навіть послідовності окремих основ може призвести до більшого чи меншого закручування спіральної структури у відповідних ділянках. Дійсно, методом рентгеноструктурного аналізу було показано, що молекула із 12 пар містить

10,1 пар основ на виток, що зумовлює слабкий зсув кожної пари основ, за якого покращуються міжплощинні (стекинг) взаємодії між основами, порівняно з первісною моделлю.

У зв'язку з такими варіаціями ідея про існування єдиної структури ДНК змінилася на користь існування структур, кожна з яких має характерний тип. Тепер відомі такі форми ДНК (табл. 1.2). В-форма спіралі, для якої Уотсон і Крік побудували модель, характерна для волокон ДНК при дуже високій відносній вологості (92%) і в розчинах низької йонної сили. Вважається, що якраз в такій формі ДНК міститься в живій клітині.

Таблиця 1.2.  
Основні характеристики окремих форм ДНК  
(Б.Льюїс, 1987)

Тип спіралі	Число пар основ на виток	Кут обертання однієї пари* (градуси)	Віддаль між парами основ (Å)	Діаметр спіралі (Å)
A	11	+32,7	2,56	23
B	10	+36,0	3,38	19
C	9 1/3	+38,6	3,32	19
Z	12	-30,0	3,71	18

\*- кут обертання позначений знаком (+) у випадку правосторонньої спіралі і знаком (-) у випадку лівосторонньої спіралі.

A-форма спіралі виявлена у волокнах ДНК при 75% вологості в присутності йонів натрію, калію, цезію, що несуть протилежний заряд. Якщо основи у B-формі розташовуються строго перпендикулярно до осі спіралі, то в A-формі вони нахилені та їх число на виток більше. A-форма важлива з біологічної точки зору, її конфігурація є близькою до структури гібридів ДНК-РНК.

C-форма утворюється, коли ДНК знаходиться в ядрі понад 66% вологості в присутності йонів літію. У неї менша кількість пар основ на витках, ніж у B-ДНК.

Z-форма є найбільшим контрастом щодо класичної структури. Ця форма лівозакручена, має більше число пар основ на виток, тобто найменше закручена і ще тонша. Свою назву дана форма одержала внаслідок зигзагоподібних (zigzag) ліній, які утворює вуглеводно-фосфатний кістяк уздовж спіралі. Існує ще SBS-форма (side by side – бік у бік), яка позбавлена взаємозакрученості ланцюгів у подвійній спіралі. Для біотехнології це важливо з точки зору біосинтезу ДНК.

Звичайно, що *in vivo* структура ДНК є не ізольована, а зв'язана з білками, які справляють значний вплив на можливість переходу із B-форми, наприклад, у Z-форму. Так, ДНК, що зв'язана з гістонами (основні хромосоми та білки еукаріотичного ядра), не переходить із однієї форми в іншу в тих умовах, коли це спостерігається у вільної ДНК. Таким чином, однією із умов, необхідних для утворення Z-ДНК *in vivo*, мабуть, є присутність особливих білків, що стабілізують їх структуру. Вважається, що більшість клітинної ДНК є у B-формі, тільки окремі короткі ділянки спіралі переходять в інші форми. Наприклад, відомо, що при певних умовах ділянка у 26-32 дуплетів Г-Ц може переходити в Z-форму, тоді як ДНК з обох боків Ц-Г залишається в класичній B-формі. Одержано антитіла, здатні відрізнити Z-форму від B-форми. Ці антитіла зв'язуються з відповідними хромосомами *Drosophila melanogaster*. Реакцію легко спостерігати за будовою цих хромосом. У них більш щільні ділянки (диски) контрастують із менш щільними (міждиски). Ділянка Z-ДНК локалізована у міждисках.

Вуглеводно-фосфатні сполуки розміщені назовні молекули, азотні ж основи – всередині. Головне в цій догмі

Уотсона-Кріка є те, що вона показала направленість спадкової інформації:

ДНК → РНК → Білок

Стабілізація вторинної структури ДНК забезпечується не лише водневими зв'язками, а й силами Ван-Дер-Ваальса, стекінг-взаємодіями, які виникають між площинами азотистих основ, що розміщуються в молекулі ДНК одна над одною. У ДНК-хромосом подвійна спіраль ДНК може порушуватись у місцях локалізації паліндромів (зворотних повторів), які читаються однаково в обох напрямках. Комплементарні основи паліндромів можуть з'єднуватись, утворюючи шпильки та хрестоподібні структури, що дає змогу регуляторним білкам пізнавати місце початку транскрипції.

Третинна структура ДНК утворюється внаслідок додаткового скручування в просторі двоспіральної молекули і має вигляд суперспіралі. В клітинах прокариот ДНК організована в одній хромосомі, що вкладається у вигляді суперспіралізованих петель чи одно- чи дволанцюгових кільцевих молекул. У клітинах еукаріот ДНК знаходиться в складі хроматину у вигляді надмолекулярних структур - нуклеосу, соленоїдів тощо. Фізико-хімічні властивості ДНК визначаються її високою молекулярною масою та особливостями структури. Для ДНК характерні колоїдні, оптичні, осмотичні властивості, висока в'язкість розчинів, здатність до денатурації. При нагріванні ДНК її подвійна спіраль роз'єднується, тобто відбувається денатурація. Термічну денатурацію ще називають плавленням. Температура плавлення ДНК залежить від наявності Г-Ц-пар. При повільному охолодженні розчину відбувається ренатурація молекули. На цьому ґрунтується метод вивчення структурної організації генетичного апарату та молекулярно-генетичних аспектів еволюції.

ДНК - речовина білого кольору волокнистої структури, погано розчинна у воді. Солі її лужних металів, навпаки, добре розчинні у воді. Розчини ДНК мають досить високу в'язкість, оптично активні - повертають площину поляризації світла вправо. В'язкість розчинів та оптична активність зменшуються при зниженні ступеня впорядкованості подвійної спіралі ДНК. Для ДНК характерною є здатність до поглинання світла при 260 нм в ультрафіолетовій ділянці спектра. Порушення нативності молекули супроводжується підвищенням поглинання світла, тобто для ДНК характерним є гіпохромний ефект. Гіпохромний ефект залежить від наявності в складі ДНК А-Т-пар.

За підвищеної температури (в межах незначного температурного інтервалу) дволанцюгова молекула ДНК дестабілізується, ланцюги розходяться і розриваються зв'язки між парами комплементарних основ. Це явище називається денатурацією, або плавленням. Температура, при якій ДНК денатурована на 50%, називається температурою плавлення. Температура плавлення ДНК різних організмів різна і залежить від співвідношення А-Т- і Г-Ц-пар (чим більший вміст Г-Ц-пар, тим вища температура плавлення, що, можливо, пов'язано із взаємодією пурин-піримідинових основ у ДНК. Молекула ДНК за денатурації набуває форми безладно згорнутого клубка (перехід "спіраль-клубок"). За швидкого охолодження розчину денатурованої ДНК ланцюги залишаються в дестабілізованому стані, за повільного - може відновитися нативна структура ДНК. Такий вид ренатурації називається молекулярною гібридизацією.

Для ДНК характерні певні хімічні властивості. Це, насамперед, взаємодія з нітратною кислотою, внаслідок чого аденін перетворюється на гіпоксантин. Нітрозаміни та гідроксиламін сприяють заміні одних азотистих основ іншими, у зв'язку з чим вони виявляють мутагенну дію. В



кислому та лужному середовищах відбувається гідроліз нуклеїнових кислот. Характерними для ДНК є також хімічні реакції певних функціональних груп. Так, аміногрупи азотистих основ можуть взаємодіяти з нітритною кислотою. При цьому групи  $-NH_2$  заміщуються на групу  $-OH$ . Отже, нітритна кислота при взаємодії з нуклеїновими кислотами перетворює цитозин на урацил, а аденін і гуанін - на гіпоксантин і ксантин, тому ця кислота є ефективним хімічним мутагеном. Аналогічну мутагенну дію має гідроксиламін, який взаємодіє з карбонільними групами азотистих основ, зокрема з піримідиновими, що призводить до перетворення одного виду основ на інші. Крім того, високу мутагенну дію мають алкілюючі агенти, наприклад нітрозамін:  $(R)_2N=N=O$ . Ці сполуки виявляють сильну канцерогенну дію. Нітрозаміни можуть утворюватись при взаємодії будь-якого вторинного аміну з нітритною кислотою.

Така реакція може відбуватися в шлунку людини, де нітрозаміни легко всмоктуються і можуть спричинювати утворення злоякісних пухлин у різних органах і тканинах організму. Значний інтерес становить взаємодія нуклеїнових кислот з окремими поліциклічними ароматичними (основними) барвниками, зокрема з акридиновим оранжевим, профлавіном тощо. Вибірково зв'язуючись з ДНК або РНК, вони дають можливість легко їх виявляти. Нині ці барвники використовуються як мутагени, які мають селективну дію. Вони здатні викликати "вставки", або делеції (включення або випадання окремих нуклеотидів) за реплікації ДНК, отже, її пригнічувати.

Модель структури ДНК Дж.Уотсона і Ф.Кріка дозволяє пояснити молекулярні механізми генетичної рекомбінації, яка є важливою функцією ДНК. Зі сучасних позицій рекомбінація двох хромосом може розглядатися як обмін ділянками між двома дволанцюговими молекулами ДНК. Рекомбінація проходить в тих ділянках

взаємодіючих хромосом, де їх нуклеотидні послідовності близькі або ідентичні.

Важливе значення для обґрунтування молекулярних механізмів рекомбінації є відомості про ферменти, які необхідні для реалізації рекомбінації. До них відносяться, в першу чергу, ендонуклеази, ДНК-полімерази тощо. Дані про участь в рекомбінації одних і тих же ферментів були вперше одержані в 1965 році А.Кларком, який відкрив Рес мутанти *E.coli*, що нездатні до генетичної рекомбінації.

Реплікація ДНК (редуплікація, автореплікація) – біосинтез дочірніх ланцюгів ДНК на вихідній матриці, що обумовлює точне відтворення генетичної інформації. У середовищі для реплікації одночасно з ДНК-полімеразою I має бути повний набір дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатів ( $\alpha$ -АТФ,  $\alpha$ -ІТФ,  $\alpha$ -ТТФ,  $\alpha$ -ЦТФ), йони магнію, затравочний ланцюг з вільним 3'-ОН-кінцем (роль затравки виконує попередній ланцюг ДНК чи РНК), матричний ланцюг, у ролі якого може бути одно- або дволанцюгова ДНК.

Синтез полінуклеотидного ланцюга здійснюється в результаті нуклеофільної атаки 3'-ОН-кінцем матриці найближчого до рибозного залишку атома фосфору лише того дезоксирибонуклеозидтрифосфату, основа якого комплементар-на відповідній основі матричного ланцюга. При цьому утворюється фосфодіестерний зв'язок і вивільнюється ФФн. Елонгація ланцюга відбувається в напрямку 5'→3'. Впродовж 1 с молекула ДНК-полімерази I подовжує ланцюг орієнтовно на 10 нуклеотидних залишків. Цей фермент виявляє також 3'→5' - ендонуклеазну і 5'→3'-нуклеазну активність. Згодом було виявлено ДНК-полімерази II і III. Вони, як і ДНК-полімераза I, здійснюють синтез ДНК (рис.1.15), розпочинаючи з 3'-ОН-затравочного кінця в напрямку 5'→3', користуючись для цього тими ж таки дезоксирибонуклеозидтрифосфатними попередни-ками.

Крім того, ДНК-полімераза III бере участь в синтезі більшої частини новоутвореної ДНК. За допомогою ДНК-полімераза I видаляється затравка і заповнюються прогалини. Про біологічну роль ДНК-полімерази II поки що мало відомостей. ДНК-лігаза каталізує утворення фосфодіетерного зв'язку при наявності вільної ОН-групи в етерному зв'язку 3'-кінця ланцюга ДНК і фосфатної групи в 5'-кінці цього ж ланцюга у складі двоспиральної структури ДНК. Завдяки цьому усуваються одноланцюгові розриви. ДНК-лігаза потрібна також для нормального синтезу ДНК, репарації її пошкоджень для з'єднання (сплайсинг) ланцюгів для добування рекомбінантних ДНК.

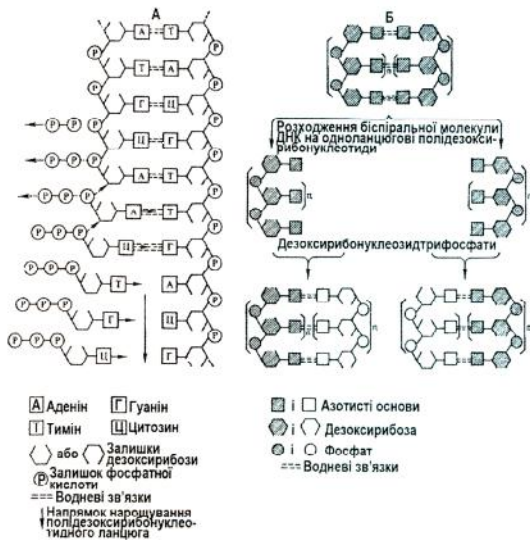


Рис.1.15. Схема матричного біосинтезу нуклеїнових кислот (А) і подвоєння молекул ДНК (Б) при їх реплікації.

Місце реплікації ДНК має точну локалізацію. В ДНК E.coli таким місцем є унікальна послідовність поблизу гена *ilv*. Ділянка, в якій одночасно відбувається розплітання і реплікація ДНК, називається реплікаційною вилкою, від

якої одночасно у двох протилежних напрямках відбувається біосинтез дочірних ланцюгів ДНК. ДНК-полімерази I, II і III синтезують дочірні ланцюги ДНК у напрямі 5'→3'. Дочірній ланцюг, який синтезується в напрямку 5'→3', називають провідним. Він синтезується безперервно. Ланцюг, що складається з фрагментів Оказакі, називають відстаючим.

Він також синтезується в напрямі 5'→3'. У процесі синтезу фрагменти Оказакі сполучаються між собою за допомогою ДНК-лігази, що дає змогу мати загальний ріст ланцюга 3'→5'. При цьому процес синтезу і провідного, і фрагментів Оказакі відстаючого ланцюгів ДНК розпочинається з 3'-кінця РНК-затравки, що містить вільну ОН-групу. Процес синтезу короткого ланцюга (близько 10 нуклеотидів) РНК-затравка на матриці одного з ланцюгів ДНК каталізується особливою РНК-полімеразою (праймазою), яка не вимагає затравки.

3'-ОН-кінцева група затравки використовується надалі для нарощування ланцюга ДНК за допомогою ДНК-полімерази III, а олігонуклеотидний фрагмент РНК-затравки гідролізується ДНК-полімеразою I. З участю цього ферменту заповнюються відповідними нуклеотидними послідовностями, утвореними після видалення РНК-затравки прогалини, ДНК-лігаза зшиває кінці фрагментів.

Умовою реплікації є необхідність розплітання подвійної спіралі батьківської ДНК у ділянці реплікованої вилки за участю ферменту гер (гелікази). Позитивні супервитки, що виникають при розплітанні кільцевої ДНК, долаються за участю ферменту ДНК-гірази.

Біосинтез РНК (транскрипція), матричний синтез РНК на ДНК, який здійснюється РНК-полімеразами. У клітинах прокариот процес каталізується однією РНК-полімеразою. У клітинах еукаріот до складу транскрипційного апарату входять три РНК-полімерази, одна з яких (РНК-полімераза

II) транскрибує гени, що кодують білки. РНК-полімераза I бере участь в біосинтезі рибосомальної РНК, а РНК-полімераза III – в синтезі низькомолекулярних РНК (рРНК, тРНК тощо). Процес транскрипції, початок якого визначається специфічною послідовністю нуклеотидів ДНК (промотор) відбувається у напрямі 5'→3'.

В міру руху РНК-полімерази ланцюг РНК, що зростає, відходить від матриці і подвійна спіраль ДНК позаду ферменту відновлюється. Для високоефективної ініціації (початку) часто вимагається приєднання до промотора білків позитивного контролю (наприклад, білка-активатора катаболізму). У прокариот у регуляції на етапі ініціації можуть брати участь білки-репресори, близькі до точки початку транскрипції ділянки (оператори). Деякі знаки кінця транскрипції (термінатори) пізнаються самою РНК-полімеразою, у розпізнаванні інших бере участь особливий термінуючий білок “*rho*”. У регуляції транскрипції на етапі термінації беруть участь ще й білки-антитермінатори та компоненти білкового синтезу. В еукаріот існують самостійні РНК-полімерази. Закінчення транскрипції визначається другою послідовністю ДНК (сигнал термінації). РНК-полімерази мають орієнтовно однакову молекулярну масу, яка сягає 500000, проте будова прокариотичної РНК-полімерази простіша.

До її складу входять п'ять поліпептидних ланцюгів, тоді як РНК-полімераза еукаріотичних клітин складається з 9-11 поліпептидних субодиниць. На вміст РНК-полімераз у клітині впливає швидкість росту. В одній клітині вищих еукаріот є біля 40000 молекул РНК-полімераз I і II. Кількість молекул РНК-полімерази I приблизно вдвоє менша (Б.Альбертг, Д.Брей, Дж. Льюїс та ін., 1986). Середня довжина нуклеотидної послідовності, синтез якої відбувається за участю РНК-полімерази II на транскрипційній одиниці, становить 8 кв.

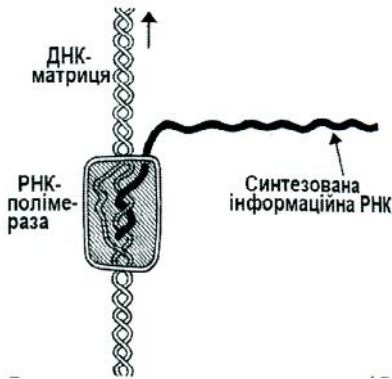


Рис.1.16. Схема процесу транскрипції ДНК РНК-полімеразою. Стрілка показує напрям, за яким ДНК-матриця рухається через молекулу РНК-полімерази.

Ця величина більша та у 5 разів перевищує обсяг інформації, який потрібний для синтезу білкової молекули середньої довжини (400 амінокислотних залишків), що свідчить про особливу будову генів еукаріот. Із клітин РНК, що міститься в цитоплазмі, 95-97% припадає на частку рибосомальної РНК, а близько 3-5%, або 360000 молекул, – на іРНК, тобто

одна молекула іРНК припадає на десять рибосом. В еукаріот під час реплікації ДНК і транскрипції РНК нуклеосомна організація нуклеотину зберігається. Взаємодія синтетичних молекул РНК з білками потрібна для забезпечення *процесингу* первинних РНК-транскриптів і наступного переміщення їх у цитоплазму (рис.1.16).

Полінуклеотидні послідовності, швидкість росту яких становить 30 нуклеотидів за 1 с і в біосинтезі яких бере участь РНК-полімераза II, утворюють фракцію гетерогенної ядерної РНК (гяРНК). Багато молекул цієї фракції перебувають в ядрі, зазнають ковалентних модифікацій, набуваючи при цьому функціональної специфічності. Процес ковалентної модифікації включає добудовування (*кепірування*) 5'-кільця РНК, синтезованого РНК-полімеразою II і приєднання до 3'-ОН-кінця цієї ж молекули РНК за допомогою полі(А)-полімерази поліпептидного фрагменту, який складається з 100-200 залишків аденозинмонофосфату. Наведені ковалентні модифікації, які зумовлюють утворення

первинного РНК-транскрипту, мабуть потрібні для нормального процесингу РНК і транспортування зрілих молекул іРНК з ядра в цитоплазму. Приблизно через 30 хвилин первинні транскрипти РНК-полімерази II виявляються в цитоплазмі. Загальна кількість їх становить 5% маси РНК, що входила до фракції гяРНК. Решта (95% первинних транскриптів РНК-полімерази II) впродовж години з часу їхнього синтезу руйнуються в ядрі.

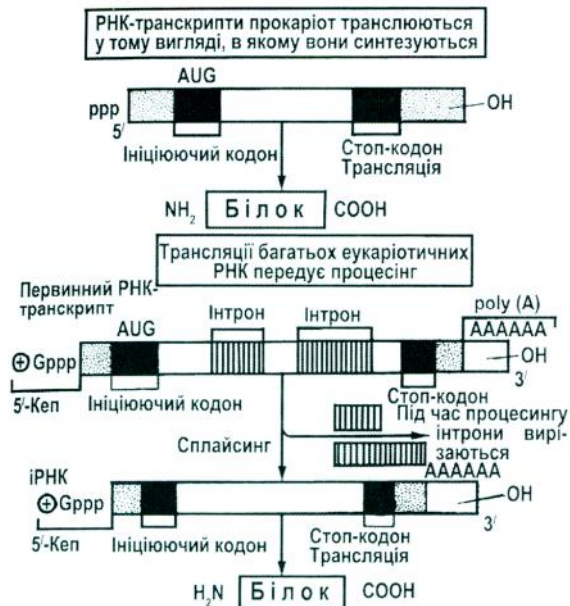


Рис.1.17. Схема первинної структури прокариотичних та еукаріотичних транскриптів

При цьому розміри первинних транскриптів РНК зменшуються з 6-8 кв (у фракції гяРНК) до 1,5 кв (у цитоплазматичній іРНК). Це досягається в ході процесингу РНК і перетворення її в зрілу іРНК у результаті вирізання некодуючих ділянок (*інтронів*) і кількість яких може досягати кількох десятків (більш як 50 у гені а-ланцюга

проколагену). Після видалення інтронних послідовностей кодуєчі фрагменти (*екзони*) РНК з'єднуються між собою встик (*сплайсинг*) й у вигляді зрілих іРНК, що становлять 1-2% нуклеотидних послідовностей геному, транспортуються в цитоплазму і транслюються. РНК-транскрипти прокаріот транслюються в тому вигляді, в якому вони синтезуються (рис.1.17).

Деякі білки (гемоглобін, міоглобін), що містяться в клітині у великих кількостях, кодуються генами, які у гаплоїдному геномі наявні лише як поодинокі екземпляри. У результаті трансляції, коли за участю однієї молекули іРНК упродовж хвилини утворюється близько 10 молекул білка, а за один оберт клітинного циклу більш як  $10^{14}$  білкових молекул. Якщо потреба в рибосомних і транспортних (рРНК, тРНК) нуклеїнових кислотах велика, вихід зі становища знаходять у збільшенні кількості копій генів, які кодують відповідні рРНК і тРНК. Розміщені гени у вигляді тандемних повторів, розділених нетранскрибуючими ділянками (*спейсерами*). Первинними транскриптами РНК-полімерази I при транскрибуванні генів рРНК є 45S-РНК (13 кв), з яких утворюється по одній молекулі 28S-РНК (близько 5 кв), 18S-РНК (2 кв) і 5,8S-РНК (0,16 кв), що використовуються при монтуванні рибосом. Певна кількість маси первинного транскрипту РНК-полімерази I (близько 6 кв) розщеплюється в ядрі. Місцем утворення рибосом є ядрце. Після виходу з ядра в цитоплазму процес дозрівання рибосом триває. У цитоплазмі РНК-полімеразою III транскрибуються *кластери* тандемно повторюваних генів 5S-РНК, а потім генів різних тРНК.



## **1.2. Біосинтез білка**

### **1.2.1. Генетичний код**

У зв'язку з відкриттям хімічної структури ДНК як носія генетичної інформації, змінилися класичні уявлення про хромосому. В світлі досягнень молекулярної біології та генетики можна собі уявити, що структурно кожна хромосома містить одну безперервну подвійну нитку ДНК, яка проходить по всій довжині хромосоми. Цим була не тільки підтверджена класична хромосомна теорія лінійного розташування генів у хромосомі, але й сам принцип лінійності одержав експериментальне обґрунтування на молекулярному рівні.

Послідовність азотистих основ відповідає первинній структурі ДНК одного ланцюга. Функціонально такий ланцюг розділений на велике число відрізків, які відповідають окремим генам, кожний з яких містить інформацію про первинну структуру поліпептидного ланцюга. В найпростішій схемі генетична інформація, закодована нуклеотидами ДНК, реалізується таким чином:

#### **Ген-Фермент-Блок.**

Але білки - це лінійні полімери, побудовані із 20 амінокислот, сполучених пептидними зв'язками. Первинна структура визначається чергуванням амінокислот у поліпептиді. Тому слід було з'ясувати, яким чином визначається первинна структура білків (ферментів). У кінці 1961 року Ф.Крік уперше дав визначення генетичного коду для білків. Воно стало фундаментом розробленої пізніше теорії зберігання і передачі генетичної інформації. В основу визначення був покладений принцип кодування амінокислот нуклеотидами ДНК. Ф.Крік

вважав, що кожна амінокислота білка визначається невеликою групою нуклеотидів.

У нуклеотидній послідовності повинно бути достатньо кодуєчих одиниць, щоб зашифрувати 20 амінокислот. Це означає, що кодове співвідношення повинно бути більшим від одиниці, тобто специфічність однієї амінокислоти детермінована більш ніж однією основою. Якби кодове число дорівнювало 2, і дві основи визначали одну амінокислоту, то в ДНК могло бути закодовано тільки  $4^2$ , тобто 16 типів амінокислот. Оскільки цього недостатньо, кодове співвідношення повинно бути не менше 3. Якщо генетичний код триплетний, кожній амінокислоті відповідає три розташованих поряд основи. Але число можливих триплетних комбінацій складає  $4^3$ , тобто 64. Існування триплетного коду передбачає, що або не всі триплети беруть участь у кодуванні амінокислот, або деякі амінокислоти кодуються більше ніж одним кодоном.

Триплетна природа генетичного коду продемонстрована у багатьох генетичних експериментах. Послідовність із трьох нуклеотидів, яка кодує одну амінокислоту, названа **кодоном**. Послідовність кодонів читається безперервно, розпочинаючи від фіксованої стартової точки на одному кінці гена і закінчуючи у точці термінації на другому кінці гена. Записана послідовність нуклеотидів умовно у напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця відповідає амінокислотній послідовності, записаній у напрямку від N-кінця до C-кінця.

В тому ж, 1961 році, в Національному інституті здоров'я (США) два біохіміки Х.Маттеї та М.Нірєнберг розробили метод одержання безклітинної системи із *E.coli*, в якій міг проходити синтез білка на іРНК, виділеній з різних клітин. Перед тим був встановлений дуже важливий факт, що на рибосомах *E.coli* синтезуються білки залежно від інформації як власної, так і чужої іРНК, виділеної із

організмів іншого виду. Це свідчило на користь універсальності генетичного коду й апарату білкового синтезу. Одночасно як контроль в безклітинну систему іРНК додавали подібні штучносинтезовані сполуки. На одній із матриць (полі-У) утворилась білковоподібна речовина, що складалася із однієї амінокислоти – фенілаланіну, зшита в довгий ланцюг. На основі триплетності коду Д.Маттеї і М.Ніренберг запропонували триплет УУУ, який кодує фенілаланін. Таким чином була прочитана перша літера генетичного коду. Тобто, триплет (кодон) ДНК ААА на мову РНК перекладається як УУУ, який кодує амінокислоту фенілаланін.

Американський біохімік С.Очоа у своїх дослідях використав метод М.Ніренберга з деякими змінами. Були використані штучні іРНК із урацилу і якого-небудь одного чи двох нуклеотидів, які синтезувалися за допомогою відкритого ним фермента полінуклеотидфосфорилази. В результаті досліджень С.Очоа, М.Ніренберга і Х.Маттеї до 1962 року знайдений був склад 23 триплетів, що містили урацил, хоча порядок основ у триплетах був невідомий. До кінця 1962 року були розроблені методи використання штучносинтезованих безурацилових іРНК. Кодова таблиця поповнилась ще 19 кодонами С.Очоа і майже такою ж кількістю кодонів М.Ніренберга.

До кінця 1969 року встановлено склад всіх 64 кодонів, 61 триплет кодує 20 амінокислот (табл.1.3), тобто в середньому кожна амінокислота може кодуватися трьома триплетами (звідси надлишковість, виродженість коду). Для генетичного коду характерні такі особливості: універсальність для всіх живих організмів; специфічність - кожній амінокислоті відповідають лише певні кодони, які не можуть бути використані для кодування іншої; виродженість - одна амінокислота кодується не одним, а кількома кодонами, переважно трьома, за винятком

аргініну, серину, лейцину (по 6 кодонів) та тирозину, гістидину, фенілаланіну (по 2 кодони). Виродженість коду виражається в тому, що основне навантаження несуть перші два нуклеотиди в триплеті, а третій не має особливого значення (теорія неоднозначної відповідності Ф. Кріка). Так, аланін кодується кодонами ГЦЦ, ГЦУ, ГЦА, ГЦГ.

Таблиця 1.3

Повний “словник” генетичного коду для амінокислот  
(за М.Nirenberg,1969)

3'-ОН-кінцевий нуклеотид	Середній нуклеотид								5'-ОН-кінцевий нуклеотид	
	У		Ц		А		Г			
У	УУУ	Фен	УЦУ	Сер	УАУ	Тир	УГУ	Цис	У	
	УУЦ		УЦЦ		УАЦ		УГЦ		Ц	
	УУА	Лей	УЦА		УАА	**	УГА		**	А
	УУГ		УЦГ		УАГ	**	УГГ		Три	Г
Ц	ЦУУ	Лей	ЦЦУ	Про	ЦАУ	Гіс	ЦГУ	Арг	У	
	ЦУЦ		ЦЦЦ		ЦАЦ		ЦГЦ		Ц	
	ЦУА		ЦЦА		ЦАА	ЦГА	А			
	ЦУГ		ЦЦГ		ЦАГ	ЦГГ	Г			
А	АУУ	Іле	АЦУ	Тре	ААУ	Асп	АГУ	Сер	У	
	АУЦ		АЦЦ		ААЦ		АГЦ		Ц	
	АУА		АЦА		ААА	АГА	А			
	АУГ	АЦГ	ААГ		Ліз	АГГ	Арг		Г	
Г	ГУУ	Вал*	ГЦУ	Ала	ГАУ	Асп	ГГУ	Глі	У	
	ГУЦ		ГЦЦ		ГАЦ		ГГЦ		Ц	
	ГУА		ГЦА		ГАА	ГГА	А			
	ГУГ		ГЦГ		ГАГ	ГГГ	Г			

\* - ініціюючий кодон;

\*\* - термінуючий кодон.

Звідси – правило виродженості коду: якщо два кодони мають два однакові перші нуклеотиди, а треті належать до одного класу (пуринів чи піримідинів), то вони кодуєть одну амінокислоту (виняток з правила - кодони АУА та УГА); колінеарність - відповідність лінійної послідовності кодонів іРНК й амінокислотних залишків у

білковій молекулі; однонапрямленість - кодони інформативні тільки в тому випадку, якщо зчитуються в одному напрямку - з першого до останнього (5'→3'); неперекривальність - кожний з триплетів не залежить один від одного і зчитується повністю, незалежно від наступного (після зчитування інформації з одного триплету механізм зчитування переміщується відразу на три нуклеотиди); безперервність - між триплетами немає розділових знаків, тобто код має лінійний безперервний порядок зчитування.

Існують дані, що свідчать про окремі відхилення від загальноприйнятих особливостей генетичного коду. Це стосується, зокрема, принципу універсальності - в мітохондріях виявлено власний генетичний код, в якому чотири кодони змінили свій зміст: УГА відповідає триптофану, АУА - метіоніну, а кодони АГА й АГГ стали термінуючими, тобто код зазнав деяких еволюційних змін, тому його універсальність має певні нюанси. Внесено корективи в поняття неперекривальності коду. У вірусів та бактерій виявлено, що одна й та ж ділянка ДНК може кодувати кілька різних білків за принципом зсуву рамки зчитування. Виявлено також ряд нових даних щодо безперервності коду: в генах еукаріот виявлено інтрони та екзони, мобільно дисперговані гени тощо.

Три кодони - УАА, УАГ і УГА – в нормальних умовах не кодують жодних амінокислот і називаються беззмисловими (нонсенс-кодонами). УАГ має назву амбер-кодон, УАА-охра-кодоном. Вказані кодони зупиняють синтез білка в клітині й називаються ще термінуючими. Сигнал для ініціації білкового синтезу подається трьома кодонами: ГУГ, АУГ і УУГ, які локалізовані в початковому (3'-кінець) відрізьку іРНК. Тому ці кодони названі кодонами ініціації та пізнаються особливим комплексом N-формілметіоніном-тРНК.

Узагальнити відомості про генетичний код можна таким чином:

1. Генетичний код є *триплетним кодом*. Триплетний код іРНК називається *кодоном*.

2. Генетичний код є *надмірним кодом*, тобто одній амінокислоті, як правило, відповідає більше ніж один кодон, за винятком АУГ для метіоніну й УГГ для триптофану. Специфічність кодону визначається головним чином його першими двома нуклеотидами. Що стосується третього нуклеотиду, який займає положення на 3'-кінці олігонуклеотидної структури, то його специфічність виражена слабше.

3. Нуклеотидна послідовність зчитується в одному напрямку підряд, триплет за триплетом. Кодони *не перекриваються*.

4. УАГ, УАА і УГА – кодони - *термінатори*.

5. Генетичний код універсальний, він єдиний для всіх організмів та вірусів.

Точність синтезу поліпептидного ланцюга досягається за рахунок комплементарного розпізнавання азотистих основ 5'→3'-орієнтованої послідовності кодон іРНК, що має 3'→5'-напрямок послідовності азотистих основ *антикодону* тРНК.

Важливим є той факт, що кількість аміноацил-тРНК-синтаз, які каталізують реакцію активування амінокислот, відповідає кількості різних видів амінокислот, з яких синтезуються білки; щодо тРНК, то їхня кількість як мінімум повинна досягати 32, тому що деякі амінокислоти здатні взаємодіяти з двома, а то й з трьома різними тРНК, які, у свою чергу, пізнають і зв'язують один, два чи навіть три кодони іРНК. Кодон-антикодонове пізнання (кодон розташовується на іРНК і має 5'→3'-орієнтацію, антикодон – на тРНК й орієнтований в напрямку 3'→5') передбачає відхилення від класичної взаємодії й утворення водневих

зв'язків між парами азотистих основ: А-Т, Г-Ц і А-У у ДНК і РНК. Це відхилення сформульоване Ф.Кріком у гіпотезі коливань, біологічний зміст якої має багато спільного з явищем виродженості генетичного коду.

**Гіпотеза коливань** зводиться до здатності третьої азотистої основи, розміщеної з боку 5'-кінця антикодона (тРНК), змінювати своє положення в просторі, тоді як дві перші основи, розміщені біля 3'-кінця антикодона, фіксовані більш жорстко. Доведено, що третьою основою від 3'-кінця антикодона може бути У, Г чи І (рибонуклеозид інозин, в якому роль азотистої основи виконує гіпоксантин). У таблиці 1.4 наведено можливі варіанти поєднання пар основ з урахуванням явища коливань. Якщо в антикодоні в положенні "коливання" перебуває гіпоксантин (у складі інозину), можливе розміщення й утворення водневих зв'язків трьох пар: І-А, І-Ц і І-І (однак така комплементарна взаємодія виявилась слабшою порівняно із взаємодією при утворенні звичайних пар: Г-Ц і А-У).

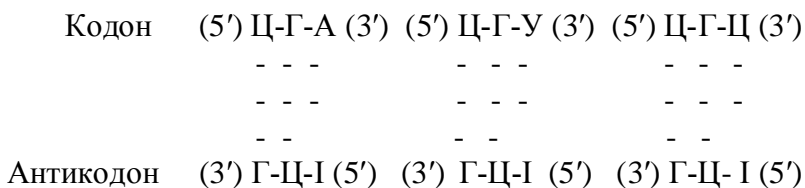
Таблиця 1.4

Можливі поєднання пар основ між 5'-кінцем антикодона (тРНК) і 3'-кінцем кодона (іРНК) згідно з гіпотезою коливань (Р.Бохінські, 1987)

Основа на 5'-кінці антикодона (тРНК)	Основа на 3'-кінці кодона (іРНК)
І	А, Ц або У
Г	Ц або У
У	А або Г
А*	У
Ц*	Г

\* - гіпотеза не допускає нових комбінацій, якщо ці основи перебувають в антикодоні.

У разі перебування в позиції “коливання” Г або У кількість можливих поєднань обмежуються двома: Г-Ц, Г-У і У-А, У-Г. Нові комбінації пар основ не виникають, якщо такими, що коливаються, є аденін та цитозин. У такому разі утворення зв’язків відбувається за класичним принципом: А-У і Ц-Г. Утворення слабких водневих зв’язків при кодон-антикодоновому розпізнаванні можна показати на прикладі однієї з аргінінових тРНК, антикодон якої (5')І-Ц-Г(3') здатний взаємодіяти з трьома різними аргініновими кодонами:



Перші дві основи кодонів (Ц-Г) утворюють тривкі (позначені трьома рисочками) уотсон-кріківські пари з відповідними азотними основами антикодона. Азотисті основи (А, У, Ц) аргінінових кодонів, що перебувають у третьому положенні, утворюють слабкі водневі зв’язки (дві риски) із залишком інозину (І) в антикодоні. Основи більшості кодонів, що перебувають у третьому положенні, мають певний ступінь свободи при утворенні із відповідними азотними основами антикодонів, тобто, за термінологією Ф.Кріка, вони є основами, що коливаються. Біологічний зміст явища коливання полягає в тому, що воно дає змогу звести до мінімуму помилки, що виникають. З іншого боку, завдяки слабкості зв’язків між основою, що коливається, і відповідною основою антикодона тРНК легше вивільнюється з комплексу з іРНК у процесі білкового синтезу. В процесі залучення в кодон-антикодонову взаємодію всіх трьох пар основ, міцність



зв'язку стала б моментом, що лімітує швидкість білкового синтезу через затримку вивільнення тРНК з комплексу з іРНК.

### 1.2.2. Етапи трансляції (біосинтезу білка)

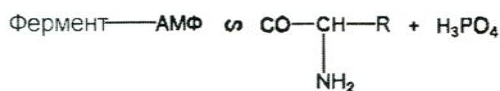
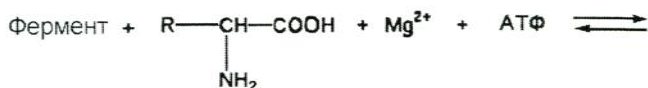
Це комплекс біохімічних реакцій, у ході яких відбувається активація амінокислот, ініціація поліпептидного ланцюга, його елонгація, термінація, упакування і процесинг. У процесі біосинтезу білка беруть участь близько 300 різних макромолекул. У клітинах еукаріот це понад 70 рибосомних білків, 20 ферментів активації амінокислот та більше 10 допоміжних ферментів, майже 100 ферментів, які беруть участь у дозріванні білків (процесингу). Кількість транспортних і рибосомальних РНК перевищує 70. Для зручності процес біосинтезу білка розглядається поетапно (табл.1.5):

Таблиця 1.5

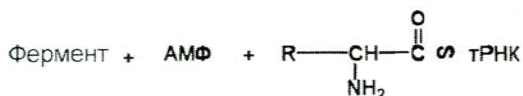
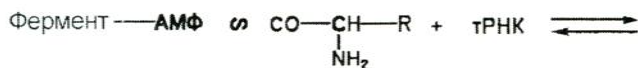
Етапи біосинтезу білка

Етапи трансляції	Компоненти
1. Активація амінокис-лот	20 амінокислот, 20 аміноацил-тРНК-синтез, 20 тРНК, АТФ, Mg <sup>2+</sup>
2. Ініціація поліпептид-ного ланцюга	іРНК, N-формілметіонін-тРНК, ініціюючий комплекс в іРНК, 30S-рибосомна субчастина, 50S-рибосомна субчастина в ГТФ, Mg <sup>2+</sup> , фактори ініціації (IF1, IF2, IF3)
3. Елонгація	70S-рибосома, ініціюючий комплекс, набір, аміноацетил-тРНК, що відповідають кодонам іРНК, Mg <sup>2+</sup> , фактори елонгації (Tu, Ts, G), ГТФ пептидил-трансфераза
4. Термінація	АТФ, який термінує кодон іРНК, фактори звільнення поліпептиду (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , S).
5. Упаковка і процесинг	Специфічні ферменти і кофактори

Рекогніція (упізнавання), стадія підготовки амінокислот до процесу трансляції. Складається з двох етапів – взаємодії амінокислот з АТФ і утворення аміноацил-аденілатів та взаємодії останніх з тРНК, яка завершується утворенням аміноацетил-тРНК-синтетаз, які за міжнародною номенклатурою мають назву аміноацил-тРНК-лігази. Кожній амінокислоті відповідає як мінімум одна аміноацил-тРНК-синтетаза, тому мінімальна їх кількість для клітин дорівнює 20. Кожна індивідуальна аміноацил-тРНК-синтетаза має елементи структури, які дають змогу впізнавати дану амінокислоту, причому ці ділянки молекул не співпадають з ділянками для впізнавання тРНК. Аміноацил-тРНК-синтетази, спеціалізовані на одній і тій же амінокислоті, можуть бути неоднаковими в різних відділах клітин (наприклад, у цитоплазмі та мітохондріях). У реакції активування амінокислот беруть участь йони магнію на стадії утворення аміно-ацетиладенілатів. Схематично активацію амінокислот і весь процес рекогніції можна представити так:



Фермент-аміноациладенілатний комплекс



Молекули тРНК відіграють роль кінцевих адапторів, що перекладають інформацію, укладену в нуклеотидній послідовності іРНК, на мову білка. Не менше значення в процесі декодування має також другий набір адапторів – молекули аміноацетил-тРНК-синтетаз. Таким чином, генетичний код розшифровується за допомогою двох взаємозалежних адапторів, що здійснюють високо-специфічну функцію, у результаті чого кожна амінокислота може займати місце, визначене її триплетною нуклеотидною послідовністю в молекулі іРНК, тобто своїм кодоном.

На етапах ініціації поліпептидного ланцюга, елонгації та термінації для здійснення реакцій білкового синтезу необхідні рибосоми. Це органоїди клітини, які здійснюють біосинтез білків. Рибосоми за структурною організацією є органелами складної форми діаметром біля 20 нм, які складаються із двох неоднакових субчастинок – великої і малої, на які може дисоціювати. Розрізняють два типи: еукаріотичні (з константами седиментації: цілої рибосоми – 80S, малої субодиниці - 40S і великої - 60S) і прокаріотичні (відповідно 70S, 30S і 50S)(рис.1.18). Крім того, у мітохондріях та хлоропластах містяться дрібні рибосоми (константа седиментації 55S - 70S), які здійснюють автономний синтез білка. У бактеріальній клітині міститься  $10^4$ - $10^5$  рибосом. До складу рибосом входить рРНК (3 молекули в прокаріот і 4 – в еукаріот) та білки. Молекули рРНК складають 55-65% маси рибосом й утворюють її структурний каркас. Кожний із білків рибосоми представлений у ній однією молекулою, тобто на одну рибосому припадає кілька десятків різних білків (біля 55 для рибосоми прокаріот і біля 100 для рибосом еукаріот).

Більшість білків специфічно зв'язані з певною ділянкою рРНК. Деякі білки – так звані фактори ініціації

(початку), елонгації (подвоєння), термінації (закінчення) – входять лише до складу рибосоми і лише під час біосинтезу білка. За відсутності біосинтезу білка субодиноці рибосоми перебувають у стані динамічної рівноваги з цілими рибосомами. На початку трансляції з малою субчастиною зв'язується іРНК, формілметіоніл-тРНК і фактори ініціації; згодом цей комплекс приєднується до великої субчастини. Зв'язок є досить міцним і зникає тільки після термінації. Асоціація виділених субчастинок рибосоми відбувається лише за наявності двовалентних катіонів, у фізіологічних умовах у ній бере участь  $Mg^{2+}$ .

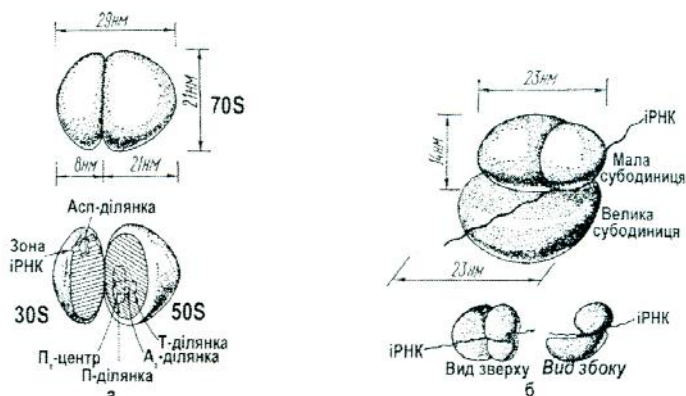


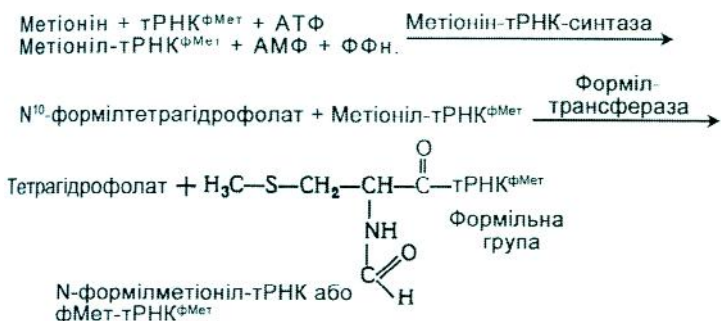
Рис.1.18. Схема будови рибосом: а) рибосома бактерії та її субодиноці (50S і 30S); рибосома печінки та її субодиноці (60S і 40S).

Рибосома має специфічні місця для приєднання аміноацетил-тРНК, пептидил-тРНК, місця утворення пептидного (амідного) зв'язку та гідролізу гуанозинтрифосфату, що забезпечує поступове ковзання рибосоми уздовж молекули іРНК при синтезі поліпептидного ланцюга. Одну молекулу іРНК можуть транслювати одночасно декілька рибосом, утворюючи

комплекс – полірибосому (полісому). Кількість полірибосом у клітині вказує на інтенсивність біосинтезу білка. В еукаріотичних клітинах частина рибосом зв'язана зі спеціальними білками великої субодиниці, з мембранами ендоплазматичної сітки.

Ці рибосоми синтезують в основному білки, які надходять у комплекс Гольджі й секретуються клітиною. Рибосоми, розташовані у гіалоплазмі, синтезують білки для власних потреб клітини. В еукаріот рибосоми утворюються в ядрі. На ядерцевій ДНК синтезуються попередники рРНК, які покриваються рибосомальними білками, що надходять із цитоплазми, розщеплюються до потрібних розмірів і формують рибосомальні субчастини, які надходять у цитоплазму. Повністю створених рибосом у ядрі немає. Основну масу клітинної РНК складає рРНК. Вона обумовлює базофільне забарвлення ядерця та ділянки ергастоплазми.

Ініціація поліпептидного ланцюга – складний тристадійний процес утворення ініціюючого комплексу. В E.coli та інших прокариот N-кінцевою амінокислотою при формуванні поліпептидного ланцюга є залишок N-формілметіоніну. Формілований метіонін дістають в результаті двох послідовних реакцій. Існує дві тРНК (тРНК<sup>мет</sup> і тРНК<sup>фмет</sup>), які здійснюють акцепцію метіоніну. Фермент формілтрансфераза (трансформілаза) не може формілувати метіонін, що перебуває у вільному стані. Проте, і в комплексі з тРНК не завжди можливе формілування залишку метіоніну. Реакція відбувається лише у тому випадку, коли тРНК виявляється специфічною тРНК<sup>фмет</sup>.



Комплекс метіоніну з другою тРНК-метіонін-тРНК (тРНК<sup>Met</sup>) не формілується, і використовується для включення метіоніну у внутрішні ділянки синтезованого поліпептидного ланцюга. Хоча первинна структура тРНК<sup>fMet</sup> і тРНК<sup>Met</sup> різна, для них антикодон УАГ є загальним, завдяки чому обидві тРНК здатні взаємодіяти з кодоном іРНК. Проте антикодоновий триплет ФMet-тРНК<sup>fMet</sup> взаємодіє з кодоном у тому разі, коли останній розміщений на початку кодуючої послідовності іРНК. Розміщення кодона АУГ у середині нуклеотидної послідовності іРНК передбачає взаємодію з ним неформілованого Met-тРНК<sup>Met</sup>. Наявність N-формільної групи в залишку метіоніну в складі ініціюючого комплексу ФMet-тРНК<sup>fMet</sup> зумовлює його взаємодію з особливим місцем ініціації на рибосомі. Блокування аміногрупи метіоніну формільним залишком перешкоджає включенню такої амінокислоти у внутрішні ділянки поліпептидного ланцюга.

У поліпептидних ланцюгах, синтезованих у рибосомах еукаріотичних клітин N-кінцевою амінокислотою, завжди є метіонін, що включається за допомогою спеціальної ініціюючої метіоніл-тРНК. У мітохондріях і хлоропластах еукаріот, так само як і в бактерій, синтез білка розпочинається з N-

форміліметіоніну, що підтверджує точку зору про походження цих субклітинних структур від бактерій. У результаті взаємодії 30S субчастини і фактора ініціації IF3 утворюється структура, в якій IF-3 перешкоджає її активації з 50S-субчастиною. Приєднання до 30S-субчастини іРНК досягають з допомогою ініціюючого сегмента, який є збагаченою пуриновими основами (А, Г) послідовністю, центр якої міститься орієнтовно на відстані 10 нуклеотидів від 5'-кінця ініціюючого кодона (5')АУГ (3')іРНК, у зв'язку з цим трансляція не може розпочатися безпосередньо на 5'-кінці іРНК.

Перший кодон, що транслюється, розміщується на відстані 25 нуклеотидів від 5'-кінця. Ініціюючий сегмент іРНК, представлений 6-10 нуклеотидами, в результаті взаємодії з комплементарною послідовністю нуклеотидів, розміщених з 3'-кінця 16S-РНК 30S субчастинки, сприяє фіксуванню іРНК у потрібному для ініціації трансляції положенні. Завдяки цьому забезпечується правильне розміщення ініціюючого кодону АУГ на 30S-субчастинці. До комплексу, що складається з 30S-субчастинки, фактора IF-3 та іРНК приєднується білковий фактор ініціації IF2, що раніше зв'язався з N-форміліметіоніл-тРНК<sup>ФМет</sup> і ГТФ (2-га стадія). У результаті приєднання до 50S-рибосомальної частини комплексної сполуки, що складається з 30S-субчастинки, білкового фактора ініціації IF-3, іРНК, ГТФ, білкового фактора ініціації IF-2, N-форміліметіоніл-тРНК<sup>ФМет</sup> утворюється функціонально ефективна 70S-рибосома. Під час її утворення, на стадії приєднання 50S-частинки, зв'язана з IF-2 молекула ГТФ гідролізується до ГДФ і Фн, які разом з IF-3 і IF-2 складають комплекс. Точне місце початку синтезу білка (кодон АУГ, генетичний сигнал ініціації) визначається в результаті здвоєння послідовності азотистих основ з боку 5'-кінця кодона АУГ іРНК з нуклеотидною послідовністю

3'-кінця 16S-рРНК 30S субчастинки, а також комплементарною взаємодією кодона АУГ іРНК з антикодоном (3')УАЦ(5')N-формілметіоніл-тРНК<sup>ФМет</sup>. Правильне розміщення у функціонально активному ініціюючому 70S-комплексі N-формілметіоніл-тРНК<sup>ФМет</sup> досягають в результаті приєднання останнього до пептидної ділянки (Р-ділянки) 70S-комплексу. Другу ділянку приєднання аміноацил-тРНК називають аміноацильною. Утворюється вона при взаємодії специфічних ділянок 30S- і 50S-субодиниць. У такому стані (Р-ділянка зайнята ініціюючою ФМет-тРНК<sup>ФМет</sup>, А-ділянка - вільна) ініціюючий комплекс готовий до продовження процесу трансляції.

Елонгація (видалення), фаза в синтезі білка, локалізована в рибосомі; є триетапним багаторазово повторюваним циклом. На першому етапі молекула аміноацил-тРНК, приєднується до А-ділянки рибосоми. На другому етапі утворюється новий пептидний зв'язок. Третій етап характеризується переміщенням рибосоми вздовж ланцюга іРНК на відстань трьох нуклеотидів і встановлюється в положенні, зручному для повторення циклу. При взаємодії ГТФ з одним із трьох факторів елонгації – Tu, які є білками цитоплазми, утворюється комплекс ГТФ-Tu. Аміноацил-тРНК, взаємодіючи з ГТФ-Tu, утворює потрійний комплекс аміноацил-Tu-ГТФ, який вводиться у вільну А-ділянку 70S-рибосоми і зв'язується з нею. Опісля ГТФ гідролізується і з 70S-рибосоми елімінується у Tu-ГДФ-комплекс.

Залишок ГДФ з комплексу витісняється іншим фактором елонгації Ts. Новий комплекс Tu-Ts руйнується під впливом ГТФ, а утворений ГТФ-Tu знову доставляє комплементарну аміноацил-тРНК у звільнену А-ділянку 70S-рибосоми. До початку другої стадії циклу елонгації Р-ділянка виявляється зайнятою ФМет-тРНК<sup>ФМет</sup>; в А-



ділянці розміщується відповідна аміноацил-тРНК. Залишки амінокислот вступають в реакцію утворення пептидних зв'язків.

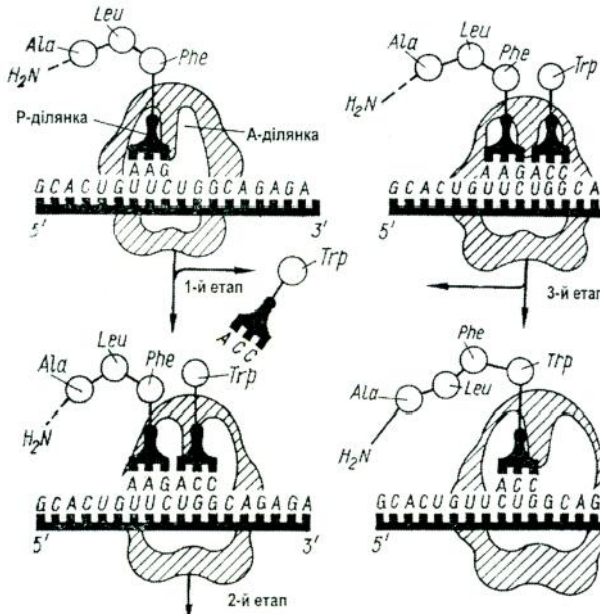


Рис.1.19. Фази елонгації у синтезі білка.

Цю реакцію каталізує пептидилтрансфераза, яка є одним з білків 50S-субодиниці. Активний залишок формілметіоніну, розміщений у Р-ділянці, переноситься на аміногрупу аміноацил-тРНК, що займає А-ділянку (рис.1.19).

Утворена в результаті цієї реакції нова сполука (дипептидил-тРНК), що включає залишки двох амінокислот, сполучених пептидними зв'язками, розміщується в А-ділянці. У Р-ділянці залишається звільнена від активного амінокислотного залишку ініціююча тРНК<sup>ФМет</sup>. Третя стадія – **транслокація**, пов'язана з трьома переміщеннями. У зв'язку з

переміщеннями 70S-рибосоми на відстань один кодон вздовж іРНК у напрямі її 3'-кінця розміщена в А-ділянці дипептидил-тРНК переміщується в Р-ділянку, в результаті чого розміщена там тРНК відокремлюється від Р-ділянки і переходить у цитоплазму. Отже, в Р-ділянці виявляється дипептидил-тРНК, одночасно А-ділянка підготовлена до зв'язування чергової аміноацил-тРНК. Розпочинається новий тристадійний цикл елонгації. Переміщення рибосоми вздовж іРНК на один кодон називається транслокацією. Здійснюється вона з участю третього фактора елонгації G, або транслокази, й енергії, що утворюється під час гідролізу ще однієї молекули ГТФ. Отже, для утворення пептидного зв'язку потрібна енергія гідролізу двох молекул ГТФ.

Термінація. У синтезі поліпептидного ланцюга настає момент, коли А-ділянка рибосоми зайнята одним із кодонів УАА, УГА чи УАГ. У цьому випадку кодон-антикодоною взаємодії не відбувається, тому що нормальні клітини не містять тРНК з антикодонами комплементарними сигналам термінації. Термінуючі триплети не кодують амінокислот і називаються у зв'язку із цим беззмистовними кодонами.

Термінуючі триплетні послідовності іРНК вступають у взаємодію з білковими факторами звільнення  $R_1$ ,  $R_2$  і S (рилізинг-фактори); перший з них розпізнає кодон УАА або УАГ, другий – УАА або УГА. Взаємодія одного з рилізинг-факторів з термінуючим кодоном у місці розташування аміноацильної ділянки 70S-рибосоми активує пептидилтрансферазу та змінює її специфічність, у результаті чого настає гідролітичне розщеплення поліпептиду від поліпептидил-тРНК, активація активним пептидним залишком  $H_2O$  і вивільнення синтезованої білкової молекули, відділення від Р-ділянки, що звільнилася, тРНК, дисоціація 70S-рибосоми на 30S- і 50S-

субчастинки та їхня підготовка до синтезу нової молекули білка (рис.1.20).

На молекулі іРНК одночасно можуть знаходитися декілька функціонально активних рибосом. При цьому одна рибосома на іРНК займає місце, еквівалентне 80 нуклеотидам. Завдяки такій можливості ефективність використання іРНК значно зростає. Кілька рибосом, що одночасно знаходяться на одній і тій же іРНК формують полісомну структуру (полісому), у синтезі якої кожна з рибосом функціонує автономно та синтезує свій поліпептидний ланцюг.

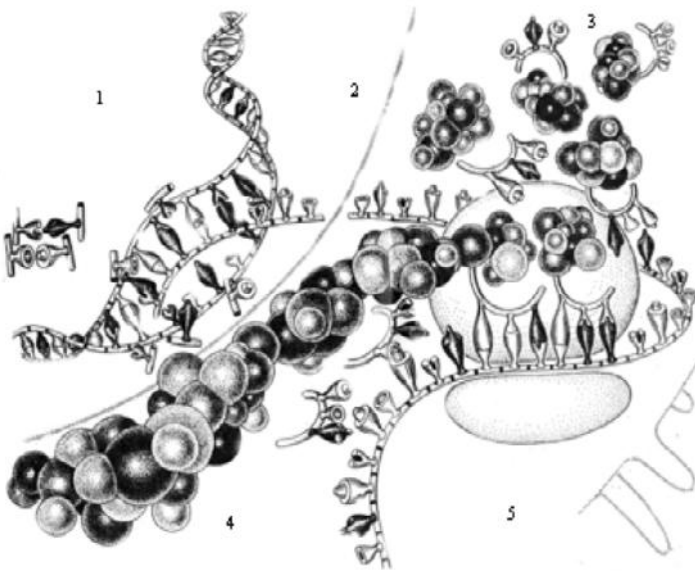


Рис.1.20. Загальна схема синтезу білка в клітині:

1-дволанцюгова спіраль ДНК; 2-одноланцюгова молекула РНК; 3-транспортна РНК з молекулами амінокислот на "хвості"; 4-синтезований білковий ланцюг; 5-рибосома, на якій проходить синтез білка.

Процесинг та упаковка поліпептидного ланцюга.  
**Процесинг (обробка)** – сукупність реакцій, що призводять

до перетворення первинних продуктів транскрипції і трансляції у функціонуючі молекули. Процесингові підпадають функціонально неактивні молекули – попередники рибонуклеїнових кислот (тРНК, рРНК, іРНК) і численних білків. При процесингу РНК-попередників у найпростіших випадках видаляються надлишкові нуклеотидні послідовності від обох кінців цих молекул.

У клітинах еукаріот виявлений особливий тип процесингу – *сплайсинг* (*зрощувати, сполучати*), якому піддаються попередники всіх іРНК, а також деякі тРНК та рРНК. У молекулах цього типу кодуючі (екзони) і некодуючі (інтрони) послідовності нуклеотидів чергуються між собою. У процесі сплайсингу інтрони видаляються, тоді як екзони зшиваються один з одним, утворюючи активні (зрілі) іРНК (рис.1.21).

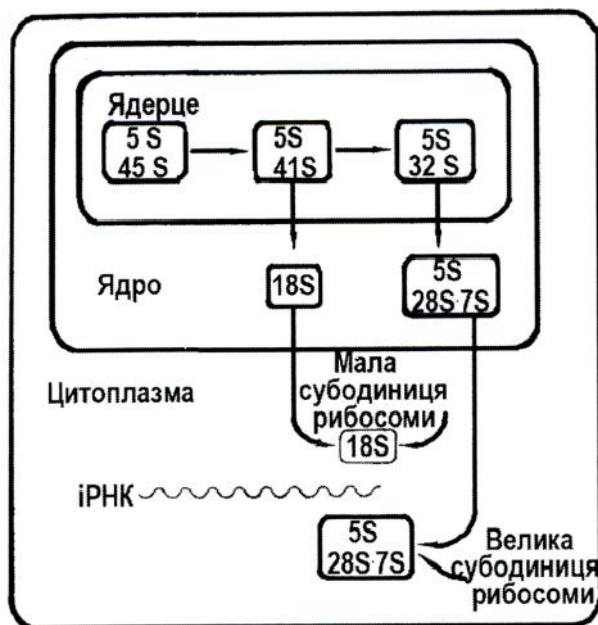


Рис.1.21. Схема дозрівання рРНК

Для кожного типу молекул процесинг відбувається під впливом спеціальних ферментів або групи ферментів, які розпізнають специфічну первинну, а часто і вторинну структуру РНК у точках процесингу. Винятком є хіба що сплайсинг рРНК війчатої інфузорії *Tetrahymena* – каталітичну функцію у цій реакції здійснює сама РНК, яка вступила у сплайсинг.

При процесингу молекул-попередників білків (травних ферментів, колагену, легких ланцюгів імуноглобулінів, гормонів тощо) найчастіше виділяється так званий сигнальний пептид на  $H_2N$ -кінці поліпептидного ланцюга. Новосинтезований поліпептид, наприклад, проінсулін, може містити послідовності різних поліпептидних ланцюгів, які у ході процесингу “вирізаються” з видаленням надлишкових послідовностей з утворенням зрілих білків. Первинний продукт трансляції може розщеплятися при процесингу на велике число білків з різною функцією. Процесинг білків каталізується спеціальними протеазами, які розпізнають специфічні амінокислотні послідовності.

У процесі посттрансляційного дозрівання відщеплюються поліпептидні N-кінцеві лідерні послідовності, що виконують роль специфічних сигналів, за допомогою яких білок досягає місця свого призначення. Дуже часто N-кінець поліпептидного ланцюга піддається модифікаційним змінам ще тоді, коли синтез решти поліпептидного ланцюга продовжується. З інших найбільш розповсюджених реакцій, за участю яких відбувається модифікація поліпептидної структури і тим самим здійснюється вплив на формування її остаточної конформації, варто назвати ацетилювання аміногрупи N-кінцевої амінокислоти, фосфорилювання ОН-груп залишків оксіамінокислот (серину, треоніну, тирозину), що

призводить до збільшення негативного заряду відповідних білків, карбоксилування залишків аспарагінової і глутамінової кислот, метиловання залишків лізину, приєднання бічних вуглеводних ланцюгів, додавання простетичних груп, а також утворення дисульфідних містків.

Регуляція біосинтезу білка. У 60-х роках минулого століття було встановлено, що дія генів піддається контролю і, як наслідок, виявлено їх диференціальну активність. Нобелівська премія за 1965 рік була присуджена Ф.Жакобу і Ж.Моно за дослідження генетичної регуляції синтезу ферментів, виконані в 1953-1961 роках в Інституті Пастера. Вони класифікували гени на структурні та регуляторні. До структурних генів відносять ті послідовності нуклеотидів ДНК, які кодують безпосередньо білкову структуру, а регуляторні (рис.1.22) регулюють активність структурних генів. Сукупність суміжних структурних генів з порядком розташованих груп регуляторних генів складає одиницю генетичної регуляції, чи оперон.

Регуляція синтезу - це система складних механізмів, які забезпечують певний рівень білкового синтезу залежно від потреб організму і функціонують на різних його етапах. Швидкість білкового синтезу регулюється на рівні транскрипції, процесингу іРНК, трансляції та посттрансляційної модифікації білків. Регуляцію білкового синтезу в прокариот було детально вивчено французькими дослідниками Ф. Жакобу та Ж. Моно в 1961 р. на прикладі лактозного оперона бактерій роду *E. coli*. Синтез ферментів *lac*-оперона контролюється на генетичному рівні. Здійснюється даний процес за участю білка - репресора, структура якого закодована в гені-регуляторі, що не входить до складу оперона. Залежно від

стану репресора розрізняють репресибельну та індущибельну системи генної регуляції.

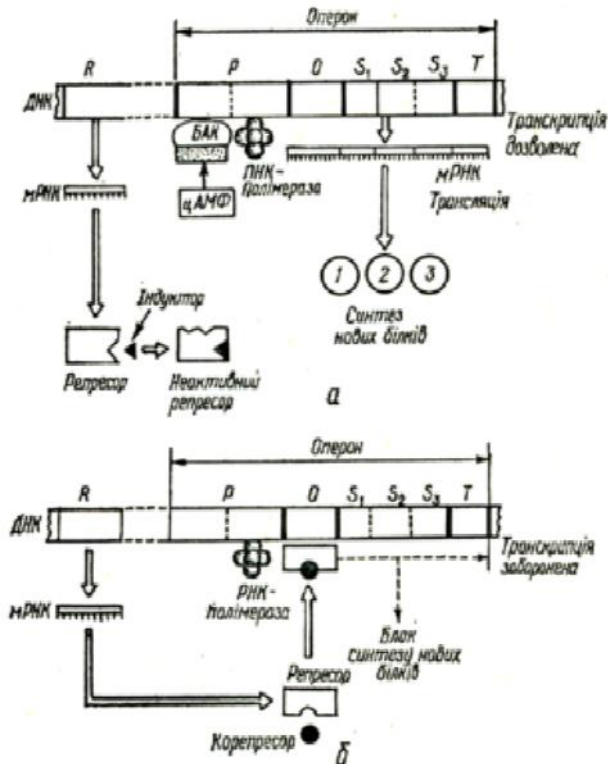


Рис.1.22. Регуляція синтезу білка (за Ф.Жакобу і Ж.Моно):  
а – індущибельна; б – репресибельна

За індущибельної системи білок-репресор перебуває в активному стані і блокує діяльність Іас-операона та синтез відповідних ферментів β-галактозидази, галактозидпермеази тощо. Репресор знаходиться у зв'язаному стані доти, поки у клітині не з'явиться лактоза - субстрат для цих ферментів (індуктор). Зв'язуючись з індуктором, репресор змінює конфігурацію, втрачає здатність до зв'язування з оператором, знімає блокування

гена-оператора, внаслідок чого відновлюється синтез ферментів катаболізму - лактози (індуковані ферменти). При репресибельній системі генної регуляції білок-репресор перебуває в пасивному стані і не контролює роботу оперона. Активація його здійснюється за участю корепресорів - продуктів ферментативної реакції, які нагромадились у значній кількості. Активованій репресор зв'язується з оператором і припиняє синтез білків-ферментів. Здебільшого індукцибельними є оперони синтезу ферментів катаболізму, а репресибельними - оперони синтезу ферментів анаболізму. Індукторами перших є субстрати катаболічних реакцій, а других - продукти синтезу ферментів.

Уява про механізми генної регуляції значно розширилась у зв'язку зі встановленням нових механізмів регуляції активності геному за допомогою цАМФ, селективності транскрипції шляхом вибору промоторів РНК-полімеразою, модифікації ДНК та зміни її матричної активності тощо. Регуляція синтезу білка в клітинах прокариот здійснюється і на рівні транскрипції внаслідок зміни активності аміноацил-тРНК-синтеаз, пептидил-синтеаз, модифікації факторів ініціації, тРНК, порушення функціонування рибосомного апарату клітини. Механізми регуляції білкового синтезу в клітинах еукаріот дещо складніші та недостатньо вивчені. Це пояснюється значно складнішою будовою клітин, відмінністю у будові оперонів та просторовим розділенням процесів трансляції і транскрипції.

Оперони еукаріот переважно моноцистронні зі значними регуляторними зонами, а цистрони, відповідальні за різні ланки певних біохімічних перетворень, часто знаходяться на різних ділянках геному, а не зосереджені в одному опероні, як у прокариот. У клітинах еукаріот більшість генів знаходиться в



блокованому стані (близько 90 %). Важлива роль у генній регуляції білкового синтезу в еукаріот належить білкам-гістонам, які беруть участь в утворенні нуклеосом. Вважають, що за участю гістонів може одночасно здійснюватись групова регуляція активності генів всієї хромосоми або певних її ділянок. Групова регуляція генів різних оперонів може здійснюватись під дією речовин, що продукуються іншими клітинами (гормональна регуляція). Регуляція білкового синтезу в еукаріот може здійснюватись також на рівні транскрипції внаслідок зміни просторової структури та процесингу тРНК, кількості та функціональної активності рибосом посттрансляційної модифікації білків тощо.

Відкриття Ф.Жакобу і Ж.Моно стало поштовхом для дальшого дослідження молекулярної структури гена. В даний час з'ясовано, що гени прокаріот складаються з промотора (послідовності нуклеотидних пар, які пізнає РНК-полімераза), білок-кодуючої зони, або структурної ділянки, і термінатора транскрипції.

Порівняльні експериментальні дослідження показали, що процес реалізації генетичної інформації за приведеною схемою, в принципі характерний для всіх організмів, але проходить лише у прокаріот. В еукаріот більшість сегментів ДНК, як окремі гени, мають складну будову: чергуються кодуючі і некодуючі ділянки гена. За пропозицією У.Гільберта (1978) кодуючі ділянки називають екзонами, або доменами, некодуючі – інтронами. Підтвердження гіпотези про мозаїчність структурних ділянок гена еукаріот здійснили Шамбон і Бретнаха в лабораторії молекулярної генетики еукаріот Університету Луї Пастера. Вченим вдалося виділити інформаційну РНК овальбуміну - білка яйцепроводу курки, який складається з 368 амінокислотних залишків. Із 1872 нуклеотидів цієї іРНК 1158 кодували 368 амінокислот

білка, в той час як 64 нуклеотиди від 5'-кінця і 650 нуклеотидів від 3'-кінця молекули іРНК не транлювалися. З інформаційної РНК була синтезована ДНК-копія, що відповідала генів альбуміну, яку можна було вмонтувати в плазміді і клонувати в клітинах *E.coli*.

Французькі вчені зуміли одержати достатню кількість матеріалу для вивчення структури такого гена. ДНК-копія не розрізалася рестриктазами *E.coli* і *Hind III*, тобто не містили жодної з двох послідовностей ДНК розміром в шість нуклеотидів кожна, які пізнавали і могли б гідролізувати ці ферменти. В кінці 1977 року вчені висунули гіпотезу, що в геномній ДНК, з якою транскрибується іРНК овальбуміну містяться ділянки, відсутні в інформаційній РНК.

Аналогічна гіпотеза про перервну будову гена була висунута для генів  $\beta$ -глобуліну кролика та щура Ледером і Тонегавою (США). Пізніше Шамбон і Курільські показали, що ДНК гена овальбуміну тільки частково реасоціює з іРНК: шість-сім ділянок ДНК не гібридизуються з РНК й ці ділянки гена, що відсутні в іРНК (інтрони), розділяють кодуючу послідовність ДНК овальбуміну на вісім фрагментів (екзони).

Мозаїчність характерна для більшості генів еукаріот, причому інтрони знаходяться в структурному гені в перемішку з екзонами. В той же час у прокаріот, особливо у бактерій, де досконало вивчена нуклеотидна послідовність, інтрони не виявлені. Число інтронів у різних генах різне. Найчастіше їх є від 1 до 10 на ген. У деяких випадках їх є більше. Так, глобінові гени  $\alpha$ - й  $\beta$ -типів мають два інтрони, що займають постійне положення відносно кодуючих послідовностей. Для  $\beta$ -глобінових генів ссавців перший інтрон короткий, другий - довгий.

У гені колагену курей 51 інтрон. Довжина інтрона коливається від декількох десятків нуклеотидних пар до сотень. У більшості генів довжина інтрона є від 500 до 1500 пар азотистих основ, а їх частка в загальній довжині гена може сягати 50%. Найдовший інтрон, що включає більше 20 тисяч нуклеотидних пар, виявлений молекулярними генетиками в регуляторному гені *bithox* дрозоді, який регулює процес детермінації ембріональних клітин.

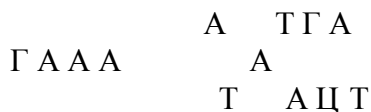
У 70-х роках ХХ століття появилися нові дані, які досить сильно змінили уявлення про організацію генома в еукаріот. Виявлені в генах інтрони, а також інші дані про молекулярну характеристику генома привели до відкриття: загальний об'єм ДНК в геномі еукаріот значно перебільшує кількість ДНК, яка необхідна для структурних генів, що кодують білки. Це явище назване в молекулярній біології та генетиці як надлишок ДНК, або надлишкова ДНК.

У хромосомах еукаріот, окрім ДНК з унікальною послідовністю нуклеотидів, із яких побудовані структурні гени, виявлено значну кількість ДНК з однаковими послідовностями, які повторюються багаторазово. В цьому якраз полягає особливість еукаріот, у яких, на відміну від прокаріот, в одному геномі ген представлений багатьма копіями. Частка генома, яка складається із ділянок, що повторюються у молекулі ДНК, в різних організмів коливається від 2 до 80%, а в окремих випадках ДНК структурних генів складає лише до 10% від усієї кількості ДНК.

Деякі з нуклеотидних фрагментів входять не тільки у склад інтронів або фланкуючих (*flank* – бік) послідовностей іРНК, а й можуть виконувати функції сигнальних послідовностей, які пізнаються білками (промотори транскрипції, точки початку реплікації ДНК,

сайти скручування хромосом тощо). Всі ці сигнальні послідовності, що повторюються в геномі у вигляді ідентичних або дуже подібних тандемних (tandem – один за одним, низкою) копій, мають невелику довжину. При розділенні ДНК в градієнті цезій хлориду сигнальні послідовності (біля 5%) вдається відділити від основної маси ДНК у вигляді *сателітної* (додаткової) ДНК. Ці ДНК можуть бути важчими або легшими від основної фракції ДНК і метильованими. Багато-чисельність тандемних повторів у сателітній ДНК надає їй відповідну аномальність при центрифугуванні (подібну поведінку з основною ДНК в градієнті густини цезію хлориду). В таких випадках говорять про *критичну* (сгрупп – потайний) сателітну ДНК.

Встановлено, що часто повторювані послідовності в сателітних ДНК звичайно не транскрибуються та локалізуються в зоні центросоми хромосоми (виконують структурну функцію). Вважають, що сателітні ДНК виникли із мозаїки послідовностей 9 пн (пар нуклеотидів) у трьох повторах:



На початку 80-х років ХХ ст. в геномі людини виявлені послідовності ДНК, що володіють властивостями структурного поліморфізму – це так звані гіперваріабельні зони (ГВЗ) з короткими ГЦ – збагаченими і тандемно повторюваними одиницями. ГВЗ рекомендуються як маркери-зонди при картуванні генів. Крім того, ГЦ- й АТ-багаті ділянки гена еукаріот забезпечують регуляцію роботи генів та служать для первинного контакту і точної орієнтації РНК-полімерази відносно транскрибуючого нуклеозиду. Перша група (ГЦ) розташовується на ділянці з координатами на 100-40 нуклеотидних пар вище від

початку читання гена і, мабуть, служить для початку контакту РНК-полімерази з промотором. Друга група (АТ), або неспецифічна, є на відмітці біля 30, тобто вона лежить на 30 нуклеотидів вище від початку транскрипції гена. Ця група забезпечує точну орієнтацію РНК-полімерази відносно першого транскрибуючого гена і має закономірну послідовність, яка завжди починається з чергування тиміну й аденіну та ділиться на два типи послідовностей: Хогенса (H<sub>g</sub>) і Прибноу (P<sub>b</sub>) та об'єднується загальною назвою – *консервативні послідовності*. Послідовність Хогенса необхідна для пізнання промотора РНК-полімеразою і є гексамером **5'ТТГАЦАЗ'**. Локалізується біля координати-35. P<sub>b</sub>-послідовність є також гексамером **5'ТАТААТЗ'**, який локалізований біля координати-10. Ця послідовність необхідна для міцного зв'язування з РНК-полімеразою. За нею закріпилась назва **“ТАТА-box”**, або **“ТАТА-блок”**.

На відміну від генів прокариот, гени, що кодують білки еукаріот, не об'єднані в оперони, тому вони мають власні промотори, тобто нуклеотидну послідовність, до якої приєднується РНК-полімераза, зв'язуючись з ДНК і термінатором транскрипції, що відділяє РНК від ДНК. Для реалізації транскрипції в клітинах еукаріот є три різні РНК-полімерази, що керують синтезом рРНК, мРНК і тРНК.

Транскрипція генів в еукаріот проходить у ядрі клітини. Синтезована мРНК-попередник або про-мРНК чи гетерогенна ядерна мРНК містить екзони та інтрони, тобто кодуючі й некодуючі ділянки гена. Транскрипція в еукаріот характеризується тим, що некодуючий білок ділянки вирізається, тобто виникають інтрони, екзони ж, кодуючі ділянки, навпаки, зшиваються у зрілу мРНК. Сукупність структурних змін у початковому процесі транскрипції гена еукаріот, в результаті яких ядерна пре-мРНК перетворюється в зрілу молекулу мРНК, в

молекулярній генетиці та молекулярній біології називається сплайсингом.

За регуляцію включення гена еукаріот відповідальні специфічні локуси - енхансери (підсилювачі). Вони є на початку гена на віддалі сотень і тисяч пар нуклеотидів, не входять до складу промотора. Енхансер здатен збільшити число накладок РНК-полімерази на промотор сусіднього гена в десятки й сотні разів. Суть чого зводиться до активації гена, тобто збільшується частота ініціації - транскрипції. Механізм, мабуть, полягає в тому, що енхансер змінює всю структуру матриці, наприклад, впливаючи на організацію хроматину або міняючи густину суперспіралізації ДНК. А можливо, що енхансер забезпечує розташування матриці у визначеному місці клітини, наприклад прикріплюючи до ядерного матриксу. Існує ще одна думка, що енхансер безпосередньо бере участь у зв'язуванні ДНК-полімерази (після чого фермент починає рухатися власне до промотора). Молекулярно-генетичні властивості енхансера проявляються лише за наявності специфічних регуляторних білків, здатних пізнавати енхансери своїх генів, приєднуватися до них та викликати активацію генів.

Надлишкова ДНК у клітин еукаріот обумовлена молекулярно-біологічними процесами в ДНК. Тепер відомі спейсери, тобто міжгенні ділянки, які, напевно, необхідні для організації структури генома еукаріот і регуляції функції окремих ділянок ДНК, упакованої в хромосомі. В генетичній інженерії вони використовуються як ділянки, в які можна вмонтовувати чужорідні гени.

У 1985 році запропонований метод "генетичної дактилоскопії ДНК" з метою оцінки еволюції людини за батьківською і материнською лініями (А.Джефферіс, У.Уілсон, С.Тейн). У послідовностях ДНК відображаються пройдені в минулому мутації, або, за Ф.Кріком

“заморожені події”. Це, зокрема, допомагає картувати варіанти послідовностей в локусі міні-сателітної ДНК. Еволюцію за материнською лінією вигідно картувати мітохондріальною ДНК, тому що у сперматозоїдів практично відсутні мітохондрії, зате ними “наповнені” яйцеклітини. Ось чому ДНК клітинного ядра є поєднанням материнської та батьківської ДНК, тоді як ДНК мітохондрій передається лише яйцеклітиною. Звідси стає зрозумілим, чому в кінці 70-х років ХХ ст. виникла наукова дисципліна – молекулярна антропологія.

Розвиток молекулярної біології та генетики призвів до формування нового розуміння структури генома, що розвіяло стереотип класичної генетики, де ген є неподільний. Складні процеси редуплікації ДНК, транскрипції і трансляції гена не є вирішальними. Розкрито механізм відновлення пошкодженої структури ДНК, рекомбінація на рівні сегментів хромосом (міжгенний кросинговер) та нуклеотидів (внутрігенний кросинговер) і, врешті, відкриті рухливі генетичні елементи - сегменти ДНК, здатні до внутрішнього або міжхромосомного переміщення. Всі процеси в геномі, що проходять на молекулярному рівні, здійснюються за участю цілого набору ферментів, здатних розщеплювати (рестрикувати) молекули ДНК, синтезувати (лігувати) в єдині структури сегменти ДНК, синтезувати молекули ДНК. Вивчення структури і функції ферментів склало основу для їх виділення або синтезу, що дало можливість використати їх у генетичній інженерії.

## II. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ЗАСОБИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Засоби генетичної інженерії базуються на основних її завданнях: ідентифікації та виділенні генів, з якими проводиться маніпуляція *in vitro*; створенні рекомбінантних (гібридних) ДНК; клонуванні й експресії гібридного продукту. Для генетичної інженерії характерне, перш за все, використання ферментів, здатних діяти на структурні ДНК і вектори, необхідні для переносу та підтримання в реципієнтних клітинах чужорідних генів.

### 2.1. Загальна характеристика ферментів

Клітина – цілісна система, складові частини якої структурно і функціонально взаємопов'язані. Ця залежність виражається, перш за все, у генетично обумовленому синтезі білкових молекул – ферментів. Білки, як продукт матричного синтезу, відносяться до розряду первинних; всі інші молекули, що виникають внаслідок каталітичної дії ферментів, виявляються вторинними. І.Я.Берцеліус у 1836 році запропонував термін “каталіз” та спроролував: “У нас є всі основи припускати, що в тканинах і рідинах рослин та тварин відбуваються тисячі каталітичних процесів”. І це в той час, коли ферменти ще не були відомі науці. Тепер відомо, що у найдрібнішій клітині (0,1 мкм у діаметрі), яка відноситься до Mollicutes, міститься більше ніж 100 ферментів, тобто стільки, щоб клітина могла самостійно функціонувати як організм. Звичайно, що в клітинах інших прокариот та еукаріот налічується більше 1000 біокаталізаторів, які розподілені та локалізовані доцільно. У цитоплазмі знаходяться всі ферменти гліколізу, в



матриці мітохондрій – ферменти циклу Кребса і β-окиснення жирних кислот, ферменти окиснювального фосфорилування – у внутрішній мембрані мітохондрій.

ДНК у клітині *E.coli* має розмір  $1,4 \cdot 10^6 \cdot 3,0$  нм, а масу –  $1 \cdot 10^{-14}$  г. У розімкненому стані її довжина складає 1,4 мм, тобто подібна ДНК приблизно у 500 разів довша від бактеріальної клітини, що вміщає цю ДНК. Така хромосома кишкової палички містить у собі інформацію, достатню для кодування 4500 білків, значна частина яких буде представлена ферментами.

Ферменти складають основну масу клітинних білків. На частку одного фермента припадає від сотень часток відсотка (у деяких вірусів) до 10-15% (в *E.coli*). У той же час хромосомна ДНК не є простою послідовністю багаточисельних генів. Тому не слід вважати, що кількість хромосомної ДНК, наприклад, у представників еукаріотичних організмів пропорційна рівню їх еволюційного розвитку. Бо інакше нижчі тварини були б більш розвинуті, ніж людина, так як в них розмір генома досягає  $10^{10}$ - $10^{11}$  пн, у ссавців же та людини – на 1-2 порядки нижче ( $10^9$ - $10^{10}$  пн). Суть полягає в тому, що у високорозвинутих істот значна частина ДНК є мовчазною, тому що вона утворена не генними послідовностями (у людей до цього типу відноситься 80-90% всієї ДНК) або багаточисельними повторами ідентичних послідовностей, - все це відображається на ферментному наборі в клітинах, органах і тканинах, як і на їх функціональній активності.

Ферменти давно є об'єктом біотехнології – їх індустрія зародилася на початку ХХ ст. й об'єми ферментного виробництва продовжують наростати. Наука, яка вивчає ферменти, називається ензимологією, інженерна ензимологія – це гілка, або субдисципліна, біологічної технології, що вивчає біотехнологічні процеси, в яких використовується каталітична дія ферментів.

Незалежно від того, що їх біосинтез здійснюється в елементах ядерного апарату, частина ферментів секретується позаклітинно – переважно гідролази. Це обумовлено необхідністю розщеплення полімерних речовин до такого рівня, щоби продукти гідролізу могли надходити в клітину з пластичною чи енергетичною метою. До ферментів позаклітинного типу відносяться мікробні амілази, ліпази і пептид-гідролази, які каталізують реакції гідролізу відповідно крохмалю, ліпідів та білків. Тваринна протеаза (пепсин) умовно також може бути зарахована до розряду позаклітинних, тому що вона надходить із відповідних клітин (головних клітин слизової шлунку) в порожнину шлунку; це можна сказати і про ферменти підшлункової залози, які надходять у дванадцятипалий відділ тонкої кишки.

Молекулярні маси (ММ) ферментів досить великі та знаходяться в межах від 12 до декілька тисяч кілодальтон (кДа). Ферменти з ММ більше від 100 кДа представлені двома і більше субодинацями.

Кишечна паличка розмножується впродовж 20-30 хвилин. При цьому реалізується багаточисельність направлених й суворо вибірових біокаталітичних процесів. Експериментально доведено, що ферментна реакція за участю трансамінази аспарагінової кислоти проходить в просторі біля декількох сотень кубічних мілімікрометрів (нм) за час від десятитисячних до мільйонних частин секунди. Для того, щоб управляти дією ферментів, неохідні фундаментальні дані про механізми молекулярних основ ферментного каталізу.

Згідно з класифікацією (КФ) ферменти діляться на 6 головних класів, кожний із яких включає підкласи та підпідкласи:

I. Оксидоредуктази (КФ.1) – каталізують окиснювально-відновні реакції;

II. Трансферази (КФ.2) – каталізують реакції переносу функціональних груп (фосфатних, ацильних, глікозильних, альдегідних тощо);

III. Гідролази (КФ.3) – каталізують реакції гідролізу (перенос функціональних груп на молекулу води);

IV. Ліази (КФ.4) – каталізують реакції приєднання та відщеплення з відповідним насиченням та ненасиченням;

V. Ізомерази (КФ.5) – каталізують реакції ізомеризації, тобто перенос внутрімолекулярних груп з утворенням ізомерних форм;

VI. Лігази (КФ.6) – каталізують реакції утворення зв'язків С-С, С-S, С-O і С-N, спряжені з використанням енергії АТФ та інших нуклеотидтрифосфатів.

Підклас і підпідклас ферментів відповідно позначають другими та третіми числами, порядковий номер фермента – четвертим числом у його підпідкласі.

Класифікація й номенклатура ферментів має універсальне значення, тобто вони застосовані для всіх ферментів, незалежно від джерела їх одержання.

З часу виділення Дж.Самнером у 1926 р. уреазу в кристалічному вигляді вважалося, що всі ферменти – це прості або складні білки. В 1981-1982 рр. Т.Чех зі співробітниками відкрили каталітичну здатність рибонуклеїнової кислоти. Цим відкриттям заперечується універсальність принципу “фермент – це білок”. Деякі дослідники (Дж.Дарнел - молодший) вважають, що першою речовиною спадковості була РНК, а не ДНК, так як їй властива велика функціональна універсальність – вона здатна зберігати інформацію, відтворюватися, направляти синтез білка і вести себе як фермент. Разом з тим, діапазон реакцій, які каталізує РНК, ще недостатньо великий, щоб вказане вище спростування прийняти на “конкурентний рахунок”. На відміну від небіологічних каталізаторів ферменти високоспецифічні. Вони мають

активні центри, значна частина їх проявляє свою активність у присутності коферментів небілкової природи.

Кінетичні характеристики ферментів, які визначають активність і тривалість роботи у різних умовах, є важливими показниками. В процесі біокаталізу активність ферментів, а отже їх каталітичні функції знижуються. Виникає проблема стабілізації активності ферментів у випадках їх промислової експлуатації. Слід відмітити, що *in vivo* інактивація й активація ферментів як і синтез їх *de novo* або *denovo* (від лат.- заново), регулюється самим організмом. Крім того, в організмі (клітинні, тканинні) є ще багато ферментів у зв'язаному стані. Очевидно, що при цьому їх конформації більшою чи меншою мірою змінюються, що важливо для клітини з функціональною точки зору.

Звичайно, від якості виділення й очищення фермента залежить надійність аналізу його структури, бо навіть однакові ферменти, що виділені з різних джерел, можуть мати різні амінокислотні послідовності, через що вони нетотожні, їх каталітична активність та властивості будуть різними. Наприклад, гексоізомераза із *Vac. coagulans* активується йонами  $Co^{2+}$ , а це й же фермент, продукований мутантом цього виду при рН більше 8,0, не вимагає присутності йонів кобальту.

М.Левіт і К.Чотіа в 1976 р. систематизували структурно відомі білки за наявністю та розташуванням  $\alpha$ -спіралей  $\beta$ -шарів на п'ять класів:

- 1) білки, що побудовані тільки з  $\alpha$ -спіралей, упакованих у глобулярну структуру;
- 2) білки, які складаються тільки з  $\beta$ -шарів. Вони формують глобулу у формі бочки;
- 3) білки, які включають  $\alpha$ -спіралі й  $\beta$ -шари ( $\alpha$ + $\beta$ -білки), але розділені в третинній структурі;

- 4) білки  $\alpha/\beta$ , у яких  $\alpha$ - й  $\beta$ -структурні ділянки чергуються в первинній структурі, формуючи третинну структуру, в центрі якої знаходяться паралельно складені  $\beta$ -шари, які обгорнуті з обох сторін  $\alpha$ -спіралями;
- 5) малі молекули з багатьма –S-S- мостиками зі слабо вираженими вторинними структурами.

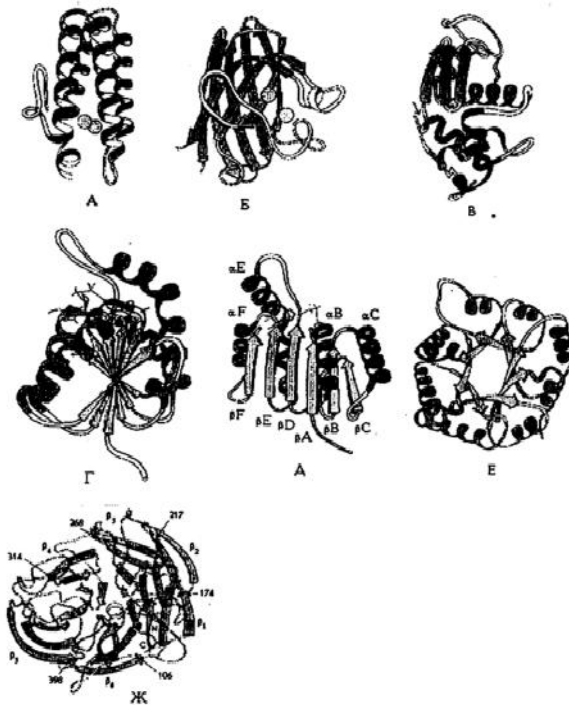


Рис. 2.1. П'ять класів білків за Дж. Річардсоном.

А – міохемеретин (клас 1); Б – Cu,Zn – супероксид десмутаза (клас 2); В – лізоцим ( $\alpha+\beta$  – структури, клас 3); Г і Д – дві ортогональні проекції НАД – зв'язуючого домена лактатдегідрогепази(клас 4); Е – тріозофосфатізомераза (клас 4); Ж – нейрамінідаза вірусу грипу (клас 5)

На рис.2.1. наведена схема Дж.Річардсона (1981) для різних білків. Білкові ланцюги формують **домени**, які представляють собою згорнуту в просторі структуру, що імітує маленьку білкову молекулу. Доменам властиві функції зв'язування. У ферментних білках активний центр розташовується переважно на межі між двома і більшим числом доменів. Відомо, що домени здатні переміщуватися один щодо одного. Так, у трипсиногені домен із неупорядкованого стану переходить в упорядкований у ході активації зимогена.

З точки зору енергетики, ферменти суттєво понижують енергію активації хімічних реакцій. Під енергією активації розуміють кількість енергії в джоулях, яка необхідна для переведення всіх молекул 1 моля речовини при відповідній температурі в стан критичного енергетичного рівня (перехідний рівень), при якому починає відбуватися хімічна реакція. Якщо не всі молекули речовини досягають переходу рівня, то швидкість хімічної реакції знижується.

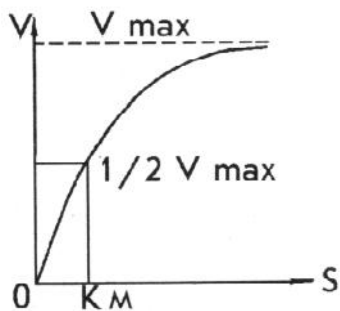


Рис. 2.2. Залежність швидкості (V) ферментної реакції від концентрації субстрату (S).

Швидкість реакції залежить від концентрації субстратів. Коли фермент насичений субстратом, він не може функціонувати швидше — це і є максимальна швидкість реакції ( $v_{max}$ ), тобто частка вільного ферменту виявляється гранично низькою.

Загальна швидкість ферментної реакції повинна бути пропорційною концентрації фермент-субстратного комплексу ES (E — ензим, S — субстрат). Залежність

швидкості ферментної реакції від концентрації субстрату графічно виражається гіперболічною кривою (рис.2.2).

$K_m$  на рисунку є константа Міхаеліса-Ментена, тобто концентрація специфічного субстрату, при якій конкретний фермент забезпечує швидкість реакції, яка дорівнює половині  $v_{max}$ . Аналіз кінетики всіх ферментних реакцій проводиться на основі математичного рівняння Міхаеліса-Ментена:

$$V_o = V_{max} [S] : K_m + [S],$$

де  $V_o$  – початкова швидкість при концентрації  $S$ ,  $v_{max}$  – максимальна швидкість і  $K_m$  - константа Міхаеліса-Ментена для даного фермента. Часто рівняння Міхаеліса-Ментена модифікують у рівняння зворотних величин Лайнуївера-Берна:

$$1 : V_o = (K_m : V_{max} \cdot 1 : [S]) + 1 : V_{max}$$

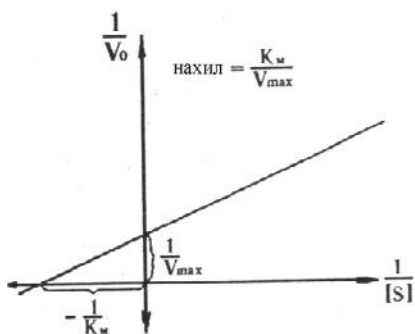


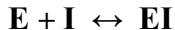
Рис. 2.3. Графік подвійних зворотних координат

Згідно з цим рівнянням, на графіку, побудованому на осі зворотних координат, можна більш точно визначити  $V_{max}$  (рис. 2.3). На основі взаємодії ферментів і специфічних їм субстратів, а також враховуючи багаточисельність ферментних реакцій у

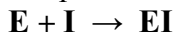
клітині або в організмі і, нарешті, беручи до уваги інші взаємодії в біосистемах (антиген-антитіла, токсини та їх рецептори тощо), можна говорити про **комплементарність** як основу біологічної специфічності.

У більшості випадків має місце **молекулярна комплементарність**. Такі взаємодії здійснюються за законами термодинаміки.

Відомі взаємодії ферментів з окремими речовинами, які викликають пониження або повне пригнічення активності біокаталізаторів. Речовини, які пригнічують ферментні реакції, називають інгібіторами (від англ. inhibit - стримувати). Вони вибірково взаємодіють з ферментами. Наприклад, ціаніди, оксид карбону інгібують окремі окиснювально-відновні ферменти; йодацетатамід, арсенітні солі блокують тіолові ферменти; аміни, гідразиди взаємодіють з карбонільною групою ферментів і, як наслідок, інгібують їх активність. Всі інгібітори діляться на **зворотні** та **незворотні**. Серед зворотних виділяють конкурентні й неконкурентні. Зворотні інгібітори утворюють неміцні комплекси з ферментами [EI], здатні розпадатися на вихідні компоненти:



Мірою інгібіції є та концентрація інгібітора, яка викликає пригнічення ферментної активності наполовину ( $I_{50}$ ). Чим більша величина **I**, тим сильніший інгібітор. У випадку взаємодії незворотних інгібіторів комплекси [EI] не розпадаються і реакція проходить лише вправо.



Конкурентний інгібітор зв'язується з активним центром фермента і, на відміну від фермент-субстратного комплексу, не піддається ферментній трансформації. Таким чином конкурентний інгібітор виступає конкурентним субстратові за зв'язування з активним центром. Змінюючи концентрацію субстрата, можна витіснити із комплексу інгібітор. Прикладом конкурентного інгібітора сукцинатдегідрогенази є малонат (в нормі субстратом є сукцинат).

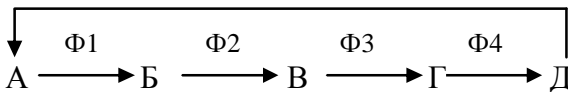


Неконкурентний інгібітор зв'язується не з активним центром, а в іншому місці білкової молекули. При цьому міняється конформація всієї молекули фермента, і, як наслідок, йде зворотна інактивація його каталітичного центра. Неконкурентні інгібітори взаємодіють із вільним ферментом та його фермент-субстратним комплексом:



Комплекси **EI** та **ESI** стають неактивними.

Отже, на роботу ферментів можуть впливати різні речовини, за допомогою яких регулюється їх біосинтез та активність. Каталітична активність і регуляція ферментів можуть проходити у формі миттєвого зворотного зв'язку (Feedback inhibition) з використанням алостеричних ефекторів невеликої молекулярної маси. Вони не мають подібності з субстратами чи коферментами і зв'язуються з алостеричними сайтами (неактивними центрами ферментів).

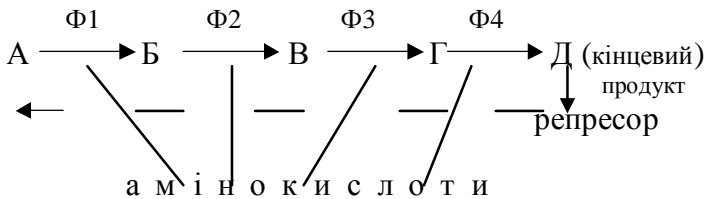


Це механізм грубого контролю регуляції активності ферментів. У наведеній схемі продукт **Д** здатний зв'язуватися з першим ферментом (**Ф1**) чи інгібувати його. Отже, **Д** – це негативний алостеричний ефектор, або Feedback-інгібітор **Ф1**. Наприклад, інгібування триптофаном антранілсинтетази у мікроорганізмів на шляху синтезу триптофану, де проміжним продуктом є антранілова кислота.

Розрізняють кумулятивну, мультивалентну й кооперативну Feedback-інгібіції. У першому випадку два і більше кінцевих продукти інгібують адитивно один регуляторний фермент; у другому – два й більше кінцеві продукти є в надлишку і тільки за цих умов проходить

повна інгібіція реакції; при кооперативній інгібіції єдиний кінцевий продукт (у надлишку) гальмує дію регуляторного ферменту.

На відміну від Feedback-інгібіції існує Feedback-репресія. Її суть полягає в тому, що похідне (дериват) кінцевого продукту (репресор) пригнічує утворення ферментів (але не впливає на їх активність) у даному метаболічному шляху:



В окремих випадках кінцевий або проміжний продукт використовується як активатор якого-небудь фермента. Це явище називається алостеричною активацією, або Feedback-активацією. Поряд з грубою регуляцією активності ферментів за механізмом Feedback-інгібіції відомий тонкий контроль, в якому ферменти алостеричних білків містять не тільки каталітичні центри для зв'язування із субстратом, але й близько розташовані інші місця, з якими зв'язуються молекули ефекторів. Ефектор викликає конформаційні зміни у ферменті. При цьому спорідненість каталітичного центра ферменту до субстрату або зменшується – настає алостерична інгібіція, або, навпаки, зростає – настає алостерична активація (рис.2.4).

При реалізації інженерно-ензимологічних процесів важливо знати, отже, й використовувати ефектори на практиці. Внаслідок компартменталізації клітинних процесів в еукаріот залишаються невідомими концентрації ефекторів (а іноді самі ефектори) в клітинах. Зокрема,

фосфофруктокіназа – давно і добре вивчений фермент гліколізу. Виявилося, що він має ефектор – фруктозо-2,6-дифосфат, відкритий лише 15 років тому Х.Херсом, Л.Хью і Е.Ван Шафтіном.

Звичайно, для проведення генно-інженерних робіт з одержання того чи іншого матеріалу необхідно створити оптимальні умови ферментам рестрикції, модифікації, репарації.

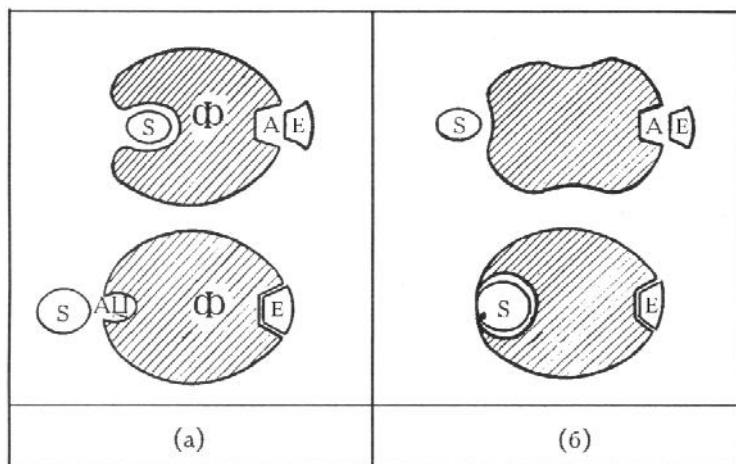


Рис. 2.4. Схематичне відображення модифікації активного центру (АЦ) ферменту (Ф) за допомогою ефектора (Е), що взаємодіє на алостеричному сайті (А); S – субстрат, а – алостеричне інгібування, б – алостерична активація.

## 2.2. Рестриктази, фактори модифікації та репарації. Генетичне картування.

На початку 60-х років ХХ ст. в результаті досліджень Арбера відкриті та розшифровані явища рестрикції і модифікації ДНК. Арбер довів, що в клітинах бактерій, які

обмежують розмноження фага  $\lambda$ , синтезуються два ферменти. Один з них, позначений як ендонуклеаза, розщеплює чужорідну ДНК, що проникла в клітину. Другий, названий метилазою, яка модифікує прониклу ДНК шляхом метилювання декількох пар нуклеотидів, тим самим забезпечує стійкість ДНК до дії ендонуклеази. Арбер сформулював основні принципи систем рестрикції–модифікації, які, скоріш за все, утворилися в процесі еволюції для захисту від проникнення чужорідної ДНК. Досліди Арбера призвели до широкого пошуку ферментів рестрикції в інших бактерій та до розробки методів “нарізання” молекул ДНК на фрагменти, які відіграли вирішальну роль у розвитку генетичної інженерії.

Всі виявлені рестриктази були виділені із прокаріотичних мікроорганізмів. Однак, є повідомлення про наявність цих ферментів також в еукаріотичних мікроорганізмів - дріжджів з роду *Saccharomyces* та *Pichia*.

Відомо більше 500 рестриктаз і для більшості з них визначені пізнавальні нуклеотидні послідовності. Ці ферменти є різновидністю дезоксирибонуклеаз, які гідролізують ДНК на довгі чи короткі відрізки і навіть на окремі нуклеотиди. Рестриктази здатні розпізнавати короткі нуклеотидні послідовності із 4-6 нуклеотидних пар (сайти пізнання) і розрізати міжнуклеотидні зв'язки тільки у чітко визначених ділянках молекули ДНК (рестриктах), індукуючи формування “тупих”, або “липких”, кінців.

Згідно з існуючою номенклатури, назва рестриктаз позначається літерами від родини мікроорганізму, з якого їх виділили та двох перших малих літер від назви виду продуцента ферменту. Наприклад, бактерія *Escherichia coli* записується скорочено *Eco*. Для ферментів, виділених із різних культур одного виду, в назву вводять літери позначення штаму та його номер: *HgC*, *Bsu*–1076 тощо.

У тих випадках, коли фермент кодується геном, розташованим у плазміді чи фазі, вказується ще символ хромосомного елемента, наприклад, назва EcoRI стосується ферменту, що кодується геном плазміді R1. Така рестриктаза розрізає нитку молекули ДНК між аденіном та гуаніном послідовності ГААТТ або ТТААГ; рестриктаза BamHI розрізає нитку ДНК в сайті ГГАТЦЦ. Якщо один штам містить декілька рестриктаз, які різняться за специфічністю, вони позначаються римськими цифрами: Hin I, Hin II, Hin III (табл.2.1).

Таблиця 2.1  
Характеристика деяких рестриктаз

Назва фермента	Джерело одержання	Сайти пізнавання у послідовностях ДНК
1	2	3
Aat II	Acetobacter aceti	5'-ГАЦГТ/Ц-3'
Acc I	Acinetobacter calcoaceticus	5'-ГТ/(А,Ц) <sup>1</sup> (Г,Т)-АЦ-3'
Alu I	Arthrobacter luteus	5'-АГ/ЦТ-3'
Ava I	Anabaena variabilis	5'-Ц/ПіЦГПу <sup>2</sup> Г-3'
Ava II	Anabaena variabilis	5'-Г/Г(А,Т)ЦЦ-3'
Bal I	Brevibacterium flbidum	5'-ТГГ/ЦЦА-3'
Bam HI	Bac.ameloligutfaciens H	5'-Г/ГАТЦЦ-3'
Ban II	Bac.aneurinolyticus	5'-ГПуГЦПі/Ц-3'
Bcl I	Bac.caldolyticus	5'-Т/ГАТЦТ-3'
Bgl I	Bac.globigii	5'-ГЦЦNNNN <sup>3</sup> /НГГЦ-3'
Bgl II	Bac.globigii	5'-А/ГАТЦТ-3'
Bst EII	Bac.stearothermophilus ET	5'-Г/ГНАЦЦ-3'
Cla I	Caryophanon latum L	5'-АТ/ЦГАТ-3'
Dpn I	Diplococcus pneumoniae	5'-Г <sup>M</sup> А/ТЦ-3'
Dra I	Deinococcus radiophilus	5'-ТТТ/ААА-3'
Eco RI (рекомбінант)	E.coli, яка несе плазмідку гіперпродукції Eco RI	5'-Г/ААТТЦ-3'
Eco RI	E.coli RY13	5'-Г/ААТТЦ-3'
Eco RV	E.coli	5'-ГАТ/АТЦ-3'

Fsp I	Fischerella specits	5'-ТГЦ/ГЦА-3'
Hae II	Haemophilus aegyptius	5'-ПуГЦГЦ/Пі-3'
Hae III	Haemophilus aegyptius	5'-ГГ/ЦЦ-3'
Hha I	Haemophilus haemolyticus	5'-ГЦГ/Ц-3'
Hinc II	Haemophilus influenzae Rc	5'-ГТПі/ПуАЦ-3'
Hind III	із штаму E.coli, що несе плазмиду гіперчутливої Hind III	5'-А/АГЦТТ-3'
Hinf I	Haemophilus influenzae	5'-Г/АНТЦ-3'
Hpa I	Haemophilus paraingluenzae	5'-ГТТ/ААЦ-3'
Hpa II	Haemophilus paraingluenzae	5'-Ц/ЦГГ-3'
Kpn I	Klebsiella pneumoniae	5'-ГТТАЦ/Ц-3'
Mbo I	Moraxella bovis	5'-N/ГАЦТ-3'
Mbo II	Moraxella bovis	5'-ГААГА(N) <sub>8</sub> -3'
Mlu I	Micrococcus luteus	5'-А/ЦГЦГТ-3'
Msp I	Moraxella species	5'-Ц/ЦГГ-3'
Nco I	Nocardia carollina	5'-Ц/ЦАТГГ-3'
Nde I	Nesseria denitrificans	5'-ЦА/ТАТ-3'
Pst I	E.coli, яка несе плазмиду гіперпродукції Pst I	5'-ЦТГЦА/Г-3'
Pvu I	Protens vulgaris	5'-ЦТГЦА/Г-3'
Pvu II	Protens vulgaris	5'-ЦАТ/ЦГ-3'
Sma I	Serratia marcescens	5'-ЦЦЦ/ГГГ-3'
Spn I	Streptococum pneumoniae	5'-Г <sup>М</sup> А/ТЦ-3'
Xba I	Xanthomonas bardii	5'-Т/ЦГАГА-3'

Примітки: 1) в дужках вказані альтернативні нуклеотиди; 2) Пу, Пі – довільна пуринова, піримідинова основа; N – довільний нуклеотид; Г<sup>М</sup> – метильований гуанін; (N)<sub>8</sub> – нуклеотид, який повторюється вісім разів.

Рестриктази спочатку поділили на 3 групи залежно від довжини пізнавальної нуклеотидної послідовності (сайтів пізнавання).

I – пізнають тетрануклеотиди (Alu I із *Arthobacter luteus*),

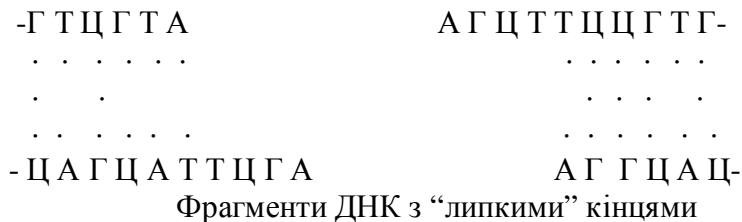
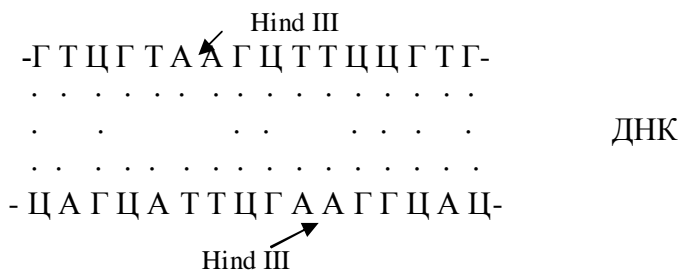
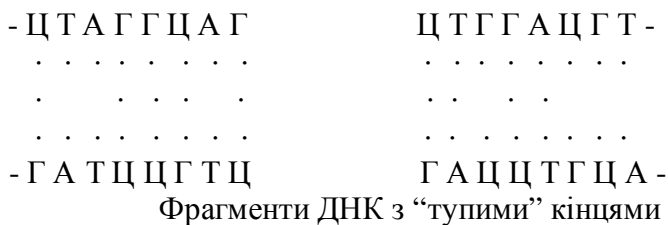
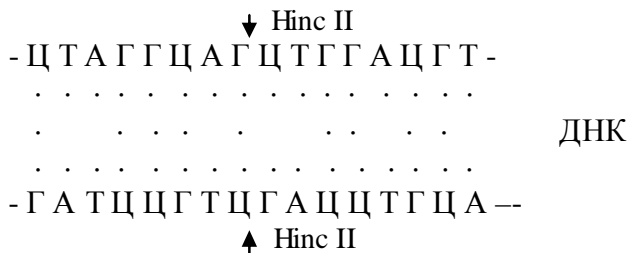
II - пізнають пентануклеотиди (EcoRIІ із *E.coli*),

III - пізнають гексануклеотиди (EcoRI із *E.coli*).

Alu I каталізує розщеплення нуклеотидної послідовності АГ ← ЦТ з утворенням тупих кінців у фрагменті ДНК, EcoRII та EcoRI розщеплюють послідовність ← ЦЦ (А/Т) ГГ і Г ← ААТТЦ відповідно з утворенням “липких” кінців у фрагментах ДНК.

Тепер рестриктази ділять на три класи з урахуванням RMS-системи, у якій виділяють RMS-білки рестрикції, модифікації (метилування) і посадки. До перших із них відносять ті рестриктази, які гідролізують ДНК у довільних точках з утворенням різних фрагментів ДНК (для обох ланцюгів ДНК відомі системи R<sub>2</sub>M<sub>2</sub>S); до другого класу відносяться ферменти, для яких сайти рестрикції та посадки співпадають з RS і MS. Рестриктази цього класу, які об’єднують ферменти вищезазначених трьох груп, використовуються в практиці генетичної інженерії, тому що дозволяють проводити направлене маніпулювання з ДНК та її частинами (генами), здійснювати генетичне картування і конструювання *in vitro*. Рестриктази III класу (наприклад, із фагу P1, системи 2R MS) об’єднують всі інші рестрикційні ендонуклеази. Окремі з них, наприклад, не пізнають сайти посадки. Вони рідко використовуються на практиці.

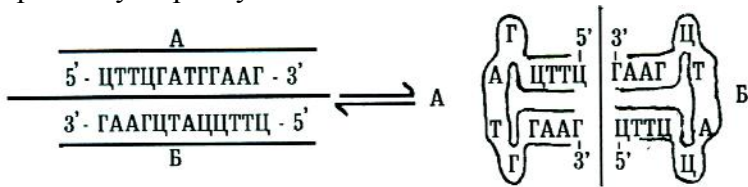
Залежно від джерела ДНК, число сайтів розщеплення неоднакове. Наприклад, дії рестриктаз піддаються ДНК фагу λ (індукує E.coli K-12), аденовірусу R й вірусу SV-40; в цьому випадку число сайтів розщеплення відповідно буде таким: для Alu I – більше 50, 32; для Bam HI - 5, 3, 1; для Bal I – 15, 17, 0; для Hind III- :6, 11, 6; для Mbo I -50, 50, 6 тощо. Розщеплення сайтів може проходити симетрично (Alu I, Bal I, Dpn I та ін.) з утворенням “тупих” кінців у ДНК й асиметрично (Aat II, Acc I, Ava I, II, Bam HI та ін.) з утворенням “липких” кінців:



У ДНК різних організмів містяться так звані **поліндром**и (грецьк. palindrome – той, що вертається,



перевертень) – послідовності, які повторюються у зворотному порядку:



У суперспіралізованому стані довгі поліндрами (10 і більше пар основ) утворюють хрестоподібні структури, які служать сигналами для пізнання відповідних ділянок ДНК рестриктазами, метилазами і білками, що регулюють дію генів.

Все це дає можливість рестриктаз для фізичного картування ДНК, виділення фрагментів, визначення нуклеотидної послідовності й інших потреб генетичної інженерії.

Генетичне картування має на меті визначення нуклеотидної послідовності гена і прилеглих до нього ділянок аж до сусідніх генів. Для цього спочатку слід побудувати карту ДНК: молекулу ДНК розривають у визначених точках, віддаль між якими можна виміряти. Такі точні розриви одержують внаслідок дії рестриктаз, мішенями яких є короткі специфічні послідовності ДНК. Карта ДНК, одержана в результаті локалізації точок розриву, називається рестрикційною. Вона представляє собою лінійну послідовність сайтів, у яких окремі рестрикційні ферменти специфічно пізнають свої мішені. Віддаль між сайтами рестрикції вимірюють у нуклеотидних парах ДНК (скорочено п.н. для коротких відрізків і т.п.н. - тисячі пар нуклеотидів для довгих відрізків).

Кожна рестриктаза має свою особливу мішень – специфічну послідовність нуклеотидів довжиною 4-6 пар основ (табл.2.1). Фермент гідролізує ДНК у кожній точці, де зберігається така послідовність. Якщо молекулу ДНК обробити довільною рестриктазою, то в чітко визначених місцях пройдуть розриви. Ферменти ДНК фракціонують за розміром гель-електрофорезом. Для цього препарат нарізаної ДНК наносять зверху на агаровий гель. При пропусканні через нього електричного струму фрагменти почнуть рухатися донизу по гелю зі швидкістю, яка залежить від довжини фрагментів. Чим коротші фрагменти, тим швидше вони рухаються. Пройдена віддаль обернено пропорційна логарифмові довжини фрагмента.

Внаслідок електрофорезу у гелі утворюються смуги. Ті з них, які розташовуються у верхній частині, відповідають великим фрагментам, а ті, що у нижній частині - меншим. Якщо гель прокалібрувати, то можна визначити довжину будь-якого фрагмента ДНК. Для цього на одну з доріжок гелю наносять контрольну пробу. Контроль містить суміш стандартних фрагментів відомого розміру (їх називають маркерами). Співвідношення між розміром досліджуваного фрагмента і пройденою ним віддаллю встановлюють за швидкістю міграції маркерів.

Наприклад (Б.Льюїн 1987), молекулу ДНК довжиною 5000 п.н. обробляють окремо двома рестриктазами – А і В. Одержані фрагменти розділяють електрофорезом. Фермент А розрізав ДНК-субстрат на чотири ферменти розміром 2100, 1400, 1000 і 500 п.н., тоді як фермент В утворив три фрагменти по 2500, 1300 і 1200 п.н. (рис.2.5).

На основі цих даних розташовують сайти рестрикції у відповідному порядку і будують рестрикційну карту. Існує декілька методів порівняння фрагментів, одержаних при розщепленні двома рестриктазами. Одним з поширених

методів є перехресна обробка досліджуваної молекули ДНК двома рестриктазами. Спочатку естрагують кожний фрагмент, утворений в результаті розщеплення одним ферментом (А чи В), а потім обробляють його другим ферментом. Суміш фрагментів, одержаних після рестрикції, аналізують за допомогою електрофорезу.

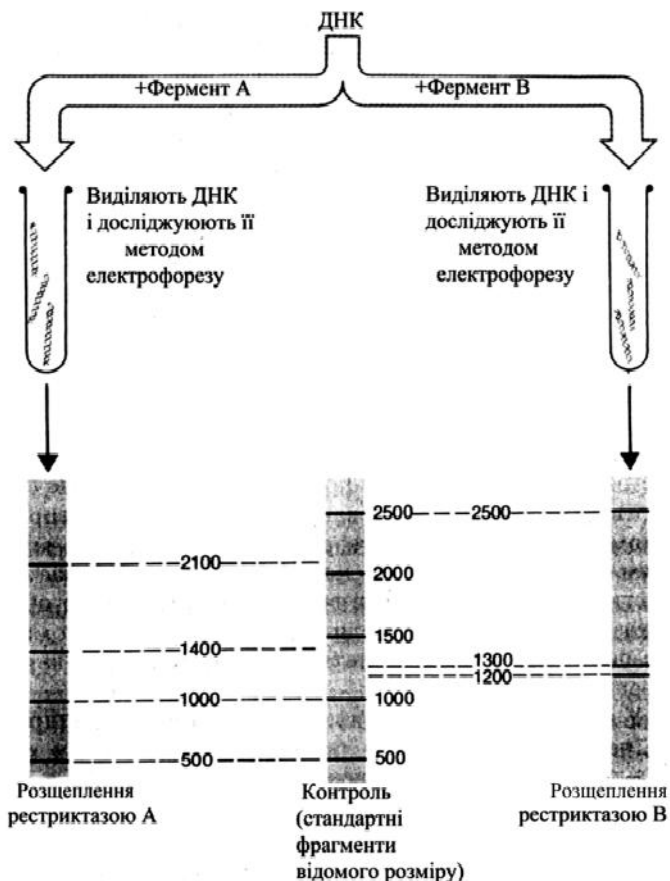


Рис.2.5. Рестрикційні ферменти розщеплюють ДНК на окремі фрагменти, які можна розділити методом електрофорезу в агаровому гелі

Кожний гелю позначають у відповідності з використаним ферментом та розміром фрагментів, які естрагуються із гелів. Так, "А-2100" визначає фрагмент у 2100 п.н., одержаний в результаті обробки вихідної молекули ДНК ферментом А. Цей фрагмент видаляють із гелю й обробляють рестриктазою В. При цьому утворюється два фрагменти розміром 1900 п.н. і 200 п.н., тобто розріз, зроблений ферментом В, є на віддалі 200 п.н. від найближчого розрізу ферментом А з одного боку і на віддалі 1900 п.н. від найближчого розрізу ферментом А з іншого боку (рис.2.6).

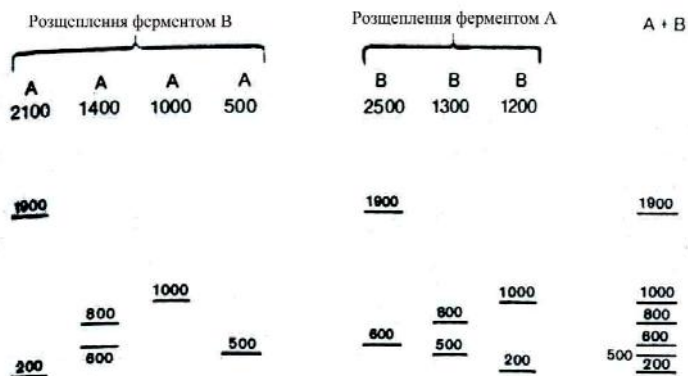


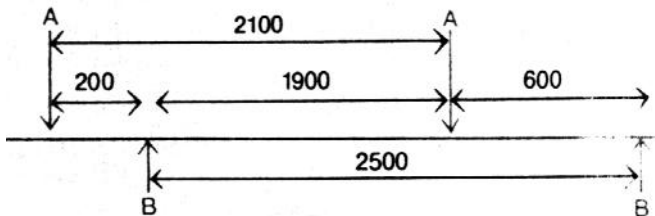
Рис. 2.6. Порівняння результатів обробки ДНК двома рестриктазами дає можливість визначити положення сайтів розщеплення одним ферментом у відношенні до сайтів розщеплення іншим ферментом.

Фрагмент В-2500 гідролізується ферментом А на два відрізки розміром 1900 п.н. і 600 п.н., таким чином фрагмент 1900 п.н. утворюється в результаті двох розрізів – в А-сайті з одного боку і В-сайті з другого. Оскільки, цей фрагмент утворюється розщепленням двох різних фрагментів (А-2100 і В-2500), можна думати, що вони

перекриваються, і зона розміром 1900 п.н. є для них спільною.

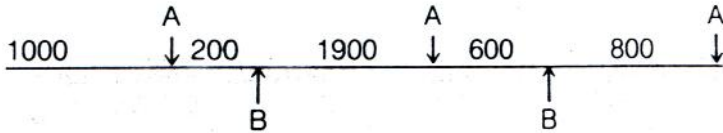
Після аналізу всіх фрагментів виявляється, що кожний фрагмент, одержаний із вихідних А-фрагментів під дією рестриктази В, можна також виявити у зразках, що містять фрагменти, одержані в результаті розщеплення вихідних В-фрагментів ферментом А. У гелі, що містить всі продукти подвійного розщеплення (А+В) (рис.2.6), кожний фрагмент зустрічається один раз. Ці дані дозволяють розташувати на сайти рестрикції. Використання перекриваючих фрагментів - це ключ до рестрикційного картування. Наприклад, фрагмент в 1900 п.н. утворюється або в результаті обробки фрагментів А-2100 ферментом В, або після обробки фрагмента В-2500 ферментом А. Із даних про рестрикцію фрагментів А-2100 і В-2500 випливає, що з одного кінця на віддалі 200 п.н. від фрагмента 1900 знаходиться наступний А-сайт, а з другого кінця, на віддалі 600 п.н. - наступний В-сайт.

На основі цих даних можна нарисувати карту, визначивши на ній вертикальними лініями сайти рестрикції ферментів А і В та розміри фрагментів між ними.



Наступним етапом є продовження картування шляхом визначення, із яких фрагментів утворюються ділянки 200 п.н. з лівого і правого боків. Фрагмент 200 п.н. виникає при рестрикції фрагмента В-1200 рестриктазою А,

що вказує на знаходження наступного В-сайту на віддалі 100 п.н. вліво. Фрагмент 600 п.н. утворюється при розщепленні фрагмента А-1400 рестриктазою В. Тоді наступний А-сайт повинен знаходитися через 800 п.н. вправо. Тепер карта буде мати такий вигляд:



Для завершення побудови карти слід встановити походження двох кінцевих фрагментів. Зліва фрагмент 1000 п.н., виникає або із фрагмента В-1200, або із фрагмента А-1000. Оскільки В-фермент не розрізає фрагмент А-1000, то цей фрагмент повинен знаходитися на кінці карти. Інакше кажучи, починаючи з лівого кінця, перший А-сайт розташований через 1000 п.н., а перший В-сайт - через 12000 п.н.

На правому кінці карти фрагмент в 800 п.н. одержаний після обробки фрагмента В-1300 рестриктазою А. Отже, правіше від нього розташовується фрагмент в 500 п.н.. Рестриктаза В не розриває фрагмента А-500, отже він служить правим кінцем і завершує побудову карти.

Дані, одержані при порівнянні специфічної дії рестриктази А й В, зведені в рестрикційну карту. Таким чином, молекула ДНК розміром 5000 п.н. поділена на серії ділянок відповідної довжини, що розташовані між відрізками, які специфічно пізнаються двома рестриктазами (рис. 2.7).

Після побудови фізичної карти можна здійснювати визначення послідовності ДНК між розташованими близько точками (біля 300 п.н.). Вибираючи найбільш відповідні точки із розшифрованими послідовностями, сполучаючи їх, можна визначити нуклеотидну

послідовність цілого гена. Потім визначену послідовність порівнюють з послідовністю відповідного білка. Це дозволяє виявити ділянки ДНК, відповідальні за структуру білка.

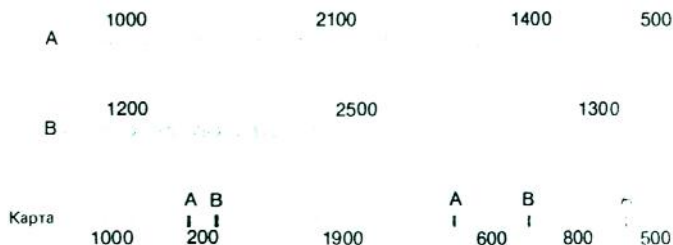


Рис.2.7. Рестрикційна карта ДНК представляє собою лінійну послідовність сайтів розщеплення, що знаходяться на відповідній відстані один від одного.

Окрім ферментних систем, що здійснюють процеси реплікації і транскрипції в клітинах прокаріот та еукаріот проходить взаємодія ДНК з різними ферментами, які модифікують її структуру або репарують (лат. герого-відновлення) пошкодження. Так, у клітині міститься фермент метилаза, яка метилує ДНК, причому в кожному бактеріальному штамі присутній фермент, що визначає тип модифікації його ДНК; цю ознаку можна використовувати для розв'язання питання про походження тієї чи іншої ДНК.

Бактерія здатна відрізнити свою власну ДНК від чужорідної якраз за типом модифікації. Різниця в модифікації робить чужорідну ДНК чутливою до дії рестриктази, яка пізнає відсутність метильних груп у відповідних сайтах. Система рестрикції та модифікації дуже поширена у прокаріот і відіграє важливу роль в захисті резидентної ДНК від забруднення послідовностями чужорідного походження. Метилування в еукаріот має

іншу мету: пізнати гени, що знаходяться в різних функціональних умовах; цей процес не зв'язаний із рестрикцією немодифікованих сайтів.

Пошкодження ДНК зводиться до мінімуму через існування систем, які пізнають ці пошкодження та виправляють їх. Ці системи називаються репаруючими, їх значення в житті клітин таке велике, що, мабуть, за складністю вони не відрізняються від реплікаційного апарату.

Під “пошкодженням” розуміють будь-яку зміну ДНК, яка викликає відхилення від звичайної двохланцюгової структури. До пошкоджуючих факторів можуть бути віднесені такі:

- 1) введення одноланцюгових розривів;
- 2) видалення основ, в результаті чого її ланцюг залишається неспареним;
- 3) перетворення однієї основи в іншу, яка неправильно спарена з основою-партнером;
- 4) введення ковалентних зв'язків між основами на одному ланцюзі ДНК або між основами на протилежних ланцюгах.

Перелічені зміни можна поділити на два основні класи:

1. Точкові мутації. Можуть бути пізнані тому, що вони порушують правильне спарювання основ. Вони не впливають на транскрипцію та реплікацію. Ефект проявляється у майбутньому поколінні.

2. Структурні порушення. Вони складають фізичні перепони реплікації і транскрипції.

Пошкоджений матеріал може бути видалений та замінений за допомогою репаруючої системи, яка представлена набором ферментів, причому виправлення пошкоджень здійснюється по-різному, навіть за принципом рекомбінаційної репарації. Суть її в тому, що йде використання матеріалу однієї молекули ДНК для відновлення іншої. Назва цього типу репарації свідчить



про перекривання її з процесами генетичної рекомбінації. Оскільки для рекомбінаційної репарації необхідно, щоб ДНК-мішені мали решітку, її інколи називають постреплікаційною репарацією. Вона ефективна у випадку дефектів у дочірніх молекулах при реплікації матриці, що містить пошкодження основ.

Біохімічна характеристика репараційних систем клітин еукаріот є на початковому етапі, і в основному, зводиться до виділення випадкових ферментних препаратів, вивчення властивостей яких *in vitro* дозволяє припустити, що вони можуть бути частиною репараційної системи. Існування шляхів ексцизійної репарації встановлено в культурі клітин. Розкрито механізм незапланованого синтезу ДНК в синхронізованій культурі поза S-фазою. Його наявність може бути повністю приписана роботі репараційної системи. Про існування репараційних систем у клітинах ссавців свідчать причини окремих спадкових хвороб людини. Так, захворювання Xeroderma pigmentosum (гіперчутливість до сонячних променів, особливо до ультрафіолетових) є нездатністю клітин здійснювати ексцизійну репарацію, а точніше - вирізати тимінові димери та інші дефектні сегменти. Було ідентифіковано сім генетичних груп комплементації, більшість з яких характеризувалися порушенням стадії, пов'язаної зі здійсненням розрізу при репарації. Деякі дані свідчать про те, що у клітинах ссавців існують системи рекомбінаційної репарації, зв'язаної з процесом генетичної рекомбінації. Наприклад, у випадку рецесивної хвороби людини (синдром Блума) збільшена частота хромосомних аберацій (лат. *aberation* – відхилення), включно з обмінами між сестринськими хроматидами, може бути пов'язана з поразенням рекомбінаційних систем.

### **2.3. ДНК- і РНК-полімерази та пов'язані з ними процеси реплікації, транскрипції і трансляції**

Реплікація, або самоподвоєння, властиве ДНК і РНК як спосіб переносу генетичної інформації відповідно від ДНК до ДНК, або, наприклад, у ряді вірусів від РНК до РНК. Реплікація здійснюється напівконсервативним способом, коли дволанцюгова ДНК деспіралізується і кожен ланцюг індукує синтез комплементарного собі ланцюга за участю ДНК- або РНК-полімерази.

У клітинах *E.coli* виявлені три різні ДНК-полімерази. Вони характеризуються однаковою спорідненістю щодо напрямку синтезу нових ланцюгів ДНК, але відрізняються за активністю. В цілому швидкість реплікації складає від 1000 нуклеотидів у хромосомах прокаріот до 100 нуклеотидів в еукаріот за секунду. Позначаються ДНК-полімерази відповідно I, II, і III. У 60-х роках ХХ століття А.Корнберг виділив із *E. coli* ДНК-полімеразу I, яка представляла собою поліпептидний ланцюг із 1000 амінокислотних залишків. Згодом було встановлено, що ДНК-полімераза I не є основним ферментом реплікації хромосом, але володіє функцією корекції, видаляючи помилково включені в ланцюги ДНК окремі нуклеотиди. Найменше вивчена ДНК-полімераза II. Її активність низька і складає лише 5% від ДНК-полімерази I.

Головним ферментом реплікації ДНК бактеріальної хромосоми є ДНК-полімераза III. Молекула цього ферменту полімеризує більше 15 тисяч нуклеотидів за хвилину. Однак, ДНК-полімераза III, що складається з декількох поліпептидних ланцюгів не здатна ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль відіграє специфічна РНК-полімераза. В еукаріот ДНК-полімераза ділиться відповідно на  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -ДНК-

полімерази. Характеристика ДНК-полімераз наведена в табл.2.2.

Геноми бактерій і фагів реплікуються як єдине ціле, тобто як організовані одиниці реплікації, або **реплікони**. Кожний реплікон містить місце (точку) ініціації Ori (англ. origin-початок) – орієнтований напрям реплікації, наприклад, Ori C в E.coli (рис.2.8).

Таблиця 2.2

Характеристика прокариотичних та еукаріотичних ДНК-полімераз

ДНК-полімераза	Розмір, кДа	Склад	Ферментна активність
ДНК-полімераза із клітини E.coli			
I	109	Одноланцюгова	а) елонгація в напрямку 5'→3' від 3'-ОН-затравки; б) 3'→5'-екзонуклеаза; в) 5'→3'-екзонуклеаза
II	120	-“-	3'→5'-екзонуклеаза;
III	250	Гетеромультимер	а) елонгація в напрямку 5'→3' від 3'-ОН-затравки; б) 3'→5'-екзонуклеаза;
ДНК-полімераза із клітин ссавців			
α	110-120	Декілька субодиниць	Реплікований синтез ядерної ДНК (ядерна ДНК-репліказа)-80%
β	45	1 субодиниця	Репарація сегментів пошкодженої ДНК
γ	60	-“-	Реплікативний синтез мітохондріальної ДНК – 2-15%

У репліконах міститься 240-600 п.н., а деякі мають два Ori, наприклад, у так званих бірепліконах – **човникових векторах**, здатних реплікуватися в клітинах прокариот та еукаріот. Ініціація здійснюється за участю специфічних білків. Реплікація ДНК необхідна функціонуючій клітині для відновлення (репарація),

обміну генами між ділянками хромосом (рекомбінація) і переміщення генів (транспозиція).

Впродовж однократного ділення прокариотичної чи еукаріотичної клітини, незалежно від числа хромосом в ній, весь геном її реплікується також один раз. Подвоєний геном *сегрегуюється* (лат. segregatio - відокремлення) порівну в кожен дочірню клітину. Одиницею сегрегації є хромосома, одиницею ж реплікації – реплікон. Крім того, Ori в репліконі є місце зупинки реплікації *ter* (лат. terminalis - кінцевий).

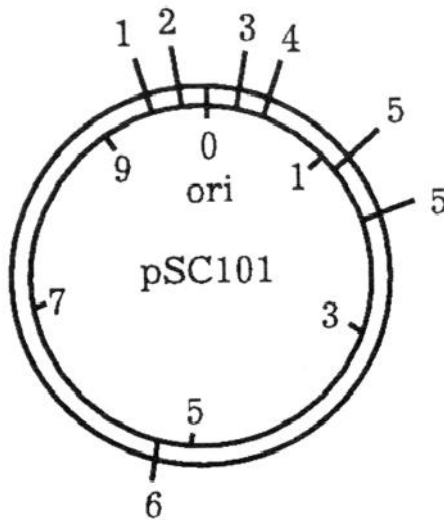


Рис. 2.8. Ori – сайти в плазміді pSC101 E.coli (цифри на внутрішньому крузі 1-6 показують місця дії різних ферментів-рестриктаз).

Одиниці сегрегації та реплікації у бактеріальній хромосомі співпадають, тому що вона містить один реплікон. У той же час кожна плазміда бактеріальної клітини являє собою автономну кільцеву генетичну структуру як самостійний реплікон. В еукаріотичній клітині є велике число репліконів, одиниця сегрегації у них

включає багато одиниць реплікації. Всі компоненти апарату реплікації називають **реплісомою**. Реплікація ДНК починається у стартовій точці, або **реплікаційній вилиці**, в одному (однонаправлена реплікація) чи в двох протилежних (двонаправлена реплікація) напрямках. У другому випадку буде дві реплікаційні вилиці (рис.2.9).

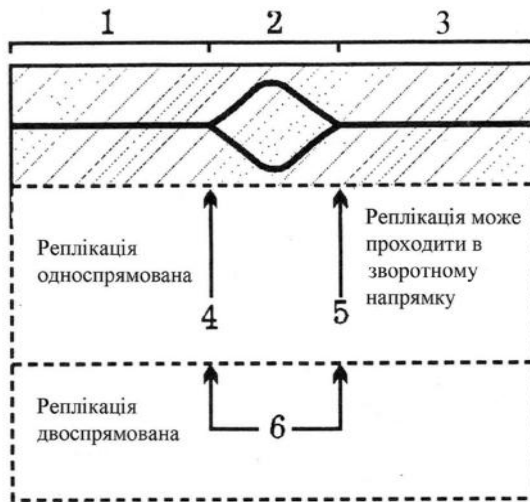


Рис. 2.9. Дві реплікаційні вилиці в ДНК: 1 і 3 – нереплікована ДНК, 2 – репліковане вічко, 4 – стаціонарна точка початку, 5 – рухома реплікаційна вилиця, 6 – дві реплікаційні вилиці.

Реплікація ДНК проходить частинами (рис.2.10). Репліковані відрізки нуклеотидних послідовностей 1000-2000 п.н. називають **фрагментами Оказакі**.

На обох старих ланцюгах новий поліпептидний ланцюг синтезується в напрямку  $5' \rightarrow 3'$  (рис.2.11). Починаючи від точки старту, реплікація здійснюється послідовно на окремих ділянках; при цьому в еукаріот й у

більшості бактерій вона йде вздовж подвійної спіралі ДНК не тільки в одному напрямку, але й у протилежному.

ДНК-полімерази приєднують нуклеотиди тільки вільного 3'-ОН-кінця нуклеотиду, що уже зв'язаний зі старим ланцюгом ДНК. Тільки РНК-полімерази у стані зв'язати перший нуклеотид з ДНК і розпочати новий полінуклеотидний ланцюг. Отже, щоби міг синтезуватися фрагмент Оказакі, спочатку мусить бути прилаштований короткий відрізок РНК (як при трансляції). Ця послідовність РНК із 1-10, рідше до 50 нуклеотидів називається **затравкою**, або **праймером**, і синтезується РНК-полімеразою, або примазою.

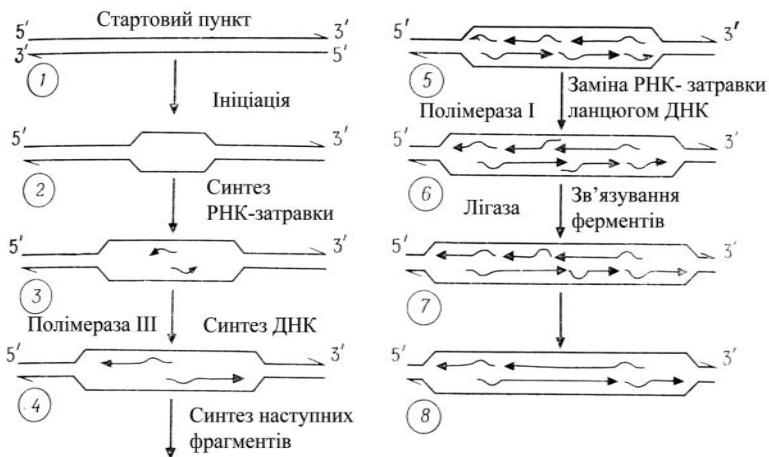


Рис. 2.10. Реплікація ДНК в окремому стартовому пункті.

Від 3'-кінця затравки за участю ДНК-полімерази III синтезується фрагмент Оказакі. Наступний фрагмент Оказакі знову починається з РНК-затравки. ДНК-полімераза I видаляє затравки, а пропуски заповнюються шляхом синтезу ДНК (як при репарації з видаленням ділянки), який приєднується до попереднього фрагменту

Оказакі. Лігаза зшиває між собою синтезовані відрізки ДНК.

Сполучення основ за участю ДНК-полімерази проходить майже безпомилково. Перед зв'язуванням нового нуклеотиду додатково перевіряється правильність сполучення попереднього. Якщо воно було помилковим, невідповідний нуклеотид видаляється завдяки 3'→5'-ендонуклеазній активності полімерази.

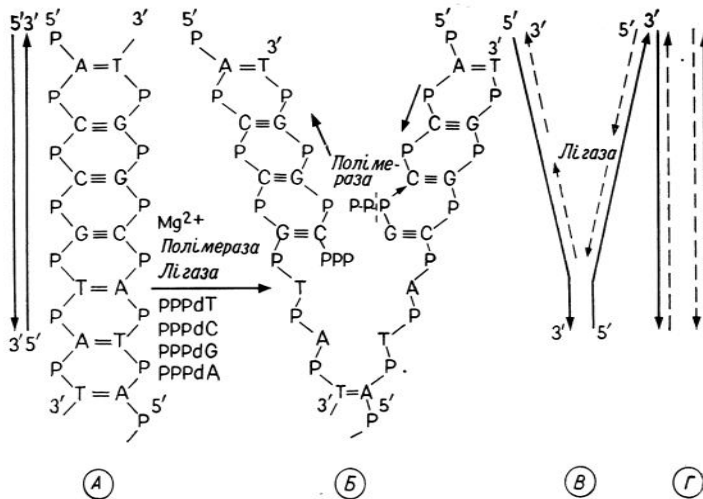


Рис. 2.11. Реплікація ДНК.

А, вихідна молекула ДНК; Б, реплікація молекули ДНК; В, зв'язування фрагментів ДНК лігазою; Г, дві дочірні молекули ДНК.

У затравочну реакцію залучається комплекс білків – **праймосома**. Наприклад, праймосомний білок SSB зв'язується з одноланцюговою ДНК, стабілізує її; білок Dna В утворює передпраймерну РНК і бере участь в переміщенні праймосоми; білок Dna С діє в комплексі з Dna В; білок Lig зшиває розриви між фрагментами

Оказакі; білок п'-АТФ-аза, білки п і п'' утворюють передзатравочну РНК тощо. Вважають, що праймосома формується в одній ділянці з наступним переміщенням вздовж одноланцюгової ДНК до сайтів, де ініціюється синтез затравки. Напрямок руху праймосоми протилежний напрямковій синтезу ДНК відстаючого ланцюга, але синхронний рухові реплікаційної вилки.

Згідно з розрахунками реплікація ДНК у прокариот (разом із розкручуванням молекули по 10 п.н. одночасно) повинна проходити зі швидкістю 400000 обертів за секунду, що значно перевищує реальну швидкість реплікації. Тому було висунуте припущення щодо існування фіксаторів, які включаються в молекулу ДНК. Такі фіксатори виявлені. До них відносяться ферменти *топоізомерази*. Окремі з них каталізують реакцію утворення кільцеподібної структури молекули ДНК – *катенани*. Топоізомераза II, або гіраза, каталізує суперспіралізацію ДНК, а топоізомераза I здатна гідролізувати один із ланцюгів суперспіралізованої ДНК і при цьому ланцюги розкручуються. Число супервитків зменшується, після чого цей фермент ліквідує розрив у ланцюзі ДНК.

Основою у розподілі реплікованих молекул ДНК по дочірніх клітинах (принаймі у прокариот) виступає клітинна мембрана, до якої прикріплюється ДНК.

Отже, весь каталізований ферментами процес реплікації ДНК можна поділити на три етапи: ініціацію, елонгацію (ріст ланцюга) й термінацію. У процесі ініціації проходить розділення ланцюгів ДНК з утворенням реплікаційної вилки, формування праймосоми і синтез затравочної РНК. Етап росту нуклеотидного ланцюга, або елонгації, реалізується в синтезі ДНК під впливом ДНК-полімераз. Термінація, або закінчення синтезу ДНК, проходить завдяки виключенню реакції за допомогою



специфічного “стоп-сигналу” від спеціального кодона (термінатора) у матричному ланцюзі.

Подібні три етапи виділяються у процесах транскрипції і трансляції ДНК. Транскрипція – це процес переписування закодованої у ДНК інформації та перенос її до місця синтезу білка (на рибосоми). Етап ініціації при транскрипції полягає у взаємодії РНК-полімерази з ДНК-матрицею; елонгація – у ферментному синтезі мРНК під дією “стоп-сигналу” від гена - термінатора.

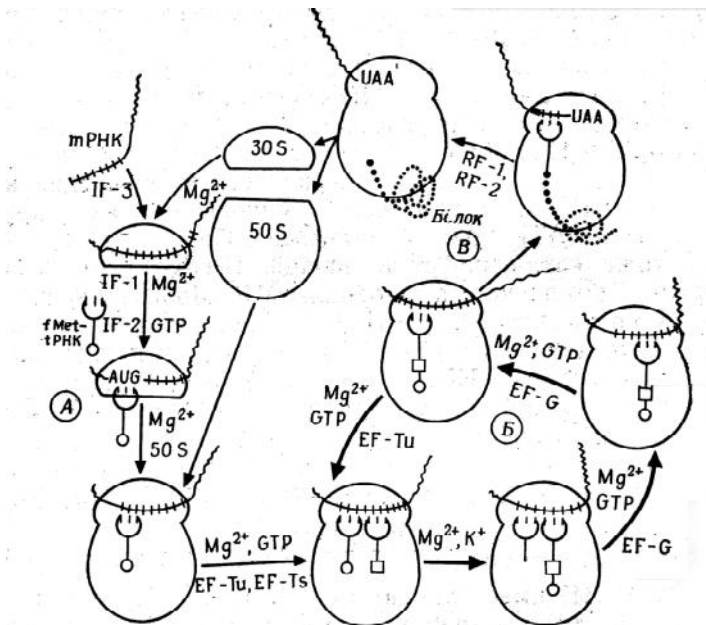


Рис. 2.12. Процес трансляції.

А, ініціація. Б, елонгація. В, термінація. IF-1, IF-2, IF-3 – фактори ініціації; EF-Tu, EF-Ts, EF-G – фактори елонгації; RF-1, RF-2 – вивільнюючі фактори.

Трансляція полягає у переводі закодованої у мРНК інформації в поліпептидний ланцюг. Організуючим центром процесу трансляції є рибосома. При трансляції на

етапі ініціації проходить активація амінокислот за допомогою ферментів аміноацил-тРНК-синтетаз у присутності АТФ з наступним утворенням комплексу ініціації, який містить три фактори ініціації (IF-1, IF-2, IF-3 – у прокариот, eIF-2, eIF-3, eIF-5 та інші в еукаріот), мРНК, гуанізилтрифосфат (ГТФ) і 30S (40S)-субодиницю рибосоми. Цей комплекс сполучається з 50S (60S)-субодиницею рибосоми і формує функціональну 70S (80S)-рибосому.

На етапі елонгації в ході трансляції здійснюється синтез поліпептидного ланцюга функціонуючою рибосомою за участю факторів елонгації (EF-Tu, EF-Ts, EF-G – у прокариот EF-1, EF-2 – в еукаріот) (рис.2.12). Названі фактори не входять у структури рибосом. Під час синтезу білка рибосома рухається вздовж мРНК (рис.2.13), послідовно прочитуючи триплети і поетапно нарощуючи поліпептидний ланцюг. У мРНК, як правило, існує постійна рамка зчитування – кодон АУГ. У процесі елонгації одна мРНК зв'язується із кількома рибосомами, утворюючи функціональний комплекс – полірибосоми (полісоми).

Отже, РНК займає місце посередника між ДНК і білком. Причому центральна функція властива мРНК, тоді як тРНК та рРНК є транскриптами, що володіють активністю на кінцевих стадіях синтезу і функції молекули. Винятками є деякі РНК-вмісні вірусні геноми, на матриці яких синтезується РНК, причому реалізація генетичної інформації може здійснюватися за схемами: для одних вірусів, у яких відсутня транскрипція - РНК → Білок (вірус поліомієліту та ін.); для інших, що містять власну варіонну РНК-полімеразу або варіонну транскриптазу – РНК → РНК → Білок (вірус грипу, кору та ін.); для третіх – РНК → ДНК → РНК → Білок (ретровіруси, в тому числі вірус СНІД).

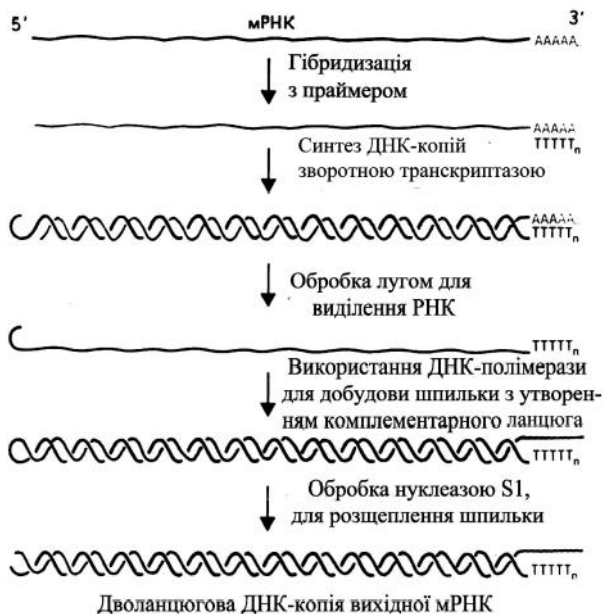


Рис.2.13. Синтез комплементарної дволанцюгової ДНК на мРНК.

мРНК, рРНК і тРНК у бактерій синтезуються під дією однієї й тієї ж РНК-полімерази (мм 480 кДа). У клітинах еукаріот виявлені три ядерні РНК-полімерази (I, II, III), а також РНК-полімерази мітохондрій і хлоропластів. Встановлено, що РНК-полімераза I локалізована в ядерці та відповідає за синтез про-рРНК, із якої у подальшому утворюється 28S і 18S рРНК; РНК-полімераза II каталізує синтез про-мРНК і тільки з цим ферментом зв'язане так зване *кепування* РНК. А.Шаткін у 1976 р. вперше описав характерне угруповання, яке приєднується до 5'-кінця фактично всіх про-мРНК. Автор назвав його КЕПом (англ. cap - шапка). КЕП підвищує стійкість про-мРНК та мРНК до дії окремих рибонуклеаз

та інших гідролізуючих агентів. Приклад КЕПа :  $7^{me}G_{5'ppp}5'N_{r^{me}p} \dots$  (7'-метилгуанозил-5'-трифосфорил-5'-нуклеозил-метилрибозил-фосфорилнуклеотид...); локалізація КЕПа і передуючі йому нуклеозидні послідовності у рекомбінантній плазміді рТК1 показані на рис.2.14. 3'-кінець мРНК, як правило, поліаденіловий.

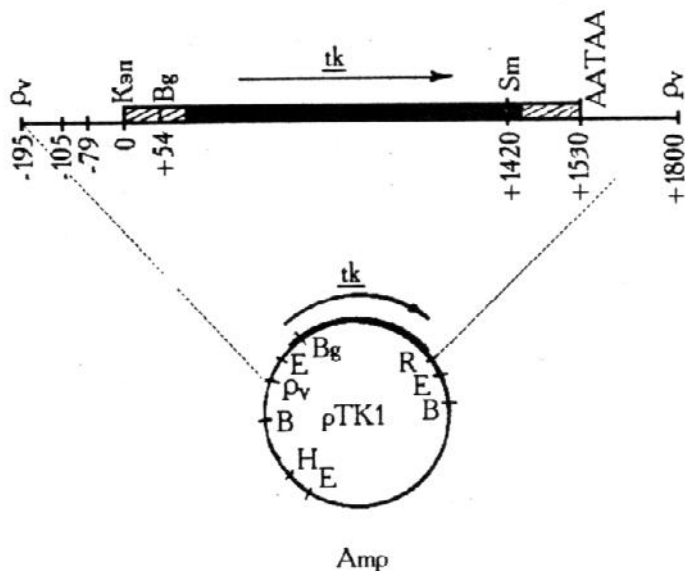


Рис. 2.14 Локалізація КЕПу в рекомбінантній плазміді рТК1 (показана нуклеотидна послідовність, яка бере участь у регуляції експресії гена тимідинкінази – tk; нумерація нуклеотидів здійснена відносно КЕП-ділянки; буквами в середині круга позначені місця дії відповідних ферментів-рестриктаз; Amp – стійкість до ампіциліну).

РНК-полімераза III каталізує синтез 5S РНК всіх тРНК і ряд малих РНК. Швидкість синтезу білків у різних представників надцарств прокаріот та еукаріот варіює в широких межах. Це залежить від багатьох внутрішніх та зовнішніх факторів. І все ж, у бактерій при 37°C за 1

секунду включається у ростучий поліпептидний ланцюг від 10 до 20 амінокислот.

Швидкість синтезу білків еукаріотичною клітиною значно нижча (в середньому за 1 секунду приєднується 1-2 амінокислоти). Це пов'язано з тим, що для синтезу білка з мозаїчного гена, який містить інтрони та екзони потрібен додатковий час.

Ген спочатку транскрибується повністю (за всіма екзонами та інтронами) у вигляді пре-мРНК, яка в ході сплайсингу вивільняється від інтронів та перетворюється на мРНК (рис.2.15). Тільки після цього утворена мРНК включається в процеси синтезу білка.

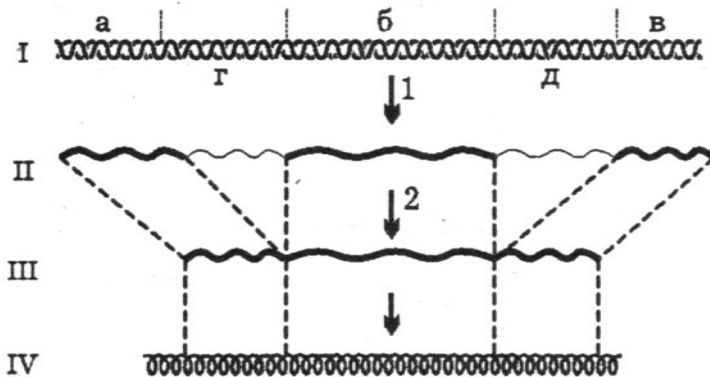


Рис. 2.15 Сплайсинг РНК: 1 – транскрипція, 2 – трансляція, а, б, в – екзони, г, д – інтрони; I – ДНК, II – РНК, III – мРНК, IV – білок.

Ділянка ДНК між правим кінцем інтрона й лівим кінцем екзону називається **акцепторною точкою сплайсингу**. В ДНК мітохондрій інтрони кодують синтез окремих білків, які самі можуть брати участь у процесі вирізання інтронів. Деякі молекули білків (ферменти) кодуються одночасно екзонами та інтронами, наприклад, матураза (англ. mature - дозрівати). Імовірно, що для

кожного інтрона існує мутараза. Інтрони мітохондріальної ДНК подібні до бактеріальних транспозонів і, можливо, мутараза походить від транспозаз.

Існують білки, які кодуються ядерними екзонами та інтронами (м-білки). Вони беруть участь в утворенні та переносі мРНК через ядерну мембрану. При цьому частина білка, яка кодується інтронами, включає переважно гідрофобні амінокислоти. Це зумовлює добру локалізацію у багатій ліпідами ядерній мембрані та притягування мРНК. Частина м-білка, що кодована екзонами, притягує новий поліпептидний ланцюг, який транслюється із того ж екзона. На рівні ядерної мембрани функціонує ферментний комплекс сплайсингу інтронів. У міру проходження сплайсингу зріла мРНК (без інтронів) видаляється через пори ядерної мембрани (рис.2.16). У процесі диференціювання еукаріотичних клітин виявлено неоднотипність сплайсингу ще й у тому, що в одному випадку виступає інтроном, а в іншому може виявлятися екзоном і навпаки.

Так, встановлено, що інтрон цитохрому b – це екзон, який кодує мутаразу. Існують гени, здатні кодувати не тільки один білок. Наприклад, один із генів тканинної сумісності кодує два білки; один із мозаїчних генів щура кодує синтез парат-гормона у паразитоподібній залозі то нейропептидазу в гіпофізі. Тому не можна стверджувати, що “один ген – одна білкова молекула”. Вирізання інтронів із пре-мРНК проходить під впливом ферментів, які пізнають межі інтронів. Якщо пізнавання виявилось неточним, то сполучені екзони будуть кодувати інший білок – пройде зсув рамки зчитування. Такі відхилення в механізмі біосинтезу поліпептидного ланцюга можна порівняти з типографічним браком.

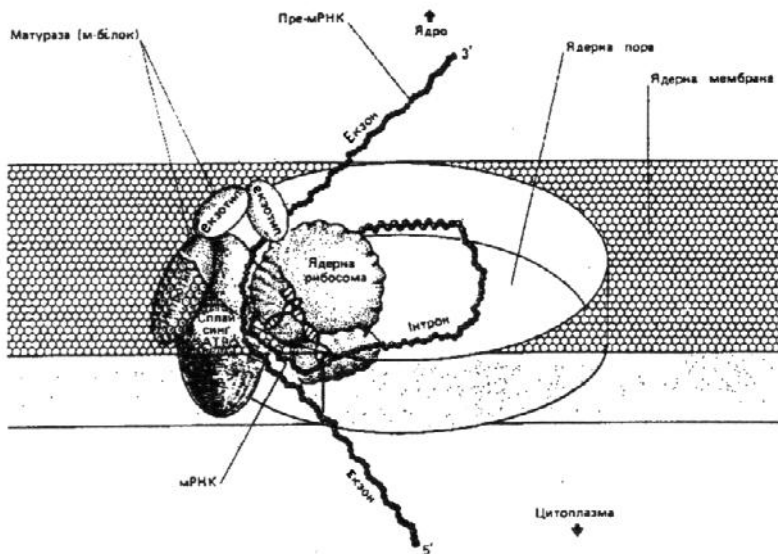


Рис. 2.16. Виділення зрілої мРНК через пору ядерної мембрани за П.Слокімським (1985).

Наприклад у словах “наступила весняна пора” зсунули рамку зчитування й одержали “наступи лавесня напора” (інтервали між словами зараховуються за одну літеру). Механізми сплайсингу можуть бути різними залежно від типу (ядерних чи позаядерних) і класів інтронів (рис.2.17). У 1982 р. Т.Чех відкрив авторестрикцію інтронів у гені рРНК в одного з видів Protozoa. При цьому не вимагається яких-небудь специфічних ферментів та енергії ззовні. Цим доказано автокаталітичні властивості нуклеїнових кислот і запропонований Т.Чехом термін “рибозим” не є алогічним.Компартменталізація еукаріотичної клітини служить важливим доказом спеціального (більш складного ніж у прокаріот) розмежування функцій та прив’язки їх до відповідних структур. Це стосується й білкового синтезу.

Мономерні рибосоми, на відміну від полісом, знаходяться у цитоплазмі клітини у вільному стані. Полісоми, як правило, розташовуються ланцюжком біля ядерної мембрани (зв'язані полісоми) або вони (так звані “вільні полісоми”) асоціюються за допомогою мРНК з клітинним цитоскелетом.

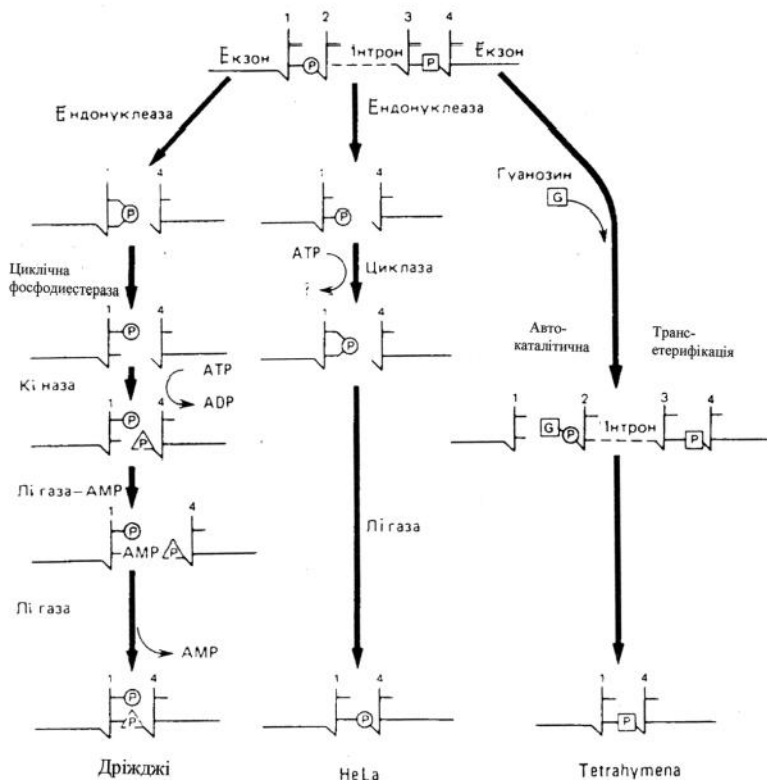


Рис. 2.17. Транскрибування гена (порівняння механізмів слайсингу тРНК у дріжджах, в екстрактах клітин HeLa і самосплайсингу рРНК Tetrahymena). Символи біля фосфатних груп відображають частку кожної з них у процесі реакції.



У геномі людини пара аденілових нуклеотидів зустрічаються з періодичністю 10,5 упродовж будь-якої послідовності ДНК, яка взаємодіє з одиницею гістонового октамера, утворюючи нуклеосому. Ця періодичність добре корелює з періодичністю завитків у В-формі молекули ДНК. Така періодичність аденілових пар кодує закручування спіралі ДНК в одному напрямку навколо комплексу гістонових октамерів (рис.2.18), це й код був названий “хроматиновим”, або “код упаковки хроматину”.

Вважається, що у структурах білків тандемно повторюваних послідовностей потенціал скручування спіралі ніби ампліфікується (англ.amplification – велика кількість). При альтернативних варіантах закручення спіралі (наприклад, півсторонньому) виявляються тандемні блоки пурино-піримідинових основ, які кодують локальну специфічну упаковку ДНК й структуру хроматину в ядрі.

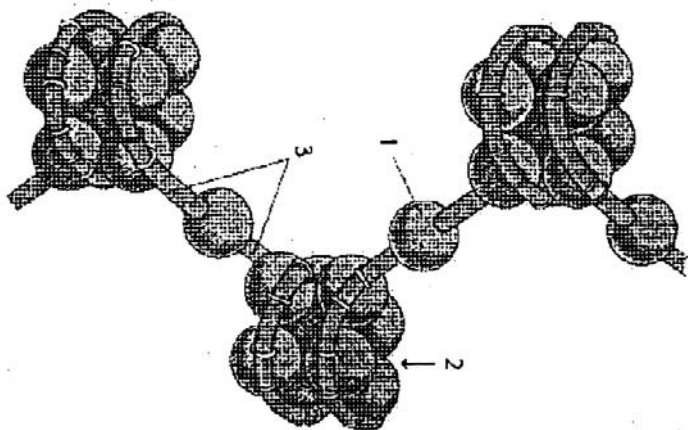


Рис. 2.18. Упакування хроматину на прикладі нуклеосоми: 1 – гістон Н1, 2 – двоспіральна ДНК, яка містить 8 молекул гістонів – по 2 молекули Н2А, Н2В, Н3 і Н4, 3 – спейсерна ділянка ДНК.

Локус-специфічний “код упаковки хроматину”, який бере участь не тільки у структурній організації хромосом у ядрі клітини, але й може виступати як “код експресії гена”, “код реплікації” (сайти реплікації протягом цієї повторюваної послідовності) і “код рекомбінації”.

## 2.4. Зворотні транскриптази (Ревертази)

На початку 70-х років у структурі онкогенних вірусів виявлено білок-фермент зворотної транскриптази, або ревертази. За допомогою цього ферменту в клітинах може проходити синтез ДНК на РНК. Це був принципово новий, невідомий раніше шлях передачі спадкової інформації.

У 1970 році Г. Темін, Д. Балтімор, С. Мізутамі, вивчаючи вірус саркоми Рауса, встановили, що він містить фермент зворотної транскриптази, аналогічний ДНК-полімеразі, але синтезуючий ДНК не на ДНК, а на РНК. Біологічна роль ревертази полягає у синтезі копій ДНК (кДНК) з геномів РНК деяких РНК - вмісних вірусів, здатних синтезувати на матриці РНК комплементарний до неї ланцюг ДНК. У подальшому проходить експресія гена, тобто транскрипція з ДНК на РНК і трансляція, в ході якої синтезуються білки онкогенних вірусів.

Зворотна транскрипція      Транскрипція      Трансляція  
РНК      —————>      ДНК      —————>      РНК      —————>      білок

У життєвому циклі віруса саркоми Рауса зворотна транскриптаза відіграє унікальну біологічну роль. Ревертаза виявлена і в клітинах еукаріот при зараженні їх онкогенними вірусами, які містили РНК. Відкриття зворотної транскриптази відіграло принципово важливу роль для вирішення вузлових питань сучасної молекулярної генетики, молекулярної біології та знайшло

застосування в генетичній інженерії як інструмент при синтезі кДНК. Вона необхідна для клонування і при одержанні гібридизаційних зондів, тобто часткових копій генів. У 1976 році вдалося здійснити ферментний (за допомогою ревертази) синтез гена, відповідального за структуру тваринного глобіну. Наявність зворотної транскрипції в життєвому циклі РНК-вмісних антигенних вірусів не суперечить основній догмі молекулярної генетики, яка стверджує, що при гетерокаталітичному функціонуванні ДНК генетична інформація передається тільки від ДНК до РНК і не може бути її зворотного переносу від білків до нуклеїнових кислот.

### III. ГЕНЕТИЧНІ ВЕКТОРИ

Вектори - це молекули ДНК, які використовуються для введення чужої генетичної інтеграції і забезпечують там її ампліфікацію або інтеграцію в геном.

Для виконання біологічних та генетичних функцій вектори повинні володіти відповідними властивостями:

а) здатністю до автономії (позахромосомної) реплікації і мати ділянки клонування для введення в реципієнтну клітину чужорідної ДНК, щоби стабільно підтримувати в клітині господаря чужу генетичну інформацію. Вектор повинен мати лиш один сайт рестрикції та бути репліконом:

б) мати відповідні маркери (наприклад, стійкість до антибіотиків), які дозволяють легко виявити трансформовані клітини;

в) введення чужої ДНК не повинно перевищувати суттєвих функцій вектора.

На відміну від багатьох біологічних молекул, які характеризуються широким генетичним поліформізмом, вектор, як правило, відрізняється вузькою спеціалізацією, що дозволяє використовувати його для вирішення спеціалізованих завдань. У генетичній інженерії застосовують в якості векторів плазміди, бактеріофаг  $\lambda$ , ниткоподібні бактеріофаги та косміди.

#### 3.1. Плазміди

Всередині бактеріальної клітини є ядерна зона (ДНК) і цитоплазма (рибосоми). Хромосоми бактерії, які не відділені оболонкою від цитоплазми, представлені двонитковими, рідше - одноститковими молекулами нуклеїнових кислот, а в окремих випадках – тільки молекулами РНК. Генетичний апарат утворений єдиною кільцевою хромосоною без основних білків – гістонів.

Типова бактерія містить біля  $10^{-11}$  мг ДНК, що відповідає  $2 \cdot 10^7$  нуклеотидів.

Довгий час вважалося, що статевий процес у бактерій відсутній. Однак, генетичні дослідження (перш за все Д.Ледерберга) показали, що у роді бактерій, наприклад, *E. coli*, існує примітивна форма статевого розмноження. Ледерберг виявив екстрахромосомну генетичну структуру бактерій, яка була названа фактором фертильності, кон'югації, генетичного переносу і позначена літерою F. Суть полягає в односторонньому переносі генетичного матеріалу - епісоми із однієї клітини в другу при їх кон'югації (лат. conjugation – з'єднання). В популяції *E.coli* виділені чоловічі бактерії  $F^+$  і жіночі  $F^-$ . Під час статевого процесу бактеріальна клітина  $F^+$  кон'югує з клітиною  $F^-$  і передає їй свій генетичний матеріал. Пізніше було виявлено популяції клітин  $F^+$ , здатні до високої частоти рекомбінацій. Такі клітини названі Hfr.

Статевий фактор, який містить тільки чоловічі клітини, являє собою маленьку додаткову хромосому, яка складається із ДНК. За пропозицією Д.Ледерберга статевий фактор  $F^+$  отримав назву плазміди.

Фактор  $F^+$  є саморепродукуючим генетичним елементом. Однак він може знаходитися в бактеріальній клітині у двох станах: автономному й інтегрованому. В автономному стані  $F^+$  - фактор не є частиною бактеріальної хромосоми і тому реплікується незалежно, хоча й синхронно з нею. При реплікації чоловічої клітини утворюються тільки чоловічі клітини. При кон'югації цитоплазматичною трубкою  $F^+$  переходить у жіночу  $F^-$  клітину, внаслідок чого вона перетворюється в чоловічу. Інша картина спостерігається у клітин Hfr. У цьому випадку фактор Hfr знаходиться в інтеграційному стані, виступає як частина бактеріальної хромосоми і

реплікується як її частина. Включений у бактеріальну хромосому фактор Hfr реплікується разом з нею і при кон'югації з жіночими клітинами, останні не перетворюються на F<sup>+</sup> клітини.

Ф. Жакобу експериментально встановив, що за своєю плазмідною природою статевий фактор F, будучи саморепродукуючим генетичним елементом, лише додається до генома бактеріальної клітини і, мабуть, його присутність у клітині необов'язкова. Надалі, крім статевого фактора F, були відкриті інші малі додаткові хромосоми, існування яких також не зв'язане з функціями клітини. Це плазмідні T, FP, P та інші. Ці фактори разом з F склали поняття епісоми. Такі епісоми не тільки володіють здатністю автономної реплікації, а й деякі з них, наприклад F-фактор, можуть вбудовуватися в бактеріальну хромосому.

З'ясовано, що плазмідами бактерій є молекули ДНК від 2250 до 400 тисяч пар нуклеотидів. Якщо порівнювати довжину плазмід та бактеріальної хромосоми, то виявляється, що у крупних плазмід її довжина складає біля 1%, тоді як у дрібних – всього 0,05% довжини хромосоми бактерій. За формою бактеріальна хромосома і плазмід не відрізняються. Як і основна хромосома бактерій, плазмід являє собою голу кільцеву молекулу ДНК, розташовану в цитоплазмі клітин. Об'єм інформації, сконцентрованої в малих плазмідах, дозволяє їм кодувати молекули двох і більше білків; у крупних плазмідах кодуючі можливості достатні для 200 та більше білків.

Крім бактерій, малі кільцеві молекули ДНК (1,1-2,0 мкм діаметром) зустрічаються в цитоплазмі клітин еукаріот (дріжджі *Neurospora*, *Euglena*, трипаносомах, а також у культурах клітин мишей, мавп, людини). Їх фізико-хімічні властивості вивчені добре, але біологічна роль повністю не з'ясована.

**Фактори генетичного переносу** – це не що інше, як статевий фактор F, що зумовлює при кон'югації перенос генів. Такі плазмідни здатні до безкінечно довгого відтворення в автономному або екстрахромосомному стані. Бактерії, що містять ці плазмідни, служать генетичними донорами. Вони здатні схрещуватися з клітинами, які позбавлені плазмід.

**Фактори стійкості до лікарських речовин, або R-фактори** (від англ. resistance-стійкість), контролюють синтез ферментів, які надають бактеріям стійкість до антибіотиків, сульфамідних препаратів та інших ліків, шляхом їх гідролізу або модифікації (ацетилюванням, аденілюванням, фосфорилуванням). Крім генів, що детермінують стійкість бактерій до ліків, ці плазмідни мають фактори генетичного переносу, який здійснюється шляхом утворення кон'югуючого мостика. Такі плазмідни можуть проникати в бактеріальні клітини не тільки свого, але й іншого виду, а також покидати клітину. Стабільне збереження плазмідни у клітині можливе, якщо вона містить фактори стійкості до конкретного виду ліків, наприклад, до якогось антибіотика. У цьому випадку в колонії чи клоні зберігаються тільки бактеріальні клітини, що містять дану плазмідну. Інтенсивність селекції плазмід на стійкість залежить від концентрації ліків.

Плазмідни становлять 1-3% генома бактеріальної клітини. Однак, навіть така мізерна частина спадкового апарату кодує важливі генетичні ознаки, які бактеріальна хромосома не кодує. Наприклад, вони містять інформацію, необхідну для кон'югації бактеріальної клітини, ними обумовлений ряд захворювань рослин і тварин. Вони зумовлюють використання клітинами багатьох складних сполук як джерела живлення і забезпечують стійкість до багатьох токсичних агентів, особливо до антибіотиків. Плазмідни стафілококів несуть гени стійкості до пеніциліну,

сполук ртуті, ряду солей важких металів, які викликають летальний ефект (солі сурми, вісмуту, кадмію, свинцю, арсенітні й арсенатні йони). Гени стійкості до важких металів виявлені також у складі R-плазмиди *E.coli*. Найважливішою плазмидою обумовлені захворювання з вираженою діареєю, стафілококовим імпетіго, скисання молока і перетворення його в сир молочними бактеріями, а також різноманітні біохімічні реакції, характерні для бактерій роду *Pseudomonas*. Плазмиди можуть управляти синтезом інсектициду в клітинах *Bacillus Thuringiensis*.

Використання плазмид як векторів для введення чужорідних генів у бактеріальні клітини розпочато з 1975 року послужило поштовхом для інтенсивних досліджень їх структури і характеру реплікації.

Кількість плазмид в клітині коливається від 1 до 1000; в цілому, чим крупніші плазмиди, тим менша кількість їх копій у клітині. Звичайно реплікація плазмиди регулюється незалежно від реплікації хромосоми. Оскільки плазмиди можуть різнитися за кількістю копій в одній і тій же клітині, кількість копій повинна визначатися регуляторною системою. Така система була описана в 1972 році Нордстремом для плазмиди R1 *E.coli*.

Подібні регуляторні системи знайдено у плазмид стафілококів. Кількість копій плазмиди R1, скоріш за все залежить від білків, що пригнічують реплікацію. Сегмент ДНК довжиною не більше 2000 пар нуклеотидів управляє реплікацією плазмиди, яка більш ніж у 50 разів крупніша від нього.

Гени, що обумовлюють лікарську стійкість, можуть бути в плазмідних факторах R. Тоді формується ознака множинної лікарської стійкості. Інтенсивна хіміотерапія проти бактеріальної дизентерії призводить до того, що один зі штамів збудника цієї хвороби *Shigella dysenteriae* набув стійкості одночасно для всіх чотирьох



використовуваних у лікарських цілях препаратів - хлорамфенколу, стрептоміцину, тетрацикліну і сульфаніламідів. Явище множинної стійкості до ліків тепер широко розповсюджене у патогенних і непатогенних бактеріях (*Salmonella*, *E.coli*). Японці встановили, що до 65% штаму *Shigella* і 50% штамів всіх інших кишкових бактерій, одержаних від хворих дизентерією, виявилися стійкими до стрептоміцину, тетрацикліну і хлорамфеніколу. В плазмідах поряд з декількома генами резистентності, міститься фактор переносу цієї стійкості RTF. Гени фактора RTF мають багато подібного з генами фактора F *E.coli* й забезпечують реплікацію і кон'югацію. Плазмиди R часто є носіями ділянки RTF. У такому випадку вони, при спільному культивуванні, можуть передаватися іншим видом бактерій, що свідчить про трансмісійне походження суті множинної ознаки лікарської стійкості. Так, ген, що обумовлював стійкість бактерій до тетрацикліну може переходити із плазмиди R у фаг, який розмножується в клітинах *Salmonella*, а потім у хромосому *Salmonella*; із хромосоми переходить у фаг  $\lambda$ , а потім в *trp* - оперон *E.coli* й знову у фаг  $\lambda$ . Такі міграційні генетичні елементи прокаріот, які кодують стійкість до відповідних хімічних сполук, були названі **транспозонами**.

Транспозуючі елементи відіграють активну роль в еволюції деяких бактеріальних плазмід. Транспозони здатні реплікуватися і впроваджуватися (інсекція) у вигляді однієї із копій у новому місці генома (ДНК ядра). У бактерій переважаюча частина транспозонів кодує фермент **транспоназу**, який каталізує реакцію вбудови транспозона в ДНК. При аналізі послідовності нуклеотидів у ДНК-господарі до і після вбудови транспозона виявилось, що декілька нуклеотидів (найчастіше 5) цієї ДНК огортає транспозон своїми інвертованими повторами



повністю не вивчене. Існує припущення, що принаймні деякі транспозуючі елементи не дають ні переваг, ні шкоди клітині, а представляють собою “егоїстичну ДНК”, зайняту тільки власним розмноженням.

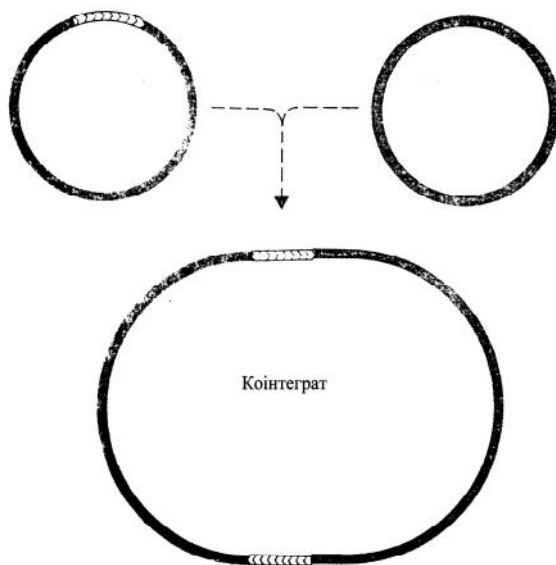


Рис.3.2. Транспозиція може призводити до зливання донорського і реципієнтного репліконів з утворенням коінтегра́ту

Згідно з цією теорією, взаємозв’язок транспозона з геномом нагадує відношення між паразитом і господарем. Однак встановлено, що довільна транспозиційна подія забезпечує селективну перевагу, наприклад, генетичні перебудови здійснюються краще геномом, який несе активний транспозон.

Із відомих транспозонів найкраще вивчені Тп 1, Тп 2, Тп 3. Вони зумовлюють стійкість до ампіциліну; Тп 4 - до стрептоміцину, ампіциліну та сульфаніламідів, Тп 5 і Тп 6 - до каноміцину.

Як вже було відзначено, міграція транспозонів забезпечується наявністю на їх кінцях інвертованих повторів. Характерною особливістю цих послідовностей є те, що вони не містять жодних кодуючих властивостей, тобто їм притаманна генетична інертність. У даний час добре вивчені п'ять послідовностей (IS1, IS2, IS3, IS4, і IS5). Їх часто ототожнюють з інтронами. Ці елементи виявлені в *E.coli*, *Salmonella thymurium*, *Citrobacter freundii*, в деяких плазмід (F, R) і поміркованого фагу  $\lambda$ . Так, хромосома *E.coli* містить вісім IS1 та п'ять IS2 - елементів, які різняться від вірусів і плазмід тим, що автономно реплікуватися не можуть. Але їх назвати повним інертним генетичним матеріалом неможливо, оскільки вони, представляючи новий вид послідовності, впливають на експресію сусідніх генів, можуть виконувати функцію нових промоторів, блокують транскрипцію дістальних генів транскрипційної одиниці, можуть індукувати делеції та інверсії, які призводять до хромосомних перебудов, володіють здатністю вбудовуватися і включатися в бактеріальний геном у різних місцях незалежно від гена *res A*.

Цікавим фактором є те, що Т псорія із дрозозфіли веде себе і як транспозор, і як ретровірус (до них відноситься також вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) - СНІД). У таких вірусах інтеграція ДНК здійснюється подібно до транспозиції. Тому небезпідставною стала гіпотеза про те, що віруси - це транспозони, які набули додаткових функцій або навпаки, транспозони – це вироджені віруси.

**Коліциногенний фактор.** Цей фактор містить гени, які викликають синтез особливих білкових речовин - коліцинів. У більшості випадків бактерії містять тільки одну таку плазмиду. Добре вивчені вони в геномі *E.coli* й позначаються  $Co1E_1$ ,  $Eo1E_2$  тощо. Дія коліцинів

характеризується різними механізмами. Так, біологічна дія  $ColE_1$  реалізується шляхом інгібіції процесів окиснювального фосфорилування. Бактерицидний ефект  $ColE_2$  досягається за рахунок гідролізу ДНК, а  $ColE_3$  викликає деградуючу дію на 3'-кінець 16S-рРНК, у зв'язку із чим порушується біосинтез білка, так як рРНК втрачає здатність до взаємодії з мРНК.

Вперше плазмиду  $ColE_1$  запропонував у 1974 р. Д.Хелінський. Це найпростіший вектор, який має один сайт пізнання  $EcoR1$ . Плазміда відноситься до групи коліциногенних факторів і забезпечує в *E.coli* синтез антибіотика коліцину.  $EcoE1$  являє собою кільцеподібну молекулу ДНК. У присутності антибіотика хлорамфеніколу проявляє здатність до ампліфікації (число копій на клітину досягає 3 тисячі).

Другим плазмідним вектором *E.coli*, одержаним С.Коеном, є плазміда  $pSC101$ . Вона містить ген стійкості до тетрацикліну і, подібно до  $EcoE1$ , має лише один сайт пізнання рестриктази  $EcoR1$ . Розмір плазміди  $pSC101$  складає 9,1 п.н., а молекулярна маса -5,8 млн. дальтон. На відміну від плазміди  $EcoE1$ , при її розщепленні рестриктазою  $EcoR1$  гени стійкості до антибіотика не зачіпаються. За цим селективним маркером можна віднайти клони з цією плазмідною.

### **3.2. Фагові вектори**

У генетичній інженерії, крім плазмідних векторів, для переносу бактеріальних генів у реципієнтні клітини використовують також інші вектори (найчастіше - фаги бактерій). Віруси бактерій називають бактеріофагами, або скорочено фагами. Відомо декілька типів фагів, які заражають бактерії *E.coli*. форми фагів різноманітні, але

завжди вони мають головку та хвіст. Об'єм частинок фага складає біля 0,001% об'єму клітини *E.coli*.

Фаги зручні для вивчення генетичних комбінацій. Це обумовлено тим, що геном містить лише одну невелику за розміром хромосому, а життєвий цикл їх короткий. Встановлено, що при проникненні фага в бактерію в клітині проходить реплікація фагової ДНК, в результаті чого утворюється фонд хромосом фагів. Н.Вісконті та Д.Дельбрук у 1953 р. сформулювали теорію генетичних рекомбінацій у фагів. Згідно з цією теорією геном фагів складає внутріклітинний схрещувальний фонд. Після створення фонду проходить синтез білкових компонентів, які об'єднуються з молекулами ДНК фага, і на цій основі утворюється нове покоління фагових частин.

Відомо, що фагова хромосома у бактеріальній клітині в окремих випадках не реплікується автономно, а інтегрується в хромосому бактерії і стає ніби частиною її генетичної програми. Такі фаги одержали назву **помірних**. При введенні в хромосому бактеріальної клітини вони перетворюються у **профаги**.

Бактерія, що несе профаг, називається **лізогенною**. Вона, набуваючи властивості фага, володіє здатністю до розмноження і створення клонів протягом ряду поколінь. За допомогою профага бактерія може набути імунітету до зараження цим видом помірною фага. При відповідних умовах у лізогенних бактеріях профаг вивільняється із хромосоми бактерії і в якості самостійної молекули ДНК реплікується та розмножується в клітині. Цикл літичного розвитку можна розділити на дві основні частини, що приведені на рис.3.3.

**Рання інфекція** включає період від проникнення ДНК в клітину до початку її реплікації. **Пізня інфекція** включає період від початку її реплікації до кінцевої стадії лізису бактеріальної клітини і виходу нащадків фагових

частин. За звичайних умов рання фаза пов'язана з утворенням ферментів, які беруть участь у реплікації ДНК. Це ферменти, що здійснюють синтез ДНК, реплікацію і, часом, модифікацію. Внаслідок дії цих ферментних систем у клітині нагромаджується **пул** фагових геномів.

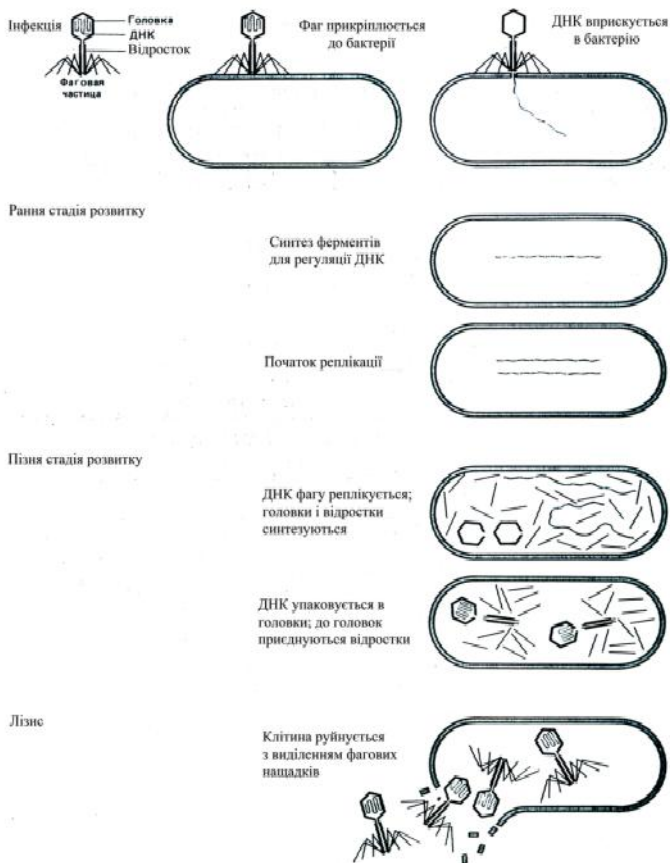


Рис.3.3. Літичний розвиток проходить шляхом утворення великої кількості фагових геномів і білкових частин, які об'єднуються, утворюючи нащадків фагів

У цьому пулі геноми безперервно реплікуються і рекомбінуються таким чином, що події, які проходять навіть у процесі одного літичного циклу мають відношення до цілої популяції фагових геномів. У пізній фазі синтезуються білкові компоненти фагових частин. Для утворення головки і різних структур відростка необхідна значна кількість білків. Тому велика частина фагового генома кодує пізні функції. Поряд із цим існують так звані білки монтажу, присутність яких необхідна для конструювання частинки. Самі по собі ці білки не входять до складу фагової частинки. На той час, коли білкові компоненти монтуються в головки і відростки, реплікація досягає максимальної швидкості. Опісля, геном упроваджується у пусті білкові головки, до них приєднуються відростки і клітина підпадає лізисові. Частинки поміркованого фага виходять у зовнішнє середовище і заражають нові клітини бактерій. Таке явище називається **індукцією** і може відбуватися спонтанно та викликатися штучно. У бактерій відомі інші способи перекомбінації батьківських генів. До них відносять **трансдукцію** – явище переносу фрагменту хромосоми однієї бактерії в іншу при допомозі фага.

Генетична взаємодія профагів з бактеріями добре вивчений на фазі  $\lambda$ . Вбудова профагу в бактеріальну хромосому проходить у три етапи (рис.3.4). На першому етапі кінцева хромосома фага  $\lambda$  прикріплюється у точці att  $\lambda$  бактеріальної хромосоми. На другому етапі хромосома фага розривається між h і c (зона  $b_2$ ), а бактеріальна хромосома – між генами gal і trp. У результаті цього проходить обмін гетеролітичних відрізків та сполучення їх кінців. На третьому етапі утворюється суцільна генетична структура. Вона включає геном фага  $\lambda$ , вбудований у кільцеву хромосому бактерії між генами gal і trp. Фаг  $\lambda$  має



одну хромосому у вигляді молекули ДНК, укладену в білкову оболонку – капсид. Послідовність нуклеотидів у ДНК складає 6500 п.н.

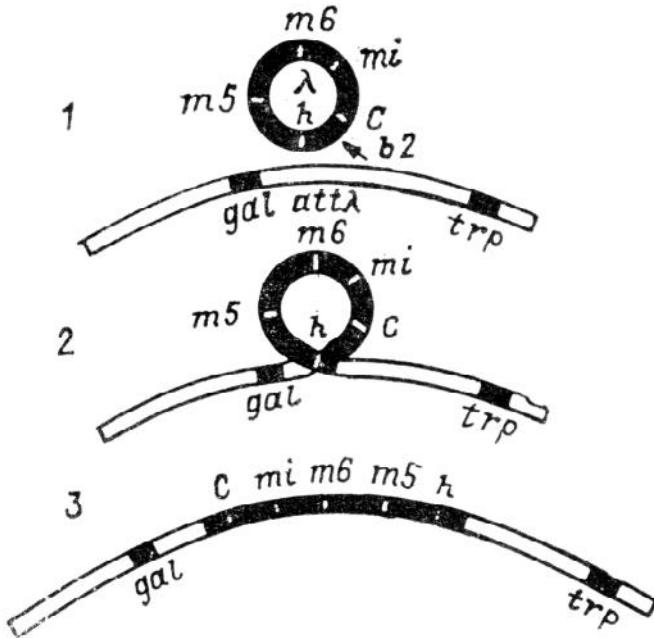


Рис. 3.4. Вбудова профага у бактеріальну хромосому.

На кінцях хромосоми є одноланцюгові комплементарні ділянки із 12 нуклеотидних залишків – сайтів. Вони забезпечують перетворення лінійної молекули ДНК в кільцеву (рис. 3.5). У молекулі λ ДНК виділено біля 60 генів. Короткочасне перебування у бактеріальній клітині супроводжується рекомбінацією фага λ. Якщо одну і ту ж бактеріальну клітину заражають двома генетично різними штамми фага, частина нащадків містять гени вихідних штамів.

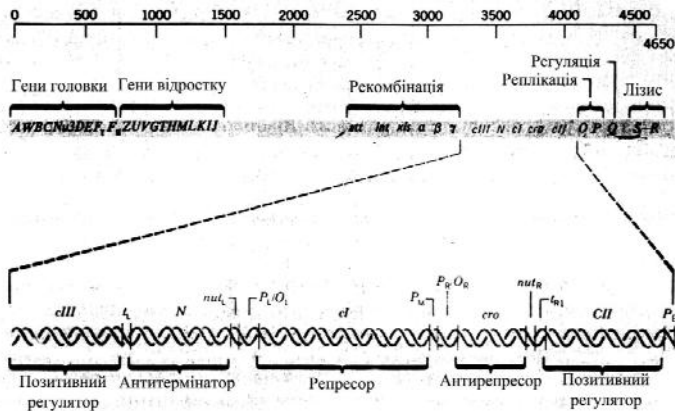


Рис. 3.5. Карта генома фага  $\lambda$ . Гени зі спорідненими функціями згруповані в кластери. Генوم вміщає 46500 пар основ.

Встановлено вплив на фаговий генетом двох різних систем рекомбінації – одної, яка належить самому вірусу й другій, належної бактеріальній клітині. Ферменти рекомбінації фага  $\lambda$  *E.coli* виділені, їх властивості вивчені *in vitro*. Так, білок, синтезований у результаті експресії вірусного гена *red  $\alpha$*  розщеплює один із ланцюгів ДНК, оголюючи другий ланцюг. У свою чергу білок *Rec A*, який синтезується бактерією *E.coli*, покриває одноланцюгову вірусну ДНК і зумовлює пошук гомологічного сегмента в іншій хромосомі. Другий вірусний ген *red  $\beta$*  кодує білок, який створює умови об'єднання одноланцюгової ділянки ДНК з гомологічною ділянкою іншої хромосоми.

Після того, як фаг  $\lambda$  проникає у клітину у вільному вигляді (*трансфекція*, або шляхом інфекції клітинами фаговими частинами, він замикається у кільце при допомозі липких кінців. Така молекула стає субстратом для реплікації (рис.3.6). Протягом 15 хвилин після інфекції проходить двонаправлена реплікація ( $\ominus$ -реплікація), й

утворюється певне число мономерних кільцевих копій ДНК фага. Пізніше основним продуктом реплікації стають лінійні конкатеновані молекули, які утворюються за механізмом “кільце, що котиться”. В кодї процесингу конкатенової ДНК ферменти упаковки пізнають два *cos*-сайти, які розділені нуклеотидним проміжком (40-52 п.н.) і розщеплюють по них ДНК з утворенням “липких” кінців. Одержаний зрілий лінійний геном фага, обмежений “липкими” кінцями і входить до складу інфекційної фагової частини.

Перші фагові вектори з використанням різних делецій були сконструйовані А. Рамбахом і П. Тіоле в 1974 р. Пізніше вектори створювалися безпосередньо із фрагментів ДНК, утворених під дією *EcoR*I. Р. Девіс використав для цього фаг  $\lambda$  і рестрикційну нуклеазу *EcoR*I, одержавши універсальний вектор *gt*.

Фагові вектори мають ряд переваг. Їх ємність обмежена, і це дозволяє селекціонувати рекомбінантні молекули ДНК безпосередньо за молекулярною масою. Упаковують ці молекули *in vitro* в білкові капсиди, які неважко видаляти у великих кількостях.

### **3.3. Косміди і ниткоподібні фаги**

Для клонування великих фрагментів ДНК і конструювання геномних бібліотек в якості векторів використовують косміди. Це плазміди, які містять вбудовану *cos*-ділянку фага  $\lambda$ , внаслідок чого плазмідна ДНК може бути упакована *in vitro* в оболонку фага. Косміди суміщають позитивні властивості плазмід і фагів, володіючи здатністю, як і плазміди, довгий час автономно реплікуватися в клітині й упаковувати власну ДНК у головки фагів, якщо їх розмір не перевищує 93 тисяч

нуклеотидних пар. Основними компонентами космідного вектора є:

- 1) плазмідний реплікон;
- 2) маркер резистентності до антибіотика;
- 3) фрагмент ДНК фага  $\lambda$ , який містить *cos*-ділянку.

Для того, щоби мати можливість клонування фрагменти ДНК розміром до 45 тисяч пар основ, реплікон, маркер антибіотикорезистентності і *cos*-ділянка повинні розташовуватися на мінімальному фрагменті ДНК (рис. 3.6).

Головна перевага космідного вектора при конструюванні бібліотек - велика довжина фрагментів, що клонуються, та відсутність великих ділянок генома фага  $\lambda$ , які можуть створювати труднощі при картуванні  $\lambda$ -рекомбінантів за допомогою рестриктаз.

Недоліком космідної системи є низький вихід рекомбінантних молекул, і скринінг методом гібридизації ДНК менш ефективний, ніж для фагів. Але є відомості про використання як альтернативи для гібридизованого скринінгу, селекції космідних клонів за гомологічною рекомбінацією з плазмідною, яка кодує стійкість до додаткового антибіотика.

Одержано вектори на основі одониткових бактеріофагів. Їх перевага в тому, що ДНК, виділена із рекомбінантних фагових частинок, одониткова і може використовуватися як матриця при секвенуванні ДНК методом Сенгера. Наприклад, циклічна ДНК фага M13 має біля 6500 п.н., із яких 507 є не суттєвими для реплікації вірусу. Тому вставка в цю зону чужої ДНК практично не впливає на життєздатність фага.

Звичайно, для успішного вирішення завдань, які постають перед генетичною інженерією, необхідно володіти адекватним арсеналом методичних засобів.

Очевидно для кожного організму вимагається конструювання своїх векторних систем. При цьому необхідно дотримуватися таких умов:

а) стабільна реплікація в клітині вектора і його рекомбінантних похідних;

б) функціональна активність генів, які вводяться в клітину;

в) клітини, що містять вектор або його похідні, повинні легко ідентифікуватися, на відміну від вихідних, за допомогою тест-систем, заснованих на фенотиповому прояві ДНК, що вводиться в клітину;

г) векторна ДНК та її рекомбінантні похідні в процесі ділення клітин зберігають свою структуру.

Таблиця 3.1  
Можливості використання різних типів бактеріальних векторів у генетичній інженерії

Операції	Плазміди	Фаг $\lambda$	Кос-міди	Ниткоподібні фаги
Клонування великих фрагментів ДНК, конструювання геномних бібліотек	-	так	так	-
Конструювання кДНК субклонування, монтаж генних сегментів	так	-	-	-
Експресія чужих генів в <i>E.coli</i>	так	-	-	-
Секвенування	так	-	-	так
Гібридизаційні зонди	-	-	-	так

В.Рибчин (1986) узагальнив основні біологічні та фізичні характеристики типів бактеріальних векторів (табл.3.1). Підсумовуючи основні уявлення про структуру і

функції геномів акаріотичних, прокаріотичних та еукаріотичних видів, необхідно підкреслити:

а) геном акаріот, прокаріот та мітохондрій еукаріот є компактною сукупністю генів з мінімальним вмістом структурних поворотів, що характеризує його економічність. Наприклад, вся генетична інформація помірною фага  $\lambda$  розміщується у кільцевій молекулі ДНК довжиною у 50 кв, де є біля 40 генів; плазміда ДНК із 95-97 кв включає до 100 генів, кільцева ДНК *E.coli* із 400 кв може містити до 3000 генів (приблизно 1500 п.н. складає один ген);

б) генетичний апарат у клітинах еукаріот сформований декількома лінійними хромосомами, ДНК яких міцно зв'язана з білками-гістонами, які забезпечують упаковку й упорядкування нуклеїнової кислоти у вигляді структурних одиниць – нуклеосомів (враховуючи при цьому “код упаковки хроматину” та екстраполюючи його на клітини більшості еукаріот). Так, у гаплоїдній клітині *Saccharomyces cerevisial* міститься 17 хромосом, у кожній з них детектовано 1000 кв, отже, число генів могло би досягати у такій клітині 11000; для 23 хромосом у гаплоїдній клітині людини, де в одній хромосомі є 12000 кв, число генів могло б зрости до 2 млн. Припустиме близьке число генів могло б виявитися в гаплоїдних клітинах кукурудзи, де є 10 хромосом, в клітинах кролика з 22 хромосомами чи щура з 20 хромосомами. Однак, у хромосомах еукаріотичних організмів міститься генів менше, ніж некодуючих ділянок С спейсерів та повторів десятки і сотні тисяч разів. Тому у людини, наприклад, лише 10-20% всієї ДНК відноситься до розряду кодуєчої. Але й у цьому випадку число генів у 23 хромосомах гаплоїдної клітини може досягнути 200000;

в) гени еукаріот у хромосомній ДНК утворюють мультигенні родини, які складаються з невиявленого числа

споріднених послідовностей. Наприклад, гени, кодуєчі рРНК, у ссавців виявляються в геномі сотнями своїх копій, згрупованих у зони, а це свідчить про надлишковість генетичних програм у вищих організмах (створення “підвищеної міцності”);

г) мікробні, рослинні та тваринні організми мають у складі генетичного потенціалу одні й ті ж будівельні блоки, тобто їх “кодовий словник” в основному однотипний, або універсальний, і функціонує за центральним постулатом молекулярної генетики Ф.Кріка: генетична інформація переноситься за схемою ДНК → РНК → Білок (у вірусів може бути дещо змінена), але ніколи – від білка до РНК;

д) кожний ген проявляє себе (експресується) шляхом біосинтезу мРНК (транскрипція гена) з наступним переводом (трансляція) інформації у специфічний поліпептидний ланцюг, який є фактично продуктом гена. Ген і його продукт колінеарні, тобто послідовність кодонів (триплетів) у гені точно відповідає послідовності амінокислот у білку;

е) ген кодує будову білкової молекули і реалізує її синтез.

Знаючи будову й функції генів, а також володіючи методами їх виділення та переносу у різні клітини, можна впевнено реалізувати ті чи інші генноінженерні завдання біотехнології.

## IV. ОСНОВНІ ОПЕРАЦІЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

До основних операцій у методології генетичної інженерії належать такі:

1. Виділення генів із генома донора або їх синтез.
2. Технологія рекомбінантних (гібридних) молекул ДНК та їх клонування.
3. Експресія клонованих генів у реципієнтних клітинах.

### 4.1. Виділення генів із генома донора

Існує три джерела молекул ДНК (генів), що застосовуються у генетичній інженерії. Першим є фрагмент генетичного матеріалу із різних організмів. Другим джерелом можуть бути двохланцюгові дезоксирибонуклеїнові кислоти, одержані на основі одноланцюгової ДНК комплементарної мРНК еукаріотичних організмів (кДНК). Третім джерелом молекули ДНК для клонування є хімічний, точніше, хімічно-ферментативний синтез генів.

Важливішим джерелом генів є геноми різних організмів. Будова та розмір геномів в цілому відображає положення організму в еволюційному ряді. Геном бактерії *E. coli* містить одну кільцеву двохланцюгову молекулу ДНК розміром  $5 \cdot 10^6$  п.н. Це відповідає біля  $3 \cdot 10^9$  Д. Геном людини і вищих тварин містить в десятки тисяч разів більше ДНК, розподіленої в декількох десятках хромосом. Кожний індивідуальний ген є маленькою часткою еукаріотичного генома. Розмір генома клітин ссавців біля  $10^9$  п.н., а один ген, наприклад, у 5000 п.н., складає тільки 0,00005% всієї ядерної ДНК. Для ідентифікації такої малої кількості матеріалу необхідно мати надійні методи, особливо високоспецифічні зонди, які взаємодіють лише з



певними нуклеотидними послідовностями для виділення їх із величезної кількості інших послідовностей. Для цього використовують високоочищені радіоактивні РНК- або ДНК-зонди, гібридизація яких з геном реєструється за допомогою радіоавтографії.

При цьому можуть виникати утруднення, пов'язані з одержанням мРНК, яка відповідає специфічному білку, особливо коли білковий продукт присутній у клітині в незначній кількості. Існує декілька методів виділення мРНК, заснованих на використанні її продукту, в тому числі чутливий метод виявлення продуктів синтезу після ін'єкції РНК в овоцити ксенопусу. Ефективний метод виділення ДНК комплементарної мРНК, трансляція якої пригнічується гібридом; в основі методу лежить здатність кДНК пригнічувати трансляцію мРНК, гібридизуючись із нею. В результаті продукт реакції зникає з системи трансляції *in vitro*.

Раніше саме мРНК використовувалась як донор для виділення генів. Цей метод мав ряд недоліків, а саме: мРНК не буває абсолютно чистою, її важко одержати в достатній кількості. Метод добре підходить для виділення генів мРНК, які представлені великим числом копій, але не може бути використаний у випадку слабоекспресуючих генів. Ще одне утруднення полягає у тому, що часто не вдається одержати мРНК з достатньо високою радіоактивною міткою. Тому, замість мРНК як зонд стали використовувати клоновану кДНК-копію мРНК.

Першим кроком при ідентифікації гена, який відповідає специфічному зондові, є дроблення ДНК генома на фрагменти вигідного для роботи розміру. Бажано, щоб ген містився у якомога меншій кількості фрагмента генома, з яким можна працювати (найкраще – тільки в одному). Звичайно максимальна довжина фрагмента генома, з яким можна працювати, знаходиться в межах 15-

20 т.п.н. Іноді буває неможливо одержати ген у вигляді одного фрагмента і тоді для визначення його структури необхідно збирати дані, одержані при аналізі його різних фрагментів.

Фрагментування можна проводити двома методами. Один із них – розщеплення рестриктазами. При цьому кожний фрагмент закінчується сайтом пізнання специфічною рестриктазою. Суть другого методу полягає у механічному дробленні ДНК шляхом внесення у неї розривів із частотою, яка визначається умовами фрагментування. У такому випадку місця розривів розташовуються цілком випадково.

При розщепленні рестриктазою всієї ДНК генома частота розривів визначається довжиною послідовності, яка пізнається ферментом. Чим довша така послідовність, тим рідше відбуваються випадкові розриви. Наприклад, імовірність наявності певної послідовності довжиною 4 п.н. складає  $0,25^4 = 1/256$ , тому фермент, що пізнає таку коротку послідовність, буде вносити розриви у ДНК досить часто. Частота зменшується до  $1/1000$  для послідовностей 5 п.н. і до  $1/4000$  для послідовності у 6 п.н. Цей розрахунок базований на припущенні, що кожна основа у ДНК корелюється частотою її присутності.

Розподіл сайтів пізнання ферменту носить випадковий характер стосовно до генома в цілому. Тому обробка еукаріотичної ДНК рестриктазами веде до утворення багаточисельності фрагментів. При електрофорезі в гелі ці фрагменти утворюють пляму, у якій не розрізняються окремі смуги. При наявності специфічного зонду у плямі рестриктів можна виявити відповідні йому послідовності. Послідовність операцій такого методу приведена на рис.4.1., визначальним моментом тут є денатурація ДНК з утворенням одноланцюгових фрагментів.



Рис.4.1. Блотінг за Саузерном дозволяє здійснювати пряме виділення фрагментів ДНК, відповідних специфічному зондові, з суміші рестриктів ДНК генома

Цей процес відбувається при нагріванні розчину до  $100^{\circ}\text{C}$  або створенні лужного середовища ( $\text{pH} > 13$ ). Зв'язки між комплементарними парами основ руйнуються і ДНК швидко дисоціює на окремі ланцюги. Одноланцюгові фрагменти переносять із агарового гелю на нітроцелюлозний фільтр, де вони іммобілізуються. Перенос ДНК подібний до промокання (англ. blotting), а метод відомий під назвою блотінгу за Саузерном (Southern blotting) (за прізвищем автора методу).

На рис.4.2. схематично відображена послідовність операцій з переносу фрагментів ДНК. Агаровий гель наносять на фільтрувальний папір, змочений концентрованим сольовим розчином. На гель накладають нітроцелюлозний фільтр і зверху покривають сухим фільтрувальним папером. Сольовий розчин усмоктується у сухий фільтрувальний папір. Щоби це відбулося, він повинен пройти крізь агаровий гель і нітроцелюлозний

фільтр. ДНК переноситься разом із розчином, але затримується нітроцелюлоза.

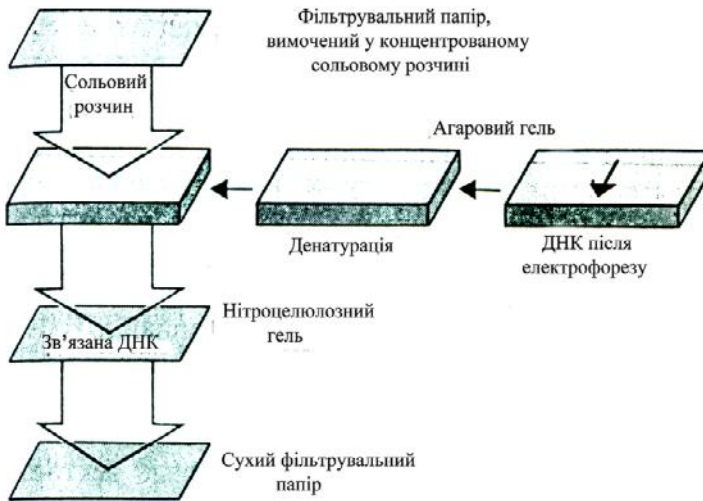


Рис. 4.2. При блоттингу за Саузерном фрагменти ДНК переносяться з агарового гелю на нітроцелюлозний фільтр.

Імобілізована нітроцелюлозою ДНК гібридується *in situ* з радіоактивним зондом. Зі специфічним зондом будуть гібридуватися тільки комплементарні йому фрагменти. Оскільки зонд радіоактивний, гібридизацію можна виявити за допомогою радіоавтографії. Кожна комплементарна послідовність проявляється у вигляді радіоактивної смуги, місцезнаходження якої визначається розміром фрагмента ДНК.

Пряме виділення фрагментів генома, відповідних зонду, пов'язане з практичними труднощами, і для виділення окремих генів використовують ефективний метод зі зворотним порядком стадій, коли спочатку

проводять клонування генома. Опісля здійснюють відбір клонів, які містять специфічну послідовність. Вектори, які несуть ДНК, одержану із генома, називають *клонами геномної*, або *хромосомної ДНК* (на відміну від клонів кДНК, які є копіями мРНК).

Клонування всього генома (на противагу клонуванню специфічних фрагментів) називають *“шотган”-експериментами* (shotgun experiment – метод дробовика). Для їх здійснення весь геном розділяють на фрагменти зручного розміру. Ці фрагменти вбудовують у клонуючий вектор з утворенням популяції химерних векторів. Набір таких клонованих фрагментів називають *бібліотекою генома*. Така бібліотека, одержана за допомогою фагового або плазмідного вектора (частіше – фагового, бо у ньому легше зберігати великі кількості химерних ДНК), може зберігатися необмежений термін і при появі нового зонду швидко може бути використана для пошуку специфічного фрагмента.

Клонування фрагментів, одержаних шляхом механічного дроблення пов’язане з рядом технічних труднощів: у вектор легше вбудувати рестрикт. Однак, складність такого вмонтовування є в тому, що сайти рестрикції можуть бути в невихідних місцях, наприклад, у середині гена, який потрібно клонувати. Один зі способів подолання цих проблем полягає у використанні більше ніж одної рестриктази, тобто у повторенні експеримента з різними ферментами, сайти пізнання яких займають різні положення. Але це вимагає додаткового часу, і при роботі з довгою нуклеотидною послідовністю буває важко підібрати фермент, який не розрізає її.

Для створення вигідних бібліотек шляхом клонування рестриктів використовують фермент з короткою (4 п.н.) послідовністю пізнання в умовах, які забезпечують часткову рестрикцію ДНК.

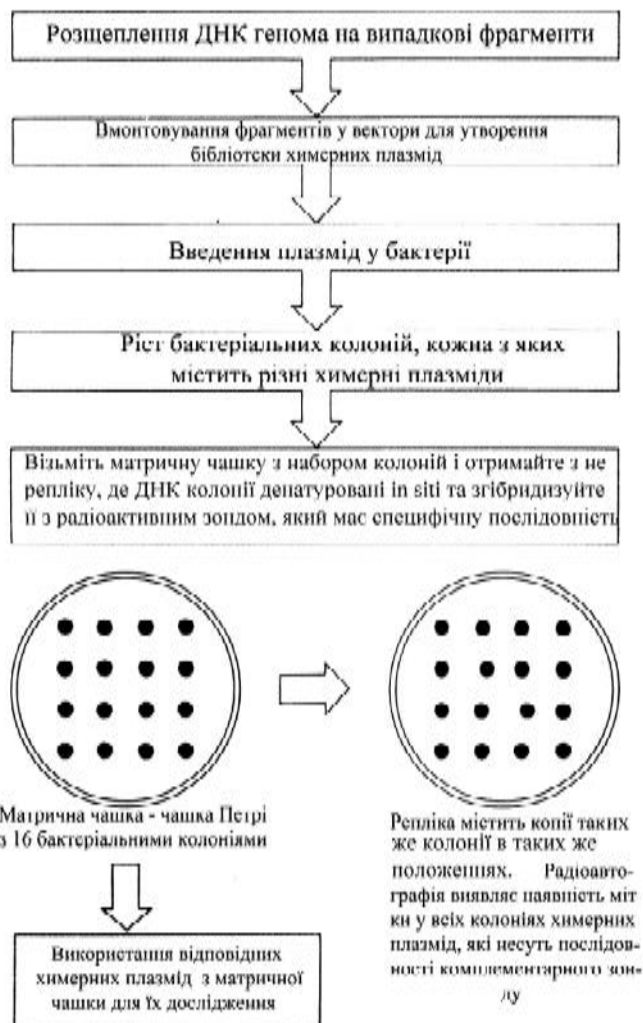


Рис. 4.3. Гібридизація колоній дозволяє здійснити селекцію химерних плазмід, які несуть специфічну послідовність за рахунок її комплементарності з радіоактивним зондом.

Кожний специфічний сайт-мішень розрізняється цілком випадково, тому присутність сайт-мішені в деякій послідовності не обов'язково призведе до її розриву. Мала ймовірність розрізання по кожному сайту в поєднанні з окремим розташуванням сайтів означає, що розподіл фрагментів забезпечується практично повністю випадковим характером внесення розрізів у геном.

При цьому, кожний фрагмент закінчується одною і тою ж послідовністю, яка може мати “липкий” кінець, тому вигідна для клонування. Число випадкових одержаних фрагментів, які повинні бути клоновані для того, щоб забезпечити високу ймовірність наявності кожної послідовності геному хоч би в одній химерній плазміді, зменшується із зростанням розмірів фрагмента та збільшується зі зростанням розмірів генома і бажаної ймовірності. Для 99% ймовірності необхідно 1500 клонів з фрагментами ДНК *E.coli*; для дріжджів розмір бібліотеки зростає до 4600 клонів; для *D. Melanogaster* – до 4800 і до 800000 - для ссавців. Всі ці бібліотеки клонованих фрагментів, де досягається така ймовірність присутності послідовностей генома, були одержані. Для здійснення селекції відповідного клона геномної ДНК із бібліотеки застосовують метод **гібридизації колоній**. Послідовність операцій цього методу приведена на рис.4.3. Бактеріальні колонії, які несуть химерні вектори, лізують на нітроцелюлозних фільтрах. ДНК денатурують і фіксують на фільтрах. Фільтр гібридизують з радіоактивним зондом. Усі копії, з якими гібридизується зонд, при авторадіографії проявляються у вигляді темних плям. Після цього відповідні химерні вектори можуть бути виділені із бібліотеки.

## 4.2. Хімічний синтез генів

Пізнання основних механізмів біосинтезу нуклеїнових кислот у клітині, дозволило приступити до проведення досліджень і досягти позитивних результатів у штучному синтезі генів ще в 60-х роках. А.Корнберг і М.Джуліан (1967) провели синтез генетичної речовини вірусу інфекційної ДНК. Як матриця взята кільцева одноланцюгова нитка фага  $\phi$  174. У присутності ДНК-полімерази із чотирьох рибонуклеозидтрифосфатів синтезували РНК, яка при введенні в культуру *E.coli* викликала зараження, розвиток і розмноження того фага, звідки була виділена матриця.

Упродовж 1960-1968 років Г.Кораною розроблені методи хімічного синтезу невеликих фрагментів дезоксирибонуклеотидів (20-30) з відомою послідовністю. Ним же у 1970 році здійснено синтез структурного гена. У роботі він використав відому нуклеотидну послідовність аланінової тРНК дріжджів для визначення первинної структури ДНК, яка відповідала її структурному гену. Робота включала такі етапи:

- 1) синтез одноланцюгових дезоксиолігонуклеотидів;
- 2) одержання комплементарних дволанцюгових фрагментів дезоксиолігонуклеотидів довжиною 8-12 п.н.;
- 3) зшивання (лігування) фрагментів полінуклеотидлігазою.

Одержаний ген мав довжину 77 п.н. Це перший ген, одержаний штучним шляхом. Але, на відміну від природних, він не міг транскрибуватися, тобто працювати *in vitro* в тест-системах через відсутність регуляторних ділянок. У 1976 році в лабораторії Г.Корани був одержаний ген, який функціонував у живій клітині. Синтезували ген тирозинової тРНК *E.coli*. Він функціонував тому, що разом зі структурною ділянкою



(126 п.н.) був синтезований промотор (52 п.п.) і термінатор (21 п.н.). Ген ввели в клітину, трандукуючи її рекомбінантним фагом  $\lambda$ , до якого “пришили” синтезований ген.

Розроблений Кораною та іншими дослідниками метод синтезу генів відкрив шлях до виробництва продуктів білкової природи шляхом введення в клітини мікроорганізмів штучно синтезованих генів, де вони експресуються у складі гібридних молекул ДНК. За допомогою цього методу були синтезовані соматотропні, інсулін та інші біологічно активні речовини. Так, наприклад, ген інсуліну синтезували у вигляді більше 40 (в основному 6-членних) олігонуклеотидів, які лігували в одну структуру під впливом ДНК-лігази. Одержані дволанцюгові полінуклеотиди довжиною 271 і 286 п.н. вбудовували в плазмідні вектори. Туди ж були вмонтовані і регуляторні ділянки, які забезпечували експресію гібридних молекул. Клоновані гени кодували синтез проінсуліну, який, шляхом нескладної хімічної обробки, перетворювали в активний інсулін. Процес включає 170 хімічних реакцій, є дорогим, складним і здійснити його в промисловому масштабі виявилось досить важко.

Ці проблеми були розв’язані після відкриття в 1970 році Г.Темінім, С.Мізутані та Д.Балтімором в онкогенних вірусах ферментів зворотної транскрипції (зворотних транскриптаз, ревертаз).

### **4.3. Одержання ДНК-копій на матриці РНК**

Для одержання послідовності ДНК, яка відповідає тому чи іншому індивідуальному білку, ідеальним підходом є використання мРНК, яка врешті слугить матрицею для синтезу білка *in vitro*. Синтез дволанцюгової ДНК на матриці мРНК відбувається під впливом

ревертази, тобто забезпечує зворотну транскрипцію. Її легко здійснити для мРНК, які містять poly(A)-послідовності на 3'-кінці (рис.4.4). Насамперед poly(A) гібридизують із затравкою (праймером). Це коротка послідовність oligo(dT), призначена для створення вільного 3'-кінця, який може бути добудований ферментом зворотної транскрипції.

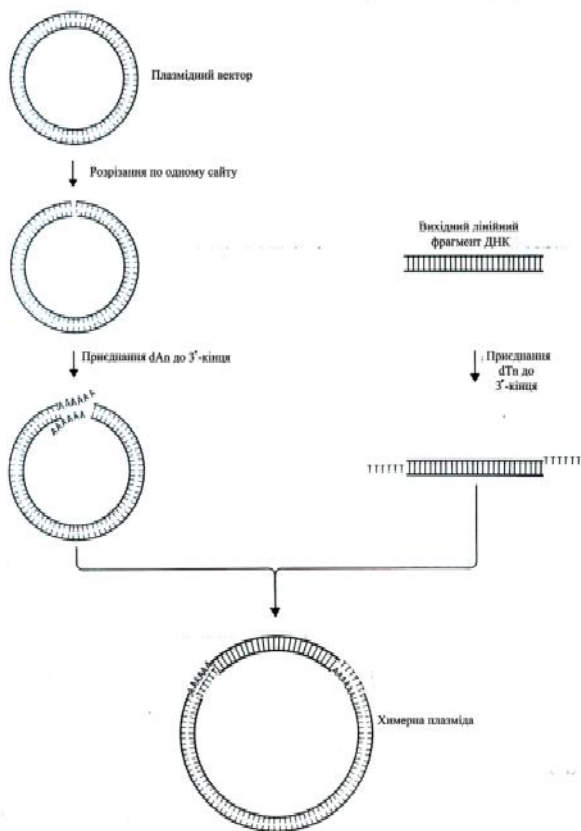


Рис. 4.4. Метод кінцевого приєднання послідовностей poly (dA:dT), який дозволяє “зшити” дві молекули ДНК

Він здійснює синтез у напрямку 5'-3', додаючи дезоксинуклеотиди по одному, процес проходить шляхом комплементарного спарування основ з мРНК-матрицею.

Продукт реакції – гібридна молекула, що складається із ланцюга РНК-матриці, спареної з комплементарним ланцюгом ДНК. Єдина практична трудність при проведенні реакції полягає в тому, що *in vitro* зворотна транскриптаза може зупинитися у різних точках перш ніж досягнути 5'-кінця мРНК. Утворений при цьому зворотний транскрипт виявляється вкороченим і відповідає тільки частині молекули мРНК, тому що він позбавлений деяких послідовностей комплементарних 5'-кінців. Однак, при підборі оптимальних умов досліду часто вдається досягти повного зчитування матриці зворотною транскриптазою.

Зворотну транскрипцію часто завершує корисна реакція. Досягнувши кінця мРНК, фрагмент здатний утворювати петлю на кінці синтезованого ланцюга ДНК за рахунок декількох послідовних основ зворотного транскрипту в якості матриці для синтезу комплементарної ділянки. Це призводить до утворення на 3'-кінці зворотного транскрипту короткої “шпильки” довжиною 10-20 п.н.

мРНК-матрицю руйнують обробкою лугом (на ДНК луг не впливає). Утворюється одностанцюгова ДНК, комплементарна мРНК, яка називається кДНК. “Шпилька” на її 3'-кінці служить праймером для наступного етапу – використання фермента ДНК-полімерази I *E.coli* для перетворення одностанцюгової кДНК у двостанцюгову шляхом синтезу комплементарного ланцюга. У реакції фермент використовує кДНК як матрицю для синтезу послідовності, що є ідентична вихідній мРНК. Продукт реакції – двостанцюгова молекула зі “шпилькою” на одному кінці. “Шпильку” розрізає нуклеаза S1 з утворенням звичайної двостанцюгової ДНК. Тому ДНК

можна клонувати для одержання великих кількостей синтетичного гена, який представляє послідовності мРНК у вигляді дволанцюгової ДНК. Це називається *клоном кДНК*.

#### 4.4. Технологія рекомбінантних ДНК

У 70-х роках ХХ ст. вважалося, що ДНК – найбільш складний для досліджень компонент клітини. Надзвичайно довгу і хімічно монотонну послідовність нуклеотидів у спадковому матеріалі тоді можна було досліджувати лише опосередкованими методами – визначати первинну структуру білка або РНК. Тепер розроблені методи аналізу первинної структури ДНК, стало можливим вирізати окремі ділянки ДНК і визначати послідовність нуклеотидів по декілька сотень у день. Сучасна технологія рекомбінантних ДНК забезпечує розробку прогресивних підходів до вивчення складних механізмів регуляції дії генів в еукаріот, є джерелом економічної ефективності в умовах промислового виробництва гормонів, ферментів, вакцин, інтерферонів та інших біологічно активних речовин.

Генетична рекомбінація полягає в обміні генетичним матеріалом між двома хромосомами. За Понтекорво рекомбінація - це довільний процес, здатний привести до виникнення клітин чи організмів з двома чи більше спадковими детермінантами, за якими їх батьки різнилися між собою і які об'єднані новим способом. Така рекомбінація проходить у ссавців при утворенні статевих клітин. У ході мейозу гомологічні хромосоми обмінюються генами (кросинговер), якраз цей обмін дозволяє пояснити перетасовку спадкових ознак у ряді поколінь.

При відсутності рекомбінацій генетичний матеріал кожної хромосоми був би фіксований в її алелях. Єдиним джерелом мінливості в такому випадку служили б мутації. Протяжність мішені для мутаційних пошкоджень збільшилась би від одного гена до цілої хромосоми. Накопичення шкідливих змін в окремій хромосомі призвело б до її елімінації разом з присутніми в ній корисними мутаціями. Рекомбінації не зумовлюють перерозподіл генів. Корисні мутації відділяються від шкідливих і перевіряються в нових генетичних поєднаннях. Таким чином, генетична рекомбінація зумовлює спасіння і розповсюдження корисних та елімінацію шкідливих алелей. З еволюційної точки зору хромосома - це не постійна структура, утворена тимчасово зв'язаними відповідними алелями. Така непостійність обумовлена рекомбінацією.

Тип рекомбінації, який включає взаємодію між гомологічними послідовностями ДНК, одержав назву **загальної рекомбінації**. Ферменти, відповідальні за здійснення її, можуть використовувати як субстрати довільну пару гомологічних послідовностей.

Рекомбінації між специфічними парами послідовностей зумовлює другий тип - **специфічна рекомбінація**. Вона обумовлює інтеграцію фагових геномів у бактеріальну хромосому. В рекомбінаційний процес залучаються специфічні послідовності фагової та бактеріальної ДНК; в межах цих послідовностей є короткі зони гомології, присутність яких, хоча і необхідна, але не достатня для здійснення рекомбінації. Ферменти, що каталізують цей процес, діють на відповідну пару фагової і бактеріальної послідовності та нездатні вести рекомбінацію між іншими парами. Такий тип рекомбінації названий **консервативною рекомбінацією**.

Рекомбінацію, яка зумовлює вбудовування послідовностей однієї ДНК в другу незалежно від гомології між ними, названо **реплікативною рекомбінацією**. Цей тип рекомбінації обумовлює здатність окремих елементів перемігровуватися у геномі. Рухомий елемент копіюється і репліка переноситься в який-небудь інший сайт. Ці послідовності одержали назву транспозуючих елементів, або транспозонів.

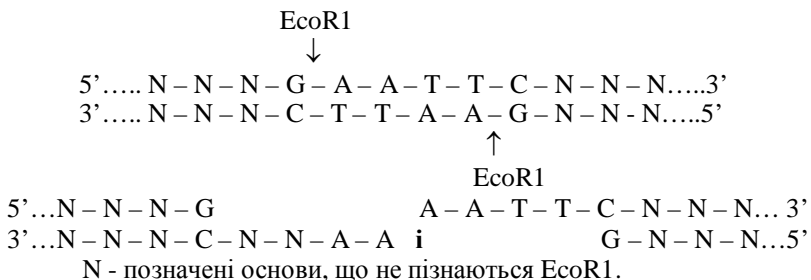
У генетичній інженерії найчастіше використовується специфічний тип рекомбінації з урахуванням ознак реплікативного типу.

Обмін генетичним матеріалом, як і введення в клітину гена, який належить іншій клітині, організму і навіть виду, можна здійснити шляхом генетичної рекомбінації *in vitro*. Вперше це було розроблено на бактеріях, зокрема, на *E.coli*, в клітину якої вводили гени тварин і людини й досягали їх реплікації.

Метод рекомбінації *in vitro* полягає у виділенні ДНК із різних джерел, одержання гібридних молекул нуклеїнових кислот і їх введенні у живі клітини з тим, щоб досягти прояву нової ознаки, наприклад, біосинтезу специфічного білка. Для введення ДНК (генів) у клітини бактерій як вектори використовують плазміди або фаги. Приєднання фрагмента чужорідної ДНК до клонуемого вектора відбувається під впливом реакцій взаємодії між кінцями фрагмента і вектора. Цей процес забезпечується за рахунок утворення кінцевих комплементарних послідовностей у фрагментах і векторах так, щоб при змішуванні вони змогли утворити гібридну ДНК.

Найбільш розповсюджений метод – використання рестриктаз, які утворюють ступінчасті розриви з короткими комплементарними одноланцюговими “липкими” кінцями. Наприклад, фермент-рестриктаза *EcoR1* розрізає кожен ланцюг ДНК, але в різних точках. Ці

точки розташовуються по обидва боки від короткого паліндрома, що входить до складу сайту-пізнання ферментом (N-позначені основи, які пізнають EcoR1).



Аналогічним ферментом (EcoR1) обробляється векторна молекула з утворенням неспарених послідовностей дезокси-рибонуклеотидів (TAA і AATT). Виникнення “липких” кінців дає можливість реасоціації молекул (рис. 4.5). Такий метод дозволяє одержати химерну плазмиду, інтактну в цілому, але без ковалентних зв’язків між чужорідною і векторною ДНК. Відсутні зв’язки утворюються при дії ДНК-лігази *in vitro*. Цей метод рекомбінації двох молекул ДНК має свої переваги *in vitro* недоліки.

Перевага полягає в тому, що химерний вектор має відбудовані сайти для EcoR1 по обидва боки від вмонтованої ДНК. Тому фрагмент її відносно легко може бути віднайдений і видалений із клонованих копій химерного вектора за допомогою EcoR1.

Недолік методу полягає у тому, що всі одержані за допомогою EcoR1 “липкі” кінці можуть реасоціювати один з одним. Із-за цього частина векторів відновлюється в результаті безпосередньої взаємодії своїх кінців без приєднання фрагмента чужорідної ДНК, тоді як інші

вектори можуть приєднуватися до вставки із декількох послідовно приєднаних фрагментів чужорідної ДНК. Ця обставина викликає необхідність вести селекцію химерних векторів, які несуть лише один вбудований фрагмент чужорідної ДНК. Є й інші методи, які використовує генетична інженерія для утворення гібридних ДНК.

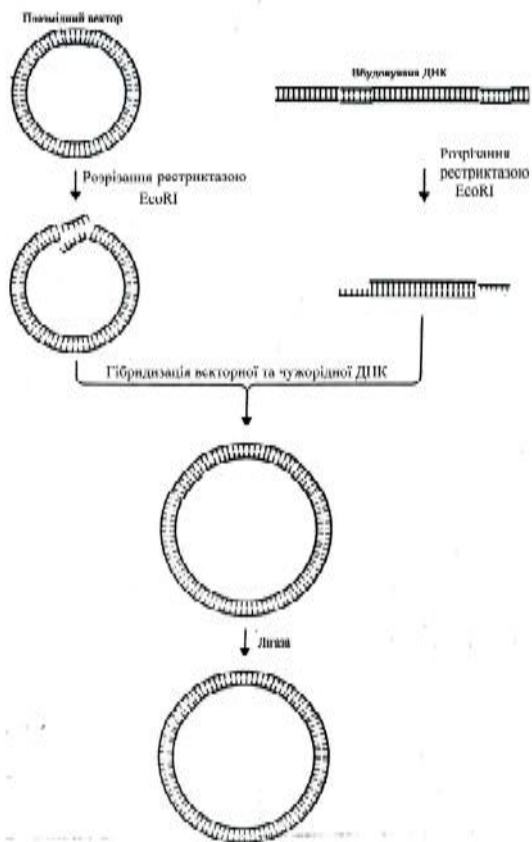


Рис.4.5. Вмонтовування ДНК у плазмідний вектор



Плазмиду розрізають ферментом, який пізнає єдиний сайт у потрібному положенні, але при цьому не обов'язково утворюються зигзагоподібні кінці. Потім, використовуючи фермент *термінальну трансферазу* і попередник dATP, до двох 3'-кінця плазмідної ДНК приєднують фрагмент poly (dA). Аналогічно приєднуються poly (dT) до 3'-кінця молекули чужорідної ДНК. Як показано на рис.4.6, poly (dA) плазмідна реасоціює тільки з poly (dT) фрагмента чужорідної молекули ДНК.

Недоліком методу є складність виділення вбудованого фрагменту із клонованої химерної плазмиди, тому що у вихідному векторі після вбудови чужорідної ДНК зникає сайт пізнавання рестриктазою.

Вбудована послідовність з обох боків оточена ділянками спарених послідовностей poly (dA): poly(dT). У цьому методі можуть використовуватися також і послідовності poly (dC) і poly (dG). Перевага використання цих послідовностей у тому, що при розщепленні плазмиди рестриктазою PstI приєднання poly (dC) і poly(dG) приводить до відновлення сайту рестрикції для PstI по обидва боки від вмонтованого фрагмента.

Є інший метод - “зшивання” (лігування) “тупих” кінців. У його основі лежить здатність ДНК-лігази фага T4 зшивати дві молекули ДНК по тупих кінцях, утворених під впливом рестриктази, яка розрізає обидва ланцюги ДНК в одній точці. Перевага цього методу – у можливості “зшивання” довільних пар кінців незалежно від їх нуклеотидної послідовності. Метод особливо важливий тоді, коли виникає необхідність зшити дві визначені послідовності без вмонтовування між ними якого-небудь додаткового матеріалу.

Існує велика кількість цих методів. В одному з них використовують короткі двохланцюгові молекули ДНК (“лінкери”). Вони містять паліндром, який пізнає EcoRI

(або аналогічна рестриктаза). Такі лінкери можуть бути синтезовані хімічно і ковалентно приєднані до кінців плазміди або фрагмента шляхом зшивання тупих кінців. Це дозволяє оперативно видаляти вбудовану ДНК рестриктазами.

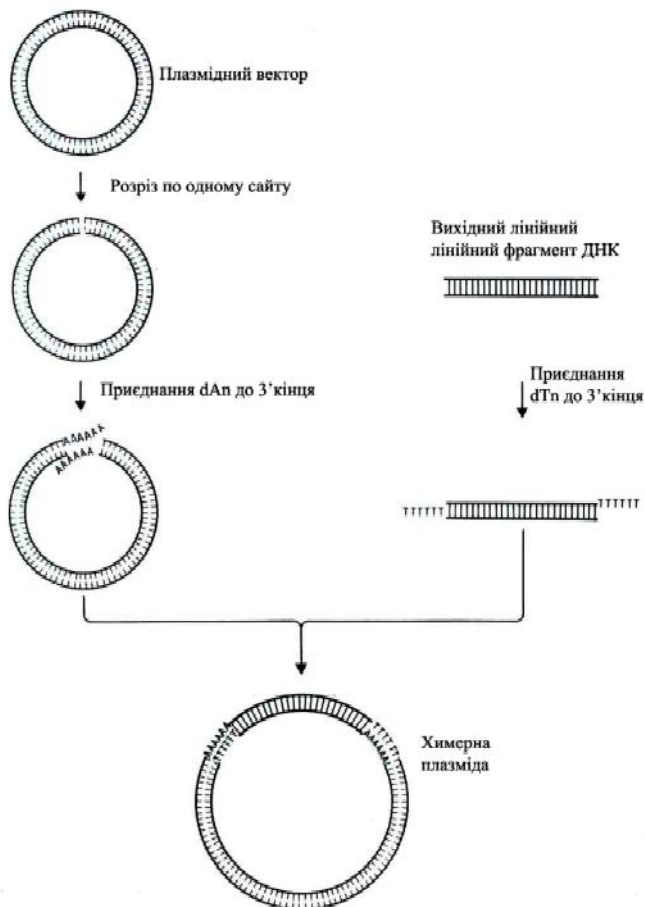


Рис.4.6. Метод кінцевого приєднання послідовностей poly (dA: dT) дозволяє "зшити" дві молекули ДНК.

Фрагмент чужорідної ДНК може бути вбудований у вектор у довільній орієнтації, тобто будь-який її кінець може бути сполучений з будь-яким кінцем вектора. Це не має значення, коли метою клонування є проста ампліфікація вбудованої послідовності. Однак її орієнтація може виявитися суттєвою, якщо експеримент проводиться з метою експресії чужорідної ДНК. У цьому випадку, в результаті випадкових вбудовувань можуть бути одержані популяції плазмід, орієнтованих в обох напрямках, після чого шляхом рестрикційного картування виявляється потрібний клас.

У більшості випадків клони еукаріотичних генів тепер одержують використовуючи ДНК-копії (кДНК) матричної РНК. Стратегія такого підходу полягає у наступному: із відповідної тканини чи лінії культури екстрагують поліаденілову РНК і на її основі конструюють бібліотеку кДНК. Потрібний клон кДНК ідентифікують шляхом скринінгу бібліотеки на основі синтетичних олігонуклеотидів чи на основі антитіл.

Частота, з якою клони кДНК, що представляють мРНК, зустрічаються в бібліотеці, пропорційна вмісту мРНК в клітині. Дволанцюгові кДНК з  $10^5$ – $10^7$  рекомбінантів лігуються з одним із фагів  $\lambda$ . Найчастіше для лігування використовують в якості векторів фаги  $\lambda$ gt 10 і  $\lambda$ gt 11.

Використання векторів на основі фага  $\lambda$  дозволяє застосовувати для введення чужорідної ДНК в клітини *E.coli* такий високоефективний метод, як метод упаковки  $\lambda$ -ДНК *in vitro*. Висока ефективність клонування кДНК у  $\lambda$ -векторах необхідна при пошуку клонів кДНК, що відповідають рідкісним мРНК, а також у тих випадках, коли вихідна мРНК доступна в обмежених кількостях.

Вектор  $\lambda$ gt 10 (imm<sup>434</sup> b 527) містить унікальний сайт розщеплення EcoR1, що знаходиться всередині гена  $\lambda$ -репресора. Якщо рахувати максимальним розмір придатної до упаковки ДНК 105% від довжини генома фага дикого типу, то максимальна довжина вставки для  $\lambda$ gt10 складає 7,6 т.п.н. Введення фрагмента ДНК в ген репресора (**cI**) призводить до появи **cI**-рекомбінанта, який утворює *бляшки* з прозорим центром. Це дає можливість ідентифікації його на фоні вихідного вектора  $\lambda$ gt 10, що утворює мутні *бляшки*.

Структура експериментального вектора  $\lambda$ gt11 (**lac5 c1857 nin5 S100**) повністю досліджена. Для введення чужорідної ДНК використовують сайт розщеплення EcoR1, розташований всередині гена **lacZ** на віддалі 53 п.н. від 5'-кінця з боку термінуючого кодону  $\beta$ -галактозидази. Якщо максимально придатний для упаковки розмір ДНК складає 105% від довжини  $\lambda$ -ДНК дикого типу, то вектор  $\lambda$ gt11 здатний приймати вставки довжиною до 7,2 т.п.н. Фаг-вектор продукує температурно чутливий репресор (**c1857**), неактивний при 42° С. Крім того, цей вектор несе **amber** – мутацію (**s100**), яка робить його нездатним до лізису клітини господаря, що не має **amber**-супресора **supF**. Оскільки ділянка, в яку вмонтовується чужорідна ДНК, розташована всередині структурного гена  $\beta$ -галактозидази, чужорідні послідовності можуть експресуватися у вигляді поліпептиду, включеного до складу фермента  $\beta$ -галактозидази. У цьому випадку за звичай проводять скринінг 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> індивідуальних рекомбінантів у вигляді бляшок на газоні штаму E.coli, дефектної за протеазою **lon**. Білок, що вивільняється при лізисі клітин всередині бляшки, іммобілізують на нітроцелюлозних фільтрах. Зв'язаний з нітроцелюлозою білок зондують антитілами, специфічними до шуканого

антигена і зв'язані антитіла виявляють радіоактивно міченими векторними антитілами або А-білком із *Staphylococcus aureus*.

Загальна схема одержання та клонування кДНК з використанням векторів  $\lambda$ gt10 і  $\lambda$ gt11 приведена на рис.4.9. Зворотна транскриптаза вірусу мієлобластозу птиці каталізує синтез кДНК. Як матрицю використовують ролу ( $A^+$ )–РНК, а як затравку – oligo (dT)<sub>12-18</sub>. Продукт (кДНК) відділяють від мРНК-матриці шляхом теплової денатурації. ДНК-полімераза I *E.coli*, використовуючи як затравку 3'-кінець першого ланцюга, синтезує другий ланцюг кДНК. Однотиктова шпилька видаляється нуклеазою S1. Дволанцюгова кДНК обробляється метилазою *EcoR1* в присутності S-аденозилметіоніну для екранування сайту пізнання *EcoR1*. Після обробки ДНК-полімеразою I збільшується число дволанцюгових молекул ДНК з тупими кінцями. До них лігазою приєднують *EcoR1*-лінкери. Зайву частину лінкерів видаляють обробкою ДНК *EcoR1*. Реакційну суміш пропускають через колонку з біогелем A50m. Цей етап дозволяє вирішити два завдання:

1) відділити кДНК від надлишку лінкерів, які б заважали лігуванню кДНК з векторною ДНК;

2) фракціонувати дволанцюгові кДНК за розміром.

Фракції дволанцюгових кДНК потрібного розміру (наприклад > 500 п.н.), збирають та лігують у невеликому об'ємі з обробленим *EcoR1* вектором  $\lambda$ gt10 чи  $\lambda$ gt11 й упаковують *in vitro*. Утворені фагові частинки розсівають на відповідному штамі *E.coli* та візуально визначають відсоток рекомбінантів. При використанні  $\lambda$ gt10 рекомбінантні фаги відрізняються морфологією бляшок. У випадку  $\lambda$ gt11 рекомбінантні фаги утворюють безбарвні бляшки на **supF lac1<sup>a</sup>**-господарі в присутності індуктора

**lac**-оперону IPTG і хромогенного субстрату  $\beta$ -галактозидази **Xgal**. Після підрахунку числа рекомбінантів бібліотеку кДНК розсівають для ампліфікації і виготовлення реплік на нітроцелюлозних фільтрах.

Спосіб введення в клітину гібридних молекул залежить від вектора. Якщо як вектор використовується плазміда, то введення йде за типом трансформації. У випадку фаг  $\lambda$  - за типом трансфекції. Перенос може здійснюватися механізмом трансдукції при кон'югації клітин. Такий тип називається трансгенозисом. Трансгенозис є особливим типом переносу генетичної інформації від однієї клітини до іншої за допомогою невластивого даній клітині вірусу. Переважно під трансгенозисом розуміють перенос в еукаріотичні клітини чужорідних генів за допомогою неокотичних вірусів і фагів, найчастіше фага  $\lambda$ . Серед усіх відомих методів переносу генів трансгенозне має ряд переваг. Фаги доступні, непатогенні для людини, і з ними легко працювати.

Стає перспективним метод введення гібридних ДНК в еукаріотичні клітини за допомогою ліпосом. Це невеликі мембранні міхурці, які утворюються *in vitro* при обробці ліпідів ультразвуком у водному середовищі. Якщо в таке середовище ввести гібридні молекули ДНК, останні можуть бути захоплені ліпосомами. При контакті клітини культури з ліпосомним середовищем проходить зливання оболонки з мембранами ліпосом і вміст останніх проникає в клітину.

Бактеріальні клітини висівають, і в культурному середовищі ростуть бактерії, які містять всі ділянки ДНК, тобто всі гени. Кожна бактеріальна клітина утворює власний клон, у якому є тільки один фрагмент ДНК, що, по суті, потрапив випадково. Якщо розмір такого фрагмента

ДНК невеликий, то він буде включати в собі не більше 1-2 генів, оскільки клонів утворюється багато, то в них будуть представлені всі фрагменти ДНК, тобто всі гени генома тварини. Природно, що в такій бібліотеці можуть знаходитися і такі клони, у векторах яких вбудовані фрагменти ДНК, що не несуть жодних генів або їх частин. Пошук вектора з потрібним геном чужорідної ДНК є досить складним процесом.

У генетичній інженерії використовують спеціальні формули для підрахунку кількості клонів для створення бібліотеки генів, яка могла би вмістити геном даного виду організму. Ймовірність зустрічі шуканого гена в бібліотеці задають на рівні  $P = 0,99$ . Для визначення числа клонів  $n$  необхідно знати середню молекулярну масу фрагмента  $M$  і за залежністю  $n = \frac{M}{n \ln(1-P)}$  визначають необхідну кількість клонів для створення бібліотеки. У таблиці 4.1. приведені дані про кількість клонів у бібліотеках деяких видів організмів (Б.Завертяєв, 1989).

Таблиця 4.1

Кількість клонів у бібліотеках деяких видів організмів

Вид організмів	Середня молекуляр-на маса генома (Д)	Кількість клонів за ймовірністю зустрічі гена		
		0,90	0,95	0,99
E.coli	$2,8 \times 10^9$	640	840	1300
Дрозофіла	$1 \times 10^{11}$	23000	30000	46000
Дріжджі	$1 \times 10^{10}$	2300	3000	4600
Кролі	$2 \times 10^{12}$	460000	600000	920000

Отже, для створення бібліотеки генів кролика, яка б характеризувала всю молекулу ДНК чи весь геном, потрібно 920000 клонів. Для створення бібліотеки класичного об'єкта генетичної інженерії – кишкової палички – кількість клонів буде набагато менша і складе всього 1300. Важливим є те, що при клонуванні генів E.coli

або її фагів легко можна визначити клони, у яких введений ген експресується. Для генома ссавців, за дуже наближеними розрахунками, необхідна бібліотека генів з фрагментами ДНК із 800000-1000000 клонів.

Перша бібліотека генів була створена для *E.coli*, ще в 1976 році. Пізніше створені бібліотеки (банки) генів і для інших видів організмів, в тому числі і для худоби. Створюються вузькоспеціалізовані бібліотеки, наприклад, для клонів ДНК гіпофізу, гормону росту, пролактину та інших. Наприклад, для створення бібліотеки клонів ДНК гормонів гіпофізу худоби використаний вектор фага  $\lambda$ gt11. У ньому налічується більше мільйона рекомбінантів. У результаті гібридизації деяких гібридних молекул ДНК з клонованою ДНК, яка кодує  $\beta$ -субодиниці фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) свиней, одержано два клони ФСГ, що містять послідовності мРНК-субодиниці ФСГ худоби. На основі їх субклонування в плазміді було одержано велику кількість кДНК для проведення аналізу повної нуклеотидної послідовності за допомогою рестриктаз. Порівняння амінокислотної послідовності, яка визначається кДНК, з послідовністю амінокислот  $\beta$ -субодиниць ФСГ декількох видів ссавців вказує на висококонсервативний характер досліджуваної зони ДНК. Ізоляція і клонування ДНК  $\beta$ -субодиниць ФСГ дозволяє вивчити структуру й експресію гена  $\beta$ -ФСГ.



#### 4.5. Експресія чужорідних генів у мікроорганізмах

Механізми експресії генів у прокаріот добре вивчені внаслідок багаторічних фундаментальних молекулярно-біологічних досліджень бактерії *E.coli* та її фагів.

Першим етапом експресії є процес транскрипції. Фермент РНК-полімераза розпізнає на ДНК специфічні послідовності, які названі промоторами. Умовою експресії чужорідного гена у мікроорганізмах є наявність перед цим геном сильного промотора, який добре пізнає РНК-полімеразу клітини-господаря. Високий рівень транскрипції може призвести до нестабільності плазмідної реплікації, яка за активно транскрибуючим геном не розташовані сайти ефективної термінації транскрипції.

Для практичних цілей вигідно використовувати регулюючу експресію, бо не тільки суперсинтез РНК, але й особливо суперсинтез багатьох білків може виявитися згубним для клітини. При такому переході у процесі періодичної ферментації в першій її фазі, коли проходить ріст клітин і накопичення біомаси, експресія клонованих чужорідних генів не проходить. На другому етапі зовнішній індикатор (хімічні речовини, температура) запускає суперсинтез потрібного білка.

У генетичній інженерії використовують сильні промотори *E.coli* (лактозного оперону - *lacUV5*, триптофанового *trp*, гібридний промотор *tac* (*trc-lac*)), промотори фага  $\lambda$ -P<sub>R</sub> і R<sub>L</sub>, деякі сильні промотори фагів T5, T7,  $\phi$ X174 тощо.

Сильна і регулююча транскрипція – необхідна, але далеко не достатня умова високої продуктивності клітин. Другою умовою є наявність перед геном чужорідного білка, оптимального сайту ініціації транскрипції мРНК. У бактерій цей сайт включає послідовність із 3-9 нуклеотидів, названий послідовністю Шайн-Делгарно

(SD), комплементарну 3'-кінцю рибосомної 16S РНК; ініціюючий кодон AUG і від 3 до 11 нуклеотидів між SD й AUG. Добрий сайт ініціації трансляції має виражену комплементарність до 3'-кінця 16S РНК з оптимальною віддаллю між послідовністю SD і AUG-кодомом і при цьому 5'-кінець мРНК повинен мати визначену вторинну структуру. Якщо в одній і тій же конструкції методом сайт-специфічного мутагенезу вводити по черзі всі три кодони ініціації, то конструкція з AUG виявляється найбільш ефективною, UUG-найменш, а з GUG – проміжною.

Існує три способи конструювання, які забезпечують трансляцію чужорідної генетичної інформації в клітинах бактерій. Перший спосіб - упродовження чужорідного структурного гена, позбавленого власних регуляторних ділянок, всередину добре експресуючого бактеріального гена.

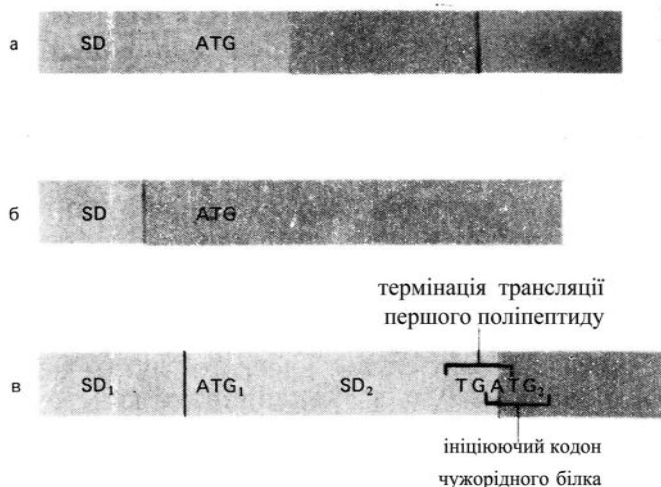


Рис. 4.7. Три способи забезпечення ефективної трансляції чужорідної генетичної інформації (сірим кольором позначений бактеріальний ген; чорним - чужорідний)

Точка упровадження має бути віддалена від місця ініціації трансляції, щоб нова нуклеотидна послідовність не заважала ефективній ініціації транскрипції і трансляції бактеріального гена. При такій конструкції можна очікувати, що рівень експресії “гібридного білка” буде близький рівню експресії вихідного гена. Недоліком методу є важкість наступного розщеплення гібридного білка і виділення кінцевого продукту (рис.4.7, а).

Другий шлях - створення “гібридного сайту” зв’язування з рибосомами. В цьому випадку проходить розщеплення в молекулі бактеріальної ДНК між послідовностями SD та кодоном ініціації. Чужорідний структурний ген несе власний кодон ініціації та декілька нуклеотидів перед ним. Об’єднання *in vitro* таких конструкцій дає “гібридний сайт” зв’язування з рибосомами (рис 4.7, б). Перевага методу полягає в тому, що в клітині синтезується нормальний чужорідний білок. Недоліком є неможливість створення уніфікованого для всіх білків гібридного сайту ініціації трансляції.

Третій спосіб позбавлений недоліків перших двох, об’єднує їх переваги і має назву методу гібридного оперона. В конструкції використовується принцип “перекривання” генів (*overlapping*), виявлений у бактерій і фагів. У цьому випадку термінуючий кодон проксимального до промотора гена є одночасно частиною ініціюючого кодона дистального гена оперона. SD-послідовність другого гена розташована безпосередньо в кодуючій області першого. Така ситуація спостерігається в триптофановому опероні *E.coli* між генами *trpE* і *trpD*. Якщо замість дистального гена в цій конструкції ввести чужорідний ген, то трансляція відбувається не гірше, як у проксимального гена. У цій ситуації рибосоми (принаймні 30S – субодиниці) не відділяються від РНК та ініціація трансляції другого гена починається зі 100% ефективністю.

Крім того, можлива додаткова ініціація з власної послідовності SD (рис.4.7, в).

Одержання штаму суперпродуцента чужорідного білка не завершується конструюванням гібридних векторів, у яких чужорідний ген споряджений ефективними сайтами ініціації транскрипції і трансляції. Для одержання високого виходу білка важливо забезпечити стабільність мРНК і придушити протеоліз білка.

Стабільність мРНК в клітинах *E.coli* підвищується при введенні мутацій, які інактивують клітинні РНК-ази. Гени *rna*, *rnb* і *rnc*, які кодують РНК-ази I, II і III *E.coli*, картируються відповідно на 14, 28 і 55-й хвиликах генетичної карти.

У 1985 році відкритий ген - **ams** (*alteratio of mRNA stability*), який картирується на 23-й хвилині генетичної карти та сильно впливає на стабільність мРНК. У клітинах температурно-чутливого мутанта за геном **ams** час півжиття мРНК при 42°C збільшується від 0,5-2 до 10-12 хвилин. Природа білка, який кодується цим геном, поки що остаточно не з'ясована.

Вагомою перешкодою при одержанні штамів - суперпродуцентів може бути протеоліз чужорідних білків у клітині. Так, тривалість півжиття людського проінсуліну в клітинах *E.coli* складає 2 хвилини. Для стабілізації чужорідних білків і пептидів одержують мутації типу **lon** або **hptR**, чи клонують у реципієнтний штам гена, що контролює синтез інгібіторів протеїназ (наприклад, ген **pin** фага **T4**).

Крім клітин *E.coli*, генетична інженерія використовує також інші мікроорганізми, що володіють надзвичайно цінними властивостями. Це актиноміцети – продуценти значної частини антибіотиків; бацили, які використовуються у виробництві ферментів, вітамінів, засобів боротьби з комахами; псевдомо-нади, з якими

пов'язують надії на розробку ефективних біологічних заходів охорони довкілля; дріжджі, незамінні у виноробстві, хлібовипічці, пивоварінні, у виробництві мікробіологічного білка для годівлі сільськогосподарських тварин.

Бактерії ряду *Pseudomonas* широко розповсюджені в природі і в силу своїх біохімічних можливостей знаходять застосування в різних біотехнологічних процесах. Відомо біля 30 видів *Pseudomonas*. Серед них, поряд з ґрунтовими непатогенними бактеріями, зустрічаються фітопатогени й патогенні для людини і тварин. Наявність у них плазмід, які несуть гени біодеградації різних органічних сполук, в тому числі тих, що не зустрічаються у природі (інсектициди, гербіциди), роблять їх перспективними засобами охорони навколишнього середовища.

Введення рекомбінантних плазмід у бактерії роду *Pseudomonas* можливе методом кальцієвої трансформації, хоча ефективність цього процесу дещо нижча, ніж у *E.coli*. Деякі види, такі, як *Ps.putida*, *Ps.alcaligenes* здатні до природної трансформації.

Оскільки проміжним господарем для маніпуляцій з гібридною ДНК є бактерії *E.coli*, то найефективніший шлях введення – мобілізація гібридних плазмід у *Pseudomonas* за допомогою кон'югації. Гени *E.coli* ефективно експресуються в *Pseudomonas*. Під контролем сильних промоторів *E.coli* в штамх *Ps.putida* досягнута продукція ряду еукаріотичних генів. Гени біосинтезу амінокислот *E.coli* комплементують відповідні ауксотрофні мутації штамів *Ps.putida* і *Ps.aeruginosa*. Навпаки, ефективність експресії генів *Pseudomonas* виявляється дуже низькою або навіть відсутньою в клітинах *E.coli*.

**Актиноміцети** з практичної точки зору важливі тим, що більше 70% відомих антибіотиків продукуються цим

родом бактерій. Найбільш генетично вивченими серед актиноміцетів є штами *St.coelicolor* A3(a) і *St.lividars* 66.

Застосування методів молекулярного клонування до актиноміцет виявилось можливим внаслідок розробки ефективних способів одержання та регенерації протопластів, трансформації протопластів плазмідною ДНК і трансфакції фаговою ДНК, конструювання векторних молекул на основі плазмід та фагів. Для трансформації і трансфакції протопласти і ДНК змішують та обробляють поліетиленгліколем (ПЕГ). На ефективність проникнення ДНК у клітини впливає ряд факторів: температура, вік міцелію, концентрації літичних ферментів, іонів  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , сахарози тощо.

Для актиноміцет розроблені як плазмідні, так і фагові вектори. Плазмідні вектори сконструйовані на основі плазмід актиноміцетів. Першою використаною плазмідною була SLP 1.2 розміром 14,5 т.п.н., яка виділена із *St.lividars* 66. Плазмідни цієї серії обумовлюють кон'югаційний перенос. У якості селектуючих маркерів вони містять гени стійкості до антибіотиків неоміцину (aph), теострептону (tsr), віоміцину (vph).

Друга серія векторів створена на основі статевої плазмідни *St.coelicolor* A3(a) –SCP (31 т.п.н.), вивчені ділянки, відповідальні за реплікацію, стабільність, фертильність. Виділений мінімальний реплікон розміром у 1,35 т.п.н. На основі реплікона створена колекція векторів, які несуть селектуючі маркери, вигідні сайти рестрикції. Створені човникові вектори, здатні реплікуватися в актиноміцетах та *E.coli*. Вектор для прямого відбору клонів несе ген **mel**, який контролює синтез тирозинази – ферменту, що перетворює тирозин у меланопігмент.

Фагові вектори актиноміцетів сконструйовані головним геном на основі фага  $\phi$ c31. Розмір генома  $\phi$ c31 складає 41,5 т.п.н. Фагова ДНК містить cos-ділянки

(“липкі” кінці) і несе безперервну зону довжиною 8 т.п.н., несуттєву для літичного розвитку. Мінімальний розмір молекул ДНК, які можуть упаковуватися у фагову головку – 35 т.п.н. Використання фагових векторів відкриває великі перспективи для клонування генів біосинтезу антибіотиків за допомогою *мутаційного клонування*. Суть методу полягає у виникненні мутантів, які не здатні до синтезу антибіотика (Ant<sup>r</sup>) при включенні фага за гомологією із клонованим фрагментом у структурну частину гена *ant* реципієнтного штаму, внаслідок порушення їх цілісності. Фагові нащадки мутантних штамів, утворені при вирізанні профага по фланкуючих гомологічних повторах, містять у складі фагових геномів клонуючий фрагмент з геном *ant*.

За допомогою методу мутаційного клонування виділені гени біосинтезу антибіотика метиленоміцину (*mmu*). Всі гени виявилися зчепленими і локалізуються на плазміді SHP1.

Актиноміцети володіють особливістю будови геному – явищем ампліфікації частини геному. Ампліфіковані послідовності мають розмір від 50 т.п.н. до 0,2 т.п.н. і від 10 до 500 тандемно повторюваних копій. Рекомбінація за прямими повторами може призводити до виникнення мутаційних феноменів. Це явище може бути використане для конструювання інтегративних ампліфікуючих векторів, у яких чужорідний ген включається всередину ампліфікованих послідовностей.

Ген *E.coli* і бацил, як правило, експресується в стрептоміцетах з використанням власних регуляторних елементів (промоторів і сайтів ініціації трансляції). Так, вставка промоторів *lac UV5*, *trp*, гена *recA E.coli*, або промотора гена пеніцилінази *Bac. Licheniformis* перед геном *cat* (без промотора) на спеціальній плазміді призводить до створення стійкості до хлорамфеніколу

штаму *S.lividans* бб. Актиноміцетні гени, навпаки, не експресуються в *E.coli*.

Одержані добрі результати використання актиноміцетів як промислових продуцентів чужорідних білків та інших біологічно активних речовин. Здійснена розробка конструкції штаму - продуцента гормону росту худоби на основі *S.lividans* бб і багатокопійної плазмиди рIJ702. Експресія і секреція здійснювалися за рахунок власного промотора та сигнальної послідовності білка-токсину. Отже, використання генетичною інженерією актиноміцетів має широкі перспективи.

У даний час **бацили** стають одним з важливих об'єктів генно-інженерних досліджень. Це пов'язано з рядом особливостей цих мікроорганізмів. По-перше, вже тривалий час промисловість використовує здатність бацил секретувати багато ферментів, таких як протеніаза,  $\alpha$ -амілаза. Друга особливість – це глибока генетична та біохімічна вивченість бактерій виду *Bac.sublitis*, що полегшує розвиток генно-інженерних маніпуляцій із цим мікроорганізмом.

Клонування у бацилах має ряд особливостей. Незважаючи на те, що в окремих видів бацил виявлені плазмиди, більшість із них виявилися криптичними, тобто не кодують відповідних функцій. Хоча С.Ерліх довів, що деякі плазмиди *St.aureus*, які визначають стійкість до антибіотиків, можуть реплікуватися та експресувати свій генетичний матеріал у *Bac.sublitis*. Тепер створено багато векторів на основі репліконів плазмід *St.aureus*. Досить значне розповсюдження одержали човникові вектори, здатні реплікуватися як у *Bac.sublitis*, так і в *E.coli*. Такі плазмиди містять два реплікони, один з яких контролює реплікацію в *E.coli*, а другий – в клітинах *Bac.sublitis*.

Попри те, що *Bac. sublitis* – класичний об'єкт вивчення хромосомної трансформації й у належному (компле-



ментарному) стані до 5% клітин здатні поглинати чужорідну ДНК, плазмідна трансформація має ряд особливостей. Вона проходить слабо, а мономерні кільцеві форми плазмідної ДНК зовсім не здатні до трансформації. Ці проблеми клонування у *Vac. subtilis* частково були вирішені на основі методу **рекомбінаційного спасіння маркера**. Суть методу – у введенні ДНК гібридної плазмиди у клітини, які містять уже реципієнтну плазмиду, гомологічну вихідному векторові. Внаслідок *recE*-залежної рекомбінації у реципієнтній клітині появляється гібридна плазміда. У процесі добудови одниткової ДНК проходить виправлення дефектів донорської ДНК. У цьому методі важливим є те, щоб негомологічний фрагмент був оточений гомологічними послідовностями. Добрі результати одержані для клонування у *Vac. subtilis* фрагментів ДНК *Vac. licheniformis*, які несуть *trp*-маркери і гени рибофлавінового оперона.

Основним завданням генно-інженерних робіт на бацилах є створення векторів, здатних експресувати чужорідні гени і секретувати продукти цих генів. З цією метою чужорідні гени вбудовують за ділянкою ДНК, яка кодує сигнальну послідовність добре експрегуючого і секретуючого бацилярного білка. Прикладом можуть бути роботи зі секреції людського інтерферону  $\alpha 2$  під контролем регуляторних елементів та сигнального пептиду  $\alpha$ -амілази або людського  $\beta$ -інтерферону під контролем промотора і регуляторної ділянки нейтральної протеази *Vac. amyloli-guefaciens*.

**Дріжджі** складають особливий інтерес у зв'язку з тим, що вони є найпростішими еукаріотами, тому впровадження методів молекулярної генетики і генетичної інженерії у дослідженнях дріжджових клітин приведе до розкриття багатьох фундаментальних особливостей функціонування еукаріотичних клітин. Більшість

досліджень проведено на пекарських дріжджах *Sacchar. cerevisiae*.

Генетична інженерія дріжджів виникла в 1978 році разом із відкриттям можливості трансформування дріжджових сферопластів плазмідного ДНК. Було встановлено, що при трансформації гібридними плазмідами, які містили реплікон ColE1 і фрагмент дріжджової ДНК, відбувається інтеграція всієї плазмиди або дріжджового гена в хромосому *Sacchar. cerevisiae*.

Найбільшого практичного значення набули вектори YEp (епісомні). Вони використовують як репліканта природну плазмиду *Sacchar. Cerevisiae* розміром біля 6 т.п.н. Незважаючи на те, що в неї вивчена повна нуклеотидна послідовність, дотепер немає конкретних даних про її корисну функцію для дріжджової клітини.

Великі надії пов'язували з дріжджовими клітинами як еукаріотичними організмами для експресії в них генів людини і тварини. Однак виявилось, що сигнали ініціації транскрипції, трансляції та сплайсингу в дріжджів відмінні щодо вищих еукаріот. Хоча біля 10% дріжджових генів містять інтрони, сплайсинг про-мРНК вищих еукаріот не відбувається, й у них, як і клітинах бактерій, можна клонувати тільки гени одержані із кДНК.

Для ефективної експресії чужорідних генів використовують сигнали ініціації і термінації транскрипції дріжджових генів. На основі векторів Yep створені спеціальні експресуючі вектори (сендвіч-вектори, рис 4.8). Ці вектори містять у своєму складі дріжджовий промотор (часто з підсилювачем транскрипції – енхансером), 5'-нетранслюючу ділянку, рестрикаційний сайт для вбудови чужорідного гена і термінатор транскрипції. Вбудований чужорідний ген попадає, таким чином, під транскрипційний контроль одного із генів дріжджів. Вектор може реплікуватися в *E.coli* і *Sacchor.cerevisias* та

відбиратися за стійкістю до ампіциліну в *E.coli* та прототрофності по лейцину в *Sacchar.citrevisiae*.

У генетичній інженерії дріжджів широко використовуються промотори генів PGK1 (3'-фосфогліцераткіназа), GPD1 (гліцерольдегід-3-фосфатдегідрогеназа), ADH1 (алкогольде-гідрогеназа), PHO5 (кисла фосфатаза) і ряд інших. Найбільш сильний промотор містить ген PGK1. Клонування на векторі YEр 3-фосфогліцераткінази (тобто власного гена дріжджів) призвело до того, що цей фермент складає 50-80% загального білка.

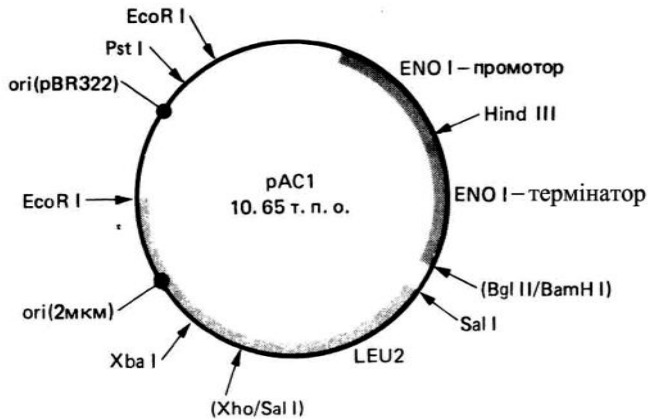


Рис. 4.8. Сендвіч-вектор, що використовується для експресії в дріжджах чужорідних генів (за М. Innis, 1985):

Проблема оптимізації експресії чужорідних білків у дріжджах в цілому та ж, що й для бактеріальної клітини:

- 1) боротьба з протеолізом; 2) стабілізація мРНК;
- 3) подолання токсичності деяких білків для клітин.

Ці проблеми ускладнюються ще й тим, що умови ініціації транскрипції у дріжджів менш вивчені, ніж у бактеріальних клітинах. Важливим завданням генетичної інженерії дріжджів є покращення промислових штамів.

Успішним прикладом є введення гена глюकोамілази гриба *Aspegillus* у клітини *Sacchar.cerevisiae*. Цей фермент гідролізує  $\alpha$  (1,4)- і  $\alpha$  (1,6)-глікозидні зв'язки, і таким чином деградує необроблений крохмаль. Оскільки дріжджі нездатні до сплайсингу, ген глюкоамілази був одержаний з допомогою зворотної транскрипції із мРНК, потім введений у сендвіч-вектор під контроль промотора і сигнальної послідовності дріжджової енолази (ENO 1). При цьому спостерігається майже 100% секреція грибною глюкоамілази в середовище.

На основі генетичної інженерії мікроорганізмів у багатьох країнах світу налагоджено промислове виробництво гормонів, амінокислот, інтерферонів, ферментів, вакцин, антибіотиків та інших біологічно активних речовин. Це фірми “Генентек”, “Елі Ліллі”, “Ново-індастрі”, які спеціалізуються на виробництві соматотропіну та інсуліну. Компанія “Кабі вітрум АБ” продукує майже 60% світового запасу соматотропіну. До числа крупних виробників гормонів відносяться фірми “Нордіск інсулін” (Данія), “Серано” (Італія і Швейцарія) та національне агентство гіпофізу США. Фірми “Сьорл” (Велика Британія), “Трансжен” (Франція), “Сенторі”, “Дайчі сейяні”, “Міцці тоацу кемікал” (Японія), “Біоген”, “Шерінг-Плац”, “Інтерферон сайенс інк”, “Хофман-Ла Рош”, “Колла бореїтів генетік” (США) успішно працюють з виробництва інтерферонів.

Але однією з найважливіших проблем була і залишається на сьогодні проблема переносу генетичної інформації з наступною експресією не тільки в культурі клітин, а й у цілий організм. Найбільш ефективний і перспективний підхід до переносу генів - пряма ін'єкція чужорідної ДНК у запліднені яйцеклітини і ранні ембріони з метою розширення можливостей рекомбінаційного процесу та одержання трансгенних тварин.

## V. ОДЕРЖАННЯ ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН

Успіхи, досягнуті з виділення генів вищих організмів, їх рекомбінування з бактеріальними плазмідами, клонування в бактеріях, виявлення нуклеотидної послідовності, інтеграції рекомбінантної ДНК у тваринну клітину та експресії чужорідних генів, дозволяють говорити про можливість розробки принципово нової біотехнології створення тварин з потрібним генотипом. Експерименти показали, що клітини, які культивуються у вищих тварин, стають носіями нових спадкових властивостей і продукують нові для них речовини. Але методи генетичної інженерії для ссавців, особливо для сільськогосподарських тварин, вимагають суттєвого вдосконалення.

Одною з причин цього є обставина, що й досі не знайдені, або не сконструйовані ефективні та надійні вектори, які б могли вносити потрібні гени у клітини тварин. Інша причина полягає в глибокому диференціюванні клітин вищих тварин. Якщо із однієї рослинної клітини в культурі, в яку введений новий ген, можна одержати багатоклітинний організм – цілу рослину, в якій чужорідна ДНК буде присутня в усіх клітинах, то із соматичних клітин вищих тварин одержати цілий багатоклітинний організм неможливо, а тому цей шлях переносу генів не можна використовувати до багатоклітинних тварин.

Новий підхід для напрямленої зміни генома тварин заснований на введенні в зиготу або ранній ембріон клонованих еукаріотичних генів у складі бактеріальних плазмід. Тварин, у геном яких інтегрують чужорідні гени називають *трансгенними*.

У дослідах з генетичної інженерії серед ссавців найбільш розповсюдженим об'єктом є миші. У них добре

вивчені біологія розмноження і спадковість. У цього виду виділено більше 700 генетичних локусів. Для 450 локусів встановлено точне місцезнаходження на хромосомі. Все це дозволяє створити ряд генетичних ліній, на яких можна провести і відтворити експерименти. Банки генів мишей створені в багатьох лабораторіях. На мишах найбільш повно розроблені мікрохірургія зигот і ранніх ембріонів, методи культивування овоцитів та ембріонів *in vitro*. Пересадка реципієнтам ембріонів, розвиток яких проходить у культуральних середовищах, призводить до високого рівня їх імплантації і народжених повноцінних нащадків. У багатьох експериментах встановлено, що миші, які розвивалися із зиготи, в яку було введено чужорідну ДНК, містять у своєму геномі фрагменти цієї ДНК, а в окремих випадках у них проходить експресія чужорідних генів. Такі тварини за допомогою генетичних маркерів точно ідентифікуються як трансгенні.

Техніка мікроін'єкції ДНК зводиться до того, що в запліднену яйцеклітину вводять ген і витримують зиготу з чужорідною ДНК упродовж години. Проводять селекцію зигот з чужорідною ДНК і трансплантують в ампулу яйцепроводу гормонально підготовленої самки-реципієнта іншої генетичної лінії.

Перші досліди з мікроін'єкції ДНК вірусу SV40 в бластоцити ранніх ембріонів мишей були проведені в 1974 році (R.Taemisch, B.Mintz). Введена в бластоциту мишачого зародка ДНК вірусу SV40 була виявлена в тканинах дорослого організму. Але інтеграція цієї вірусної ДНК у геном миші не пройшла. Перші трансгенні миші, що містили у своєму геномі чужорідні гени, були одержані Р.Янишем в 1976 році. В цих дослідах переносили клоновану провірусну ДНК вірусу лейкемії Молонії. Послідовності нуклеотидів чужорідної ДНК були виявлені

в гаметах трансгенних мишей і успадковувалися як прості менделівські ознаки.

Корінним переломом у проблемі одержання трансгенних тварин були результати Дж.Гордона, одержані в 1980 році (Gordon J.et.al.,1980). Ним вперше показано можливість трансформації миші шляхом введення рекомбінантних молекул плазмиди, що містила ген тимідинкінази (ген Тк) вірусу герпеса, у пронуклеус заплідненої яйцеклітини. Слід відмітити, що кращі результати були одержані при мікроін'єкції рекомбінантної ДНК в чоловічий, більш крупний пронуклеус, який після запліднення яйцеклітини сперматозоїдом розташований близько до поверхні зиготи. Такий ефективний метод мікроін'єкції чужорідної ДНК в чоловічий пронуклеус зиготи використовується тепер у всіх ссавців у тому числі й сільськогосподарських тварин.

У такому ж досліді проводились мікроін'єкції рекомбінантної ДНК плазмиди, що містила ген  $\beta$ -глобіну людини. Як показали результати дослідів, у двох із 78 одержаних новонароджених мишей була виявлена ДНК ін'єктованих плазмід у дещо модифікованому вигляді. В основі особини пройшла інтеграція рекомбінантної ДНК в геном. Це вказувало, що інтеграція чужорідної ДНК в хромосоми тварин та їх спадкова передача в принципі можливі. Разом з тим відмічена непередбачуваність характеру експресії чужорідних генів й їх перебудови.

У 1983 році Дж.Гордон розробив принципову схему одержання трансгенних мишей, яка використовується і в даний час. В основі схеми лежить включення клонованого гена в плазмиду, а суспензія плазмід за допомогою мікроін'єкції вводиться в чоловічий пронуклеус зиготи миші.

Для розробки схеми були проведені багаточисельні дослідження, в результаті яких не тільки здійснений

перенос в геном миші ряду різних еукаріотичних генів, а й створені нові інбредні лінії трансгенних мишей, що різнилися між собою структурою чужорідної ДНК. Так були введені: гени тимідинкінази (Wagner E. Et.all., 1981; Вайсман Б.Л. та ін 1983, 1984), ген гемоглобіну кроля (Wagner E. et all., 1981 Laci E. et all., 1983), ген лейкоцитарного інтерферону людини (Gordan J.;1981, 1983), ген гормону росту щура (Palmiter R.D.et.all., 1982) і людини (Palmiter R.D. et all., 1983; Wagner E.et.all., 1983 Дыбан А.П., Городецкий С.И., 1983; Войстман Б.Л. та ін., 1984).

Особливу цікавість викликає дослід інтеграції в геном миші гена гормону росту, який суттєво прискорював ріст мишей (Palmiter R. et all., 1982). Слід мати на увазі, що соматотропін є видоспецифічним, тобто він повинен бути виділений тільки з гіпофіза тварин цього ж виду. В дослідях Р.Пальмітера ген гормону росту щура використовувався для експресії в клітинах мишей, і тому промотор бактерій був непридатний. Тут необхідним був енхансер, тобто регуляторна ділянка гена, що відповідала за специфічну регуляцію всього гена. З цією метою був виділений фрагмент ДНК-промоторна частина гена металотинеїна МТ-1. Білок МЕ-1 активно синтезується в печінці. Він зв'язує йони важких металів, його синтез *in vitro* індукується солями важких металів. Для мікроін'єкції була використана рекомбінантна ДНК, що складалася зі зшитих фрагментів різних генів: промоторна частина гена-металотинеїна МТ-1 миші і структурна - гормону щура, в якому власний промотор та ініціатор були видалені. Було ін'єктовано в зиготи миші по 600 копій такої рекомбінантної ДНК. Всього було одержано 21 нащадка мишей. У семи особин виявлено чужорідний ген-гормон росту щура, який був інтегрований в хромосоми миші. Народженим трансгенним мишам до корму додавали



ZnSO<sub>4</sub>, який індукував та активував синтез ендogenous металотинейна MT-1. Це і привело до включення в геном миші гормону росту щура. Аналіз крові трансгенних мишей показав, що концентрація гормону росту у них була в 100-800 разів більшою від норми. Надлишкова концентрація цього гормону зумовлювала інтенсивний ріст- жива маса трансгенних мишенят була в 1,8 раза більша від контрольних. Синтез гормону росту проходив не в передній долі гіпофіза, а в печінці. Пояснити таке явище можна тим, що функцією гена соматотропіну управляв ген металотинейну, який проявляє свою дію лише в печінці. В той час ген гормону росту щура, мабуть, експресувався в усіх клітинах трансгенних мишей.

Аналіз результатів проведених експериментів з одержання трансгенних мишей дозволяє виділити основні фактори, що впливають на ефективність інтеграції чужорідних генів. До них відносяться: концентрація чужорідної ДНК, склад буферів, місце мікроорієнтації чужорідної ДНК, форми і види векторів. В усіх дослідах тільки частина нащадків від трансгенних батьків успадковують чужорідні гени. Інтеграція чужорідних генів у геномі трансгенних мишей може складати від однієї до сотень копій на клітину. В середньому у трансгенних мишей інтегрується 25-30% копій введеної ДНК. Частота інтеграції чужорідної ДНК сильно знижується. При ін'єкції в цитоплазму вона складає в ембріонів 0,9%. Інтеграція лінійної молекули у ембріонів 0,9%. В ряді випадків інтеграція в геном чужорідних генів супроводжується індукуванням мутацій, в тому числі з рецидивними легаліями. Це призводить до аномалій розвитку і підвищеної ембріональної смертності.

Залишається відкритим питання, що має надзвичайно важливе значення в розведенні тварин із збереженням чужорідної ДНК в ряді поколінь. У цілому результати

експериментів з одержання трансгенних мишей вказують на перспективність проведення аналогічних досліджень у тваринництві для розробки принципових і біотехнологічних підходів.

У дослідах з одержання трансгенних сільськогосподарських тварин по суті використовується принципова схема, розроблена для мишей:

- вибір, виготовлення і клонування чужорідного гена;
- одержання зигот і виявлення пронуклеосів;
- мікроін'єкція відповідного гена копій генів у видимий пронуклеус;
- трансплантація зиготи у статеві шляхи гормонально підготовленої самки ;
- оцінка народжених тварин за генотипом та фенотипом -інтеграція чужорідної ДНК, експресія ДНК, виявлення продукту гена (наприклад гормону росту) і вплив на ознаку (наприклад висока інтенсивність росту).

### **5.1. Одержання трансгенних кролів.**

Мікроін'єкція чужорідної ДНК у пронуклеус зиготи полегшується тим, що вони видимі під контрастним мікроскопом. У перших дослідах з одержання трансгенних кролів (Hammer R. et all. 1985) після проведення мікроін'єкції гена МТ-h-GH, пересадки зигот реципієнтам із 218 ембріонів і новонароджених кроликів у 28 (12,8%) пройшла інтеграція гена. У 4 із 16 обстежених кролів (25%) виявлена експресія чужорідного гена.

В інших дослідженнях (Brem G. et al., 1986) гібридний клон ДНК також одержували шляхом злиття лінійного фрагмента ДНК, який містив мишачу промоторну зону металотинейна з структурним геном гормону росту людини, і наступного клонування в

гібридному векторі BPV/pBR 327. Цей фрагмент рекомбінантної ДНК EcoR1/EcoR1 ін'єктували в пронуклеуси кролів. Після мікроін'єкції 316 зигот були трансплантовані реципієнтам. Вагітність наступила у 5 з 15 самок.

Одержано 30 кроликів, у 16 з яких проведено аналіз на трансгенність, з яких 19% виявилися трансгенними. Частота одержання трансгенних кролів складає 19-25%.

## **5.2. Одержання трансгенних овець**

У зигот овець тільки у 80% випадків можна спостерігати під контрастним мікроскопом пронуклеуси. Це утруднює мікроін'єкцію чужорідної ДНК. Р.Хаммер (Hammer R. et all., 1985) для підвищення видимості пронуклеосів зигот овець використовував ІС-мікроскоп. В експерименті використано чужорідний ген, який складався з мишачого металотиніну 1-го промотора, злитого зі структурним геном гормону росту людини. Мікроін'єкція такої рекомбінантної ДНК була здійснена в пронуклеуси або ядра 614 зиготі, в 375 двохклітинних і 16 чотирьохклітинних ембріонів. Після пересадки зигот або ранніх ембріонів одержано 73 ягнят і лише одне з них було трансгенним, у якого в геномі пройшла інтеграція ін'єктованого чужорідного гена МТ-1-ГН.

Більш ефективним виявився метод мікроорієнтації в зиготу гена, відповідальну за синтез гормону росту овець. Такі експерименти провели австралійці, створивши вперше у світі трансгенних овець (Scott T., 1980). Через п'ять тижнів після народження трансгенним вівцям ввели невелику дозу цинку, який включив роботу гена, що активував регуляторну послідовність основ ДНК, тобто промоторну частину гена. Цей захід привів до інтенсифікації синтезу гормону росту. Через 2-4 роки

трансгенні вівці у 1,5 раза переважали за масою однолітків тієї ж породи. Австралійські вчені працюють над розробкою введення вівцям інших генів, які привели б до прискорення росту вовни, стійкості до захворювань та створення трансгенних особин з різнобарвною вовною.

### **5.3. Одержання трансгенних свиней**

Трансгенні свині вперше були одержані в лабораторії Р.Хаммера (Hammer. et all. 1985,1986) і Г.Брема (Brem G. et all.,1986). Пронуклеуси зигот свиней під контрастним мікроскопом невидимі. Для їх виявлення використовують центрифугування. Ін'єктували чужорідний ген, який складався із промоторної частини – гена МТ-1 і структурної частини – гена гормону росту людини. В експерименті Р.Хаммер трансплантував реципієнтам 316 зигот і 1719 двохклітинних ембріонів. У результаті трансплантації та імплантації одержано 192 ембріонів і новонароджених поросят із яких 20, або 10,4%, були визнані як трансгенні, а в 11 із них, тобто 55%, виявлено експресію чужорідного гена МТ-ГН.

В досліджах Г.Брема після проведення мікроін'єкції в пронуклеуси зигот аналогічного гена 268 зигот пересаджені реципієнтам. У результаті нормальної супоросності, що наступила у 3 із 10 свиноматок, було одержано 15 поросят. Одне порося із 7 аналізованих виявилось трансгенним.

На основі проведених дослідів можна зробити висновок, що частота появи трансгенних свиней складає 10-14%.

#### 5.4. Перенос чужорідних генів худобі

Пронуклеуси зиготи або ядра двоклітинних ембріонів корів не виявляє контрастний мікроскоп. Для виявлення використовувались ДНК-специфічні флюоресцентні барвники і центрифугування зигот. У пронуклеус зиготи вводять мікроін'єкцією чужорідної ДНК, що складається з гена МТ-1 миші і гена тимідинкінази вірусу гена (Lohse J. et al., 1986). Після трансплантації реципієнтам було одержано 5 нащадків, але у жодного теляти не було виявлено інкорпорації чужорідного гена в геномі. Складність одержання трансгенних тварин пов'язана з біологічними та економічними проблемами. На відміну від багатоплідних тварин у худоби до цього часу не вирішена проблема одержання достатньої кількості біологічно повноцінних яйцеклітин зигот. Це зумовлено тією обставиною, що взяття запліднених яйцеклітин від генетично цінних корів-донорів пов'язано з порушенням їх відтворних функцій. У зв'язку з цим необхідно вдосконалювати лапароскопічну техніку, одержувати овоцити за допомогою лапароскопії зі стимульованих яєчників корів і запліднювати їх *in vitro*. Це дозволить одержувати запліднену яйцеклітину в потрібній стадії її розвитку. Нові можливості відкриває спосіб культивування овоцитів до повного дозрівання і запліднення *in vitro*.

Існує та інша проблема розробка методів упаковки чужорідного ДНК для запобігання дії ендонуклеаз. Одним з перспективних досліджень у цьому напрямку є розробка методу запліднення *in vitro* за допомогою мікроін'єкції одного сперматозоїду в овоцит. Якщо такий метод буде розроблений, то в деконденсований сперматозоїд можна інкорпорувати чужорідну ДНК і потім провести мікроін'єкцію в яйцеклітину. Вивчаються також

можливості використання вірусів в якості векторів для переносу чужорідних генів.

У перспективі для одержання трансгенних тварин будуть створюватися трансформовані клітинні лінії із зародкових клітин та їх пересадка в енуковані яйцеклітини чи бластомери.

Генетична програма ссавців дуже – складна і комплексна проблема. Часто господарсько важливі ознаки, на думку багатьох вчених, полігенні. Ще немає достатньо відомостей про те, які гени визначають ту чи іншу ознаку, як їх ідентифікувати.

В даний час генетична інженерія використовує перспективний напрямок, зведений до вивчення поліморфізму, довжини фрагментів рестрикції. При роботі з ДНК такий метод одержав назву блоттіngu за Саузерном. Суть цього методу полягає в ізоляції лейкоцитів та виділенні з них ДНК, яку розрізають рестриктазами і фрагменти розділяють електрофорезом за молекулярною масою. Ідентифіковані рестрикти переносять на фільтрувальні мембрани, де проводять гібридизацію з радіоактивним маркерованим фрагментом ДНК з гомологічною послідовністю (радіоактивний зонд). Кожна комплементарна послідовність буде проявлятися у вигляді радіоактивної смуги. Так визначають рестрикти, комплементарні радіоактивному зондові.

Проведені на різних породах худоби досліді виявили широкий індивідуальний та породний поліформізм довжини фрагментів рестрикції. За допомогою такого маркера можна виявити і дефективні гени, що обумовлюють спадкові хвороби. Кінцевою метою цього напрямку є повне картування геному тварин і вияснення генетичної природи зміни кількісних ознак.

Важливими проблемами в дослідях із трансгенезу генів в організми тварин виявились регуляція і експресія

внесених генів. Тільки декілька промоторів із багатьох досліджених здатні активувати приєднання до них генів. Включення в геном клонованого чужорідного гена може мати дві мети: генетичне покращення тварин й одержання тварин для виробництва додаткових цінних продуктів. При генетичному вдосконаленні тварин повинні використовуватися гени, що покращують основні господарсько важливі ознаки і властивості сільськогосподарських тварин. Це використання генів, відповідальних за синтез гормону росту, що зумовило б збільшення молочної продуктивності і живої маси худоби, а також підвищення вмісту білка в молоці та м'ясі.

Біологічна функція багатьох білків залежить від правильної переробки первинного продукту гена всередині клітини. Така переробка охоплює, наприклад, протеолітичне розщеплення первинних продуктів генів, або їх гліколізування. Перевага сільськогосподарських тварин утворені з бактеріями чи дріжджами полягає в здатності їх клітин правильно переробляти бажаний продукт. Відомо, що у найвищу стадію лактації від високопродуктивних корів можна щоденно одержати біля 1 кг протеїну. Теоретично можливо промотор коров'ячого білка, особливо козеїну сполучити зі структурною частиною бажаного гена цінного білка, наприклад, інсуліну чи інтерферона, а потім ін'єктувати рекомбінантну ДНК в зиготу або двоклітинний ембріон. Від трансгенних корів можна б було одержувати у великих кількостях цінні білки, і це відкрило би принципово новий напрямок в селекції тварин.

Дослідження зі створення трансгенних тварин-продуцентів біологічно активних речовин і медичних препаратів ведуться в багатьох світових лабораторіях. Наприклад, розроблена біотехнологія одержання фактора згортання крові із молока трансгенних овець, який би міг

бути використаний для лікування гемофілії. Розробляються аналогічні проекти з одержання біологічно активних речовин і медичних препаратів - інсуліну, інтерферону, гонадотропних гормонів та ін. Таким чином, генетична інженерія представляє перспективний напрямок сучасної біотехнології, мета якої – створення тварин із реконструйованими генотипами.

Використання генетичної інженерії, основаної на створенні, клонуванні рекомбінантних ДНК та експресії їхніх генів, дало можливість прискорити вивчення молекулярних дефектів, що лежать в основі деяких захворювань зі спадковим раннім старінням. Інший напрямок практичного використання генетичної інженерії в геронтології - одержання інтерферонів, ферментів та гормонів для кореляції вікових пошкоджень обміну речовин і механізмів його регуляції.

В даний час генно-інженерні методи стали використовуватися для геронтологічних досліджень вивчення механізмів старіння. На думку Бердишева Г.Д., використання методичних підходів генетичної інженерії в геронтології має не тільки прикладне (замінна, корегуюча, генна терапія), але й фундаментальне значення.

Перспективною сферою використання генетичної інженерії в геронтології може виявитися синтез генів, що кодуватимуть ферменти з новими для клітини властивостями, зокрема гідролізуватимуть тупикові метаболіти, наприклад: пігмент старіння, ліпофусцин, холестеринові бляшки, кількість яких у клітинах з віком збільшується, пізнаватимуть дефектні молекули білків і гідролізуватимуть їх, руйнувати білок-білкові, білок-ДНК зшивки, число яких при старінні збільшується.

Одним з актуальних завдань ветеринарної медицини є точна діагностика захворювань, включаючи чітке типування таких збудників, які обумовлюють різні типи



інфекційної патології, рестрикційне типування вірусних геномів. Так, герпес вірус інфекційованого рінотрахеїту викликає не тільки рінотрахеїт, але й генітальні хвороби, енцефаліти, ентерити і генералізовані інфекції у телят. Очевидно, що дослідження збудників таких різних форм захворювань вимагає їх детального типування з метою встановлення ознак розрізнення. Серологічні та імуноферментні методи не завжди ефективні й не гарантують точного типування. Ці труднощі знайшли пояснення в дослідах з молекулярної гібридизації геномів герпес вірусу інфекційного рінотрахеїту і від телят з енцефалітами або генітальною формою захворювання. В геномах цих вірусів не менше 95% нуклеотидних послідовностей гомологічні. Метод рестрикційного картування вірусних геномів дає можливість визначати відмінності між герпес вірусом інфекційного рінотрахеїту, енцефалітами і генітальними хворобами.

Молекулярна гібридизація нуклеїнових кислот є класичним методом молекулярної біології, володіє високою чутливістю і специфічністю. Використання реакції молекулярної гібридизації у ветеринарній діагностичній практиці стримувалося складністю нагромадження великих кількостей генетичного матеріалу відповідних збудників. Молекулярне клонування ці труднощі поборолу. Друге обмеження - спосіб лічення ДНК-зондів. У лабораторних умовах одержані фрагменти генома, збудника для використання в якості зондів високоефективно мітять радіоактивними ізотопами, що не завжди зручно для широкого використання в діагностичних службах. Тепер розроблені методи введення в ДНК ферментів. Одержання діагностичних зондів, що виявляють геноми збудників за допомогою барвникових реакцій (біотинізовані ДНК-зонди), знімає обмеження їх широкого використання в діагностичній практиці. Техніка

постановки молекулярної гібридизації з діагностичними зондами має два варіанти: точковий (дот-гібридизація) на фільтрах і гібридизація *in situ* на клітинах. Діагностична цінність ДНК-зондів була показана на моделях інфекційного ларинготрахеїту птиці, герпес – вірусу людини, аденовірусів, поліомавірусів, вірусу хвороби Ауескі. Використання ДНК-зондів цим не обмежується. Одержання кДНК на матрицях геномних вірусних РНК після молекулярного клонування дозволяє виготовляти зонди для виявлення вірусних РНК геномів у клітинах за допомогою точкової ДНК - РНК гібридизації. Діагностичні ДНК-зонди були використані для виявлення в клітинах цілого ряду РНК-вмісних вірусів, наприклад, ротавірусів та вірусів синього езіна. Діагностичні ДНК-зонди можуть бути використані для виявлення бактеріальних і протозойних збудників хворіб.

Гібридизація *in situ* - другий спосіб використання ДНК-зондів. Використання зондів при вивченні внутріклітинних процесів дозволяє не тільки виявляти ДНК герпес – вірусу, цитомегаловірусу або папіломавірусу, а й аналізувати утворення і розподіл вірусних мРНК, вивчати такі молекулярні механізми в заражених та пухлинних клітинах. Поряд з позитивними сторонами генетичної інженерії не можна забувати і про негативні наслідки її використання. Нові мікроорганізми можуть набути незвичайної патогенності, або резистентності до відомих лікарських речовин. Наслідки прориву захисних лабораторних бар'єрів патогенним рекомбінантним мікроорганізмом важко уявити. Крім того, процеси утворення рекомбінантних молекул можуть супроводжуватись різким збільшенням мутагенезу, особливо при введенні в клітину екзогенних нуклеїнових кислот. Особлива небезпека полягає в тому, що складовою частиною рекомбінантних молекул може бути ДНК *E.coli* –

звичайного представника кишкової флори людини, що може стати патогенним при зміні свого генома.

## КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ

1. Носіями яких видів нуклеїнових кислот є усі живі організми?
2. Яка біологічна роль нуклеїнових кислот?
3. Хімічна будова нуклеїнових кислот.
4. Від чого залежить хімічний склад нуклеїнових кислот?
5. Хімічна будова пуринових основ.
6. Хімічна будова піримідинових основ.
7. Яка відмінність у будові ДНК і РНК?
8. Яка відмінність функцій ДНК і РНК?
9. Основна функція ДНК.
10. Які сполуки називаються нуклеотидами?
11. Хімічна будова нуклеозидів.
12. Назвіть типи РНК і їх функції.
13. Які рівні структурної організації мають нуклеїнові кислоти?
14. Чим визначається первинна структура нуклеїнових кислот?
15. Вторинна структура нуклеїнових кислот.
16. Що таке генетична карта людини?
17. Коли вперше було встановлено первинну структуру ДНК людини?
18. Що таке правило комплементарності?
19. Що зумовлює комплементарність основ фрагментів ДНК?
20. Коли і ким була запропонована вторинна структура ДНК?
21. Що таке вторинна структура ДНК?
22. Чим забезпечується стабільність біспіральної структури ДНК?
23. Які типи подвійної спіралі є у ДНК та РНК?
24. Чим відрізняються між собою різні ДНК?

25. Яку особливість має третинна структура нуклеїнових кислот?
26. Чим зумовлена третинна структура нуклеїнових кислот?
27. За участю яких ферментів відбувається суперспіралізація ДНК в еукаріот?
28. Назвіть білки, які беруть участь у суперспіралізації ДНК.
29. Які амінокислоти переважають у складі білків, що забезпечують суперспіралізацію ДНК?
30. Що таке нуклеосоми?
31. Способи укладання ДНК у просторі.
32. Чим зумовлюється укладання ДНК у просторі?
33. Яку інформацію містить спіраль ДНК?
34. Що таке нуклеофільні групи?
35. Які групи називаються електрофільними?
36. Як відбувається реплікація ДНК?
37. За участю яких ферментів відбувається реплікація ДНК?
38. Що є обов'язковою умовою реплікації ДНК?
39. Що таке реплікаційна вилка?
40. Що означає транскрипція РНК?
41. Які ферменти беруть участь у забезпеченні процесу транскрипції?
42. Що таке РНК-транскрипти?
43. Яка відмінність у трансляції прокаріотичних та еукаріотичних РНК-транскриптів?
44. Що називається генетичним кодом?
45. Яка особливість будови гена?
46. Коли і ким був розшифрований генетичний код?
47. Чи є генетичний код універсальним для всіх організмів?
48. За участю яких чинників відбувається проходження інформації від ДНК до білка?

49. Що таке кодон-антикодонове пізнавання і взаємодія?
50. Сутність гіпотези коливань.
51. Назвіть етапи біосинтезу білка.
52. Що таке активація амінокислот і місце її локалізації?
53. Які компоненти клітин беруть участь у біосинтезі білка?
54. Що таке адаптори?
55. Що таке рибосома?
56. Як відбувається ініціація поліпептидного ланцюга?
57. Що таке ініціюючий комплекс?
58. Стадії формування ініціюючого комплексу.
59. В чому полягає процес елонгації?
60. Що таке транслокація?
61. Що таке термінація?
62. Що таке процесинг поліпептидного ланцюга?
63. Як відбувається упаковка і процесинг поліпептидного ланцюга?
64. Назвіть основні чинники, що впливають на упаковку і процесинг поліпептидного ланцюга.
65. Назвіть шляхи регуляції синтезу білка.
66. Назвіть молекулярні і генетичні механізми регуляції швидкості білкового синтезу в прокариот.
67. Яка роль індукторів і механізм їх дії?
68. Які практичні проблеми сільськогосподарського виробництва можна вирішити і вже вирішуються за допомогою методів генетичної інженерії?
69. Що було підґрунтям становлення технології одержання рекомбінантних ДНК і клонування генів?
70. Що таке рекомбінантна ДНК?
71. Яка роль рестрикційних ендонуклеаз у технології одержання рекомбінантних ДНК?
72. Як слід розуміти поняття «експресія гена»?
73. Які особливості експресії генів ссавців?
74. Механізм експресії гена.

75. Регулювання експресії гена.
76. Особливості будови ДНК-векторів.
77. Які вектори переважно використовуються для перенесення генетичної інформації?
78. Що таке інтрони?
79. Що являють собою транспозони?
80. У чому полягає роль транспозонів?
81. Механізм переміщення транспозонів у геномі.
82. У якій послідовності здійснюється конструювання рекомбінантної ДНК?
83. Якими методами досягається з'єднання молекул ДНК?
84. Як здійснюється з'єднання фрагментів ДНК і ДНК-вектора?
85. Які є ферменти рестрикції?
86. Які послідовності нуклеотидів гідролізують рестриктази? Наведіть приклади.
87. Назвіть етапи клонування молекул рекомбінантної ДНК.
88. Що таке клон?
89. Як проводиться ідентифікація клонів?
90. За якою ознакою проводиться ідентифікація клонів?
91. Що є основою для відбору клонів?
92. Як проводиться відбір клонів?
93. Які біохімічні реакції відбуваються в процесі дозрівання інформаційної РНК?
94. Що означає зворотна транскриптаза та які властивості цієї сполуки?
95. Яка роль ферменту зворотної транскриптази у генній інженерії?
96. Чи є в генах-копіях інтрони?
97. Що являють собою «генні машини»?
98. З якою метою використовуються «генні машини»?
99. Механізм функціонування «генної машини».

100. У чому полягає особливість експресії еукаріотичного гена у чужорідному оточенні прокаріотичної клітини?
101. Які етапи включає експресія структурних генів?
102. Які функції промотору?
103. Що таке репресор та ген-регулятор?
104. Якими методами можна досягти підвищення ефективності експресії генів?
105. Як досягається збільшення кількості продуктів, синтез яких контролюється певними генами?
106. Де використовуються мікроорганізми, що містять рекомбінантні молекули ДНК?
107. Яке значення має біотехнологія конструювання рекомбінантних молекул ДНК та клонування генів для фундаментальних досліджень?
108. Значення біотехнології конструювання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів для розв'язання господарських питань.
109. Які проблеми виникають при використанні методів генної інженерії?
110. Які є об'єктивні підходи оцінки екологічної чистоти і безпечності продукції, одержаної методами генної інженерії.
111. Назвіть основні етапи ДНК-технологій.
112. Де застосовують сучасні ДНК-технології?
113. Які існують методи аналізу ДНК?
114. Дати визначення процесам рестрикції, гібридизації та ампліфікації.
115. На якому принципі базується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)?
116. Який процес покладено в основу методу ПЛР?
117. Назвіть стадії реплікації ДНК.
118. Які компоненти необхідні для проведення ампліфікації?



119. З яких циклів складається ПЛР-аналіз?
120. За допомогою якого методу відбувається детекція, або виявлення, ампліфікованої ДНК?
121. Вимоги до лабораторій ПЛР.
122. Яка мета проведення постановки контрольних проб при проведенні ПЛР?
123. Як за допомогою методу ПЛР визначають видову належність м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів?
124. Використання ПЛР у тваринництві.
125. Використання ПЛР у харчовій промисловості.
126. Використання ПЛР у ветеринарній медицині.

## Тестові питання з курсу “Генетична інженерія”

1. Генетична інженерія – це:

- а) розділ молекулярної генетики, що ґрунтується на вивченні генома;
- б) розділ молекулярної біології, що ґрунтується на розробці біотехнологічних прийомів спрямованого синтезу нових, таких, що не існують у природі, поєднань генів;
- в) розділ молекулярної генетики, що ґрунтується на вивченні структури генів.

2. Ген – це:

- а) ядерна ДНК;
- б) частина молекули РНК;
- в) ділянка ДНК, що кодує структуру одного або кількох поліпептидних або поліпептидних ланцюгів.

3. Геном – це:

- а) сукупність усіх генів або хромосом клітин чи організму;
- б) сукупність структурних генів;
- в) гени, які кодують біосинтез тільки поліпептидних ланцюгів.

4. Гетерокаріон – це:

- а) без'ядерна клітина;
- б) багатоядерна клітина, яка містить ядра не менше як двох різних типів;
- в) одноядерна клітина, яка утворилася при злитті не менше двох ядер.

5. Комплементарна ДНК – це:

- а) макромолекула, утворена під час сполучення генів у новій комбінації;
- б) штучносинтезована ДНК, за допомогою ревертази і ДНК-полімерази, копія і-РНК;
- в) штучно створена гібридна молекула ДНК, яка не має аналогів у природі.

6. Рекомбінанта ДНК – це:

- а) ДНК, яку одержують внаслідок обміну генетичним матеріалом між двома молекулами ДНК;
- б) одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотньої транскрипції;
- в) позахромосомна молекула ДНК.

7. Бактеріофаг - це:

- а) вірус, який здатний до реплікації в бактеріях;
- б) фактор, який викликає кон'югацію бактерії;
- в) плазміда, що використовується в генетичній інженерії для одержання рекомбінантних ДНК.

8. В одержанні рекомбінантної ДНК використовуються як вектор:

- а) білок, який інгібує транскрипцію;
- б) бактеріофаг  $\lambda$ ;
- в) мієломні клітини.

9. Вектор – молекула:

- а) іРНК, яка синтезується на одній із ниток ДНК;
- б) білка, який синтезується у відповідь на дію того чи іншого антигену;
- в) ДНК, яка здатна до автономної реплікації.

10. Реалізація генетичної інформації, закодованої в молекулі ДНК, шляхом транскрипції і трансляції називається:

- а) реплікація;
- б) експресія;
- в) трансдукція.

11. Оператор – це:

- а) молекула ДНК, здатна до автономної реплікації;
- б) регуляторна ділянка оперона, яка контролює включення і виключення транскрипції одного або декількох структурних генів за допомогою білка-репресора, який кодується геном-регулятором;
- в) ділянка гена, де РНК-полімераза припиняє свою роботу і відділяється від ДНК-матриці.

12. Білок, який інгібує транскрипцію одного або декількох генів, називається:

- а) репресор;
- б) індуктор;
- в) регулятор.

13. Синтез РНК на ДНК-матриці називається:

- а) трансдукцією;
- б) сплайсингом;
- в) транскрипцією.

14. Процес копіювання виділених або синтезованих генів чи генетичних структур у складі вектора називається:

- а) клонуванням генів;
- б) процесингом;
- в) термінацією.

15. Рестриктази – ферменти, які володіють високою специфічністю до нуклеотидної послідовності основ в:

- а) і-РНК;
- б) м-РНК;
- в) ДНК.

16. Нуклеотидна або амінокислотна послідовність в нуклеїнових кислотах або білках називається:

- а) сайт;
- б) алель;
- в) клон.

17. Оперон – одиниця транскрипції та регуляції, яка складається зі структурних і регуляторних генів та контролюючих елементів – присутній у:

- а) прокаріотичних організмах;
- б) еукаріотах;
- в) вірусах.

18. До ферментного арсеналу, на якому базуються маніпуляції генетичної інженерії, відносяться:

- а) рестриктази, ліази, ДНК-полімерази;
- б) гідролази, трансферази, оксидоредуктази;

в) оксидоредуктази, гідролази.

19. Виділення окремих генів із природного матеріалу в складі невеликих фрагментів ДНК було здійснене вперше:

- а) в 1868 р. Мішер і Тонегава;
- б) в 1969 р. Беквітом і Шапхро;
- в) в 1973 р. Балтімором і Мізутамі.

20. Вперше здійснено хімічний синтез гена, який функціонував у живій клітині в 1976 році:

- а) під керівництвом А. Корнберга;
- б) під керівництвом Корани;
- в) під керівництвом Берга.

21. Трансдукція – це:

- а) перенос генетичного матеріалу із однієї клітини в іншу за допомогою вірусного вектора;
- б) біосинтез к-ДНК на м-РНК за допомогою ревертаз;
- в) подвоєння (реплікація) циркулярної позахромосомної молекули ДНК.

22. В даний час для ферментативного одержання гена використовують:

- а) зворотні транскриптази;
- б) рестриктази;
- в) ендонуклеази.

23. Промотор – регуляторна ділянка оперону, до якої приєднується:

- а) ДНК-ліаза;
- б) рестриктаза;
- в) ДНК-захисна-РНК-полімераза.

24. Термінатор – ділянка гена, де:

- а) РНК-полімераза починає діяти;
- б) РНК-полімераза припиняє роботу;
- в) канонічна послідовність ТАТААТГ, яка знаходиться на відстані біля 10 п. н. перед стартовою точкою бактеріальних генів.

25. Некодуючі нуклеотидні послідовності в структурних генах еукаріот називають:

- а) інтронами;
- б) екзонами;
- в) індукторами.

26. Кодуючі нуклеотидні послідовності в структурних генах еукаріот, які видаляються із пре-РНК ферментативним шляхом у процесі сплайсингу, називаються:

- а) індукторами ;
- б) інтронами;
- в) екзонами.

27. Процес посттранскрипційного ферментативного процесу видалення з первинного РНК-транскрипту інтронів з наступним об'єднанням екзонів називається:

- а) сплайсингом;
- б) ампліфікацією;
- в) делецією.

28. Обмін генетичним матеріалом між двома вихідними молекулами ДНК називають:

- а) гібридизацією;
- б) рекомбінацією;
- в) репарацією.

29. Химерна ДНК – це:

- а) дві копії однієї й тієї ж послідовності ДНК в складі однієї молекули і знаходяться в протилежних орієнтаціях;
- б) одноланцюгова ДНК, синтезована *in vitro* шляхом зворотної транскрипції;
- в) штучно створена гібридна молекула ДНК, яка не має аналогів в природі.

30. Лінкерний метод одержання рекомбінантної ДНК – це:

- а) процес хімічного синтезу невеликих нуклеотидних ланцюгів, що виконують функцію зв'язку окремих полінуклеотидних фрагментів;

б) перехід молекули ДНК із дволанцюгової форми в одноланцюгову;

в) реасоціація денатурованих комплементарних ланцюгів ДНК з утворенням дволанцюгової молекули.

31. Плазміда - це:

а) будь-який окремих фрагмент гена;

б) кільцева молекула ДНК, здатна до стабільного, незв'язаного з хромосомами існування й автономної реплікації;

в) ділянка ДНК між сайтами ініціації та термінації РНК-полімерази.

32. Якщо позахромосомна молекула ДНК здатна включатися в хромосому й утворювати ковалентно зв'язану структуру, то вона називається:

а) плазмідною;

б) епісомною;

в) космідною.

33. Ділянка плазміди, що містить регуляторні елементи, які забезпечують процес незалежної реплікації, називається:

а) репліконом;

б) транспозоном;

в) паліндромом.

34. Мутація – це:

а) заміна нуклеотидів після їх початкового включення в полінуклеотидний ланцюг;

б) будь-які зміни в послідовності ДНК;

в) створення гібридної молекули ДНК, яка не має аналогів у природі.

35. Алель – це:

а) різноманітність генів;

б) однорідність генів;

в) одна із двох (чи декількох) альтернативних форм гена.

36. Амбер-кодон – це триплет:

а) УАГ;

б) УГА;

в) УАА.

37. Капсид – це:

а) внутрішня білкова оболонка вірусної частинки;

б) зовнішня білкова оболонка вірусної частинки;

в) ліпоїдна оболонка вірусної частинки.

38. Охра-кодон - це триплет:

а) УАА;

б) УГА;

в) УАГ.

39. Трансляція – це:

а) процес синтезу м-РНК;

б) дозрівання м-РНК;

в) процес синтезу білка на м-РНК.



## СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

**Азотисті основи** – хімічні сполуки, які входять до складу нуклеотидів нуклеїнових кислот та є похідними гетероциклічних азотовмісних сполук – пуринів і піримідинів.

**Активация амінокислот** – процес приєднання амінокислоти до транспортної РНК.

**Аміноацил-тРНК-синтетази** – група ферментів класу синтетаз, які каталізують сукупність реакцій, що забезпечують один із етапів білкового синтезу – специфічне з'єднання амінокислот з відповідними тРНК (рекогніція).

**Амінокислотна послідовність** – характеристика первинної структури білка.

**Аналіз рестрикційний** – визначення структури ДНК шляхом розщеплення її ферментами – рестриктазами.

**Антикодон** – ділянка транспортної РНК, яка складається із трьох залишків нуклеотидів.

**Бактеріофаг** – вірус бактерій, як правило, містить тільки ДНК або РНК, які оточені білковою оболонкою.

**Бактеріофаг  $\lambda$**  – вектор при конструюванні рекомбінантних ДНК.

**Безінтронний структурний ген** – ген, який не має інтронів.

**Білок-репресор** – білок, який здатний зв'язуватися із оператором на ДНК чи РНК, запобігаючи відповідно транскрипції або трансляції.

**Вектор** – молекула ДНК, що має здатність до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку можна ввести додатковий фрагмент чужорідної ДНК і надалі забезпечити його реплікацію.

**Вектор для клонування** – будь-яка плазміда або фаг, в яких може бути вбудована чужорідна ДНК з метою клонування.

**Ген** – ділянка хромосоми (молекула ДНК), яка кодує структуру одного або кількох поліпептидних ланцюгів, чи молекул РНК.

**Ген регуляторний** – ген, продукт якого бере участь в регуляції експресії іншого гена.

**Ген структурний** – ген, який кодує РНК і білки.

**Генетична інженерія** – розділ молекулярної біології, який ґрунтується на розробці біотехнологічних прийомів спрямованого синтезу (конструювання) нових поєднань генів, що не існують в природі.

**Генетична карта** – схема, яка характеризує відносне розміщення структурних генів і регуляторних елементів у хромосомі.

**Генетичний код** – правила переведення послідовності нуклеотидів полінуклеотидної структури в амінокислотну послідовність білка.

**Геном** – сукупність усіх генів або хромосом організму.

**Гістони** – білки, що утворюють з ДНК нуклеосомі – структурні одиниці хроматину в ядрах еукаріот.

**Денатурація** – процес порушення нативної конформації біологічних макромолекул у результаті розриву деяких зв'язків.

**ДНК-залежна гібридизація** – гібридизація ДНК з РНК за умов надлишку ДНК.

**ДНК-зв'язуючий білок** – тетрамер, що складається з чотирьох ідентичних поліпептидних ланцюгів із молекулярною масою 20000, бере участь у реплікації ДНК.

**ДНК-лігаза** – фермент, який “зшиває” полінуклеотиди, в результаті чого утворюється єдиний нуклеотид більшого розміру.

**ДНК рекомбінантна** – макромолекула, утворена під час з’єднання генів у новій комбінації.

**ДНК рекомбінантна реплікація** – процес, в результаті якого кожна гібридна молекула відтворює нащадків, ідентичних їй дочірніх молекул.

**ДНК сателітна** – багаторазово повторювані нетрансльовані ділянки у клітинах еукаріот.

**ДНК химерна** – штучно створена гібридна молекула ДНК, що не має аналогів у природі.

**Екзон** – ділянка структурного гена еукаріот. У процесі сплайсингу розділені інтронами екзони об’єднуються у зрілу іРНК.

**Експресія гена** – процес реалізації генетичної інформації, зосередженої в ДНК, через транскрипцію і трансляцію.

**Ендонуклеаза** – фермент, який гідролізує внутрішні фосфодиестерні зв’язки в нуклеотиді.

**Епісоми** – генетичні елементи, які можуть існувати в клітині незалежно від хромосоми або вбудовуватися в неї.

**Зворотна транскриптаза (ревертаза)** – фермент (кодований РНК-вмісними пухлинотворними ретровірусами), який забезпечує транскрибування вірусної РНК у комплементарні їм ланцюги ДНК.

**Ізоакцепторні тРНК** – молекули тРНК, відповідні одній і тій же амінокислоті.

**Ініціюючий кодон** – кодон АУГ у складі мРНК, що кодує метіонін (формілметіонін), з якого починається (ініціюється) синтез багатьох (можливо усіх) поліпептидних ланцюгів у прокариотів.

**Інсерція** – мутації, які можуть бути викликані хімічними мутагенами і забезпечують включення певних нуклеотидів у ДНК-бактеріофаги.

**Інтрон** – ділянка гена на структурі ДНК еукаріот, що не несе інформацію про структуру білка, який кодується цим геном.

**Кластери генів** – група генів із близькими функціями, розміщені в певних ділянках хромосом, інколи у вигляді повторень.

**Клонування ДНК** – фрагмент або ціла одноланцюгова молекула ДНК, виділена з геному будь-якого організму, вбудована в геном плазмиди, де відбувається її багаторазова реплікація, яка призводить до нагромадження клонованих ДНК.

**Кодон** – група із трьох суміжних нуклеотидів у молекулі мРНК, яка кодує одну із амінокислот або забезпечує кінець синтезу білка (термінуючий сигнал).

**Комплементарна ДНК, кДНК** – ДНК синтезована на мРНК з використанням специфічного ферменту – зворотної транскриптази.

**Комплементарність** – властивість нуклеотидів утворювати парні комплекси при взаємодії ланцюгів нуклеїнових кислот.

**Корекція** – виправлення помилок при реплікації, транскрипції або трансляції шляхом перевірки окремих мономерів після їх включення в ланцюг РНК, ДНК або білка.

**Косміда** – вектор, до складу якого входить COS-ділянка ДНК фага  $\lambda$ , що є місцем замикання лінійної структури і перетворення її в кільцеву.

**3'-кінець** – кінець полінуклеотиду, на якому розміщений нуклеотид з вільною ОН-групою у третьому вуглецевому атомі рибози або дезоксирибози.

**5'-кінець** – кінець полінуклеотиду, на якому розміщений нуклеотид з вільною ОН-групою п'ятого атома рибози або дезоксирибози; з 5'-кінця починається синтез полінуклеотидних ланцюгів у процесах реплікації, транскрипції і репарації.

**Липкий кінець** – вільний одноланцюговий кінець ДНК, комплементарний одноланцюговому кінцеві, що належить тій самій або іншій молекулі ДНК.

**Лігаза** – фермент, який усуває розриви в молекулі ДНК утворенням ковалентних зв'язків між 5'- і 3'-кільцями.

**Лідерна (сигнальна послідовність)** - 5'-кільцева послідовність поліпептидної структури, яка забезпечує проникнення екскреторної молекули крізь мембрану, а потім відщеплюється.

**Лінкерна ділянка** – ділянка ДНК, розміщена між нуклеосомними частинами довжиною в середньому в 60 нуклеотидів.

**Лінкер** – синтетичний олігонуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка найчастіше використовується для розпізнання відповідною рестрикційною ендонуклеазою (рестриктазою).

**Мажорні мРНК** – мРНК, які знаходяться в клітині у великій кількості копій.

**Матриця** – одноланцюгова ДНК, яка комплементарна ланцюговій РНК або ДНК, що синтезується.

**Матрична РНК** – молекула РНК, яка має інформацію про послідовність амінокислот у білку, що синтезується.

**Мігруючі елементи ДНК** – ділянки ДНК прокариотів, які за певних умов можуть транслокуватися з одних частин геному в інші.

**Мобільно-дисперговані гени** – ділянка ДНК еукаріот, які за структурою і функціями подібні до мігруючих елементів прокариотів (IS-елементи, транспозони).

**Мовчазні генні сайти** – такі точки в гені, мутації в яких не викликають зміни продукту.

**Модифікація РНК або ДНК** – зміни нуклеотидів після їх попереднього включення в полінуклеотидний ланцюг.

**Нонсенс-кодон** – кодон, який є сигналом закінчення синтезу поліпептидного ланцюга.

**Нуклеоїд** – ДНК-вмісна зона прокариотів, аналог ядерній зоні еукаріот.

**Нуклеосома** – основна структурна одиниця хроматину, яка складається з ДНК і гістонових білків.

**Нуклеотид** – трикомпонентна сполука, яка складається з азотистої основи пуринового чи піримідинового ряду, залишку рибози чи дезоксирибози та фосфату.

**Оператор** – ділянка ДНК, при взаємодії якої з білком-репресором регулюється експресія гена або групи генів на рівні транскрипції.

**Оперон** – одиниця генетичної експресії, до складу якої входять один або кілька зв'язаних між собою структурних генів, а також їхні промоторні, операторні та регуляторні ділянки, які контролюють транскрипцію оперона.

**Паліндроми** – ділянки первинної структури ДНК, в яких мононуклеотидні ланки полінуклеотидних ланцюгів повторюються у зворотному напрямку.

**Періодичність ДНК** – число пар основ, що припадає на один виток спіральної молекули ДНК.

**Плазміда (гібридна, рекомбінована)** – кільцева молекула, яка містить один або декілька фрагментів чужорідної ДНК.

**Плазміда (епісома)** – невелика кільцева молекула ДНК, здатна до стабільного, не зв'язаного з хромосомами існування й автономної реплікації.

**Полісома** – комплекс з 5-100 рибосом, зв'язаний з однією молекулою іРНК (вільні полісоми) або з мембранами ендоплазматичного ретикулу (мембранно зв'язані полісоми).

**Праймер** – затравка, необхідна для початку синтезу ДНК. Він є затравочним ланцюгом РНК на структурі односторонньої матриці і забезпечує ініціацію синтезу ДНК за участю ДНК-полімерази III.

**Промотор** – специфічна ділянка ДНК, яка виконує регуляторну функцію в результаті приєднання РНК-полімерази, що ініціює транскрипцію РНК.

**Профаг** – ДНК бактеріофага, вбудована в хромосому бактерії.

**Процесинг** – сукупність ферментних реакцій, що каталізують перетворення первинних продуктів транскрипції і трансляції в функціонально повноцінні молекули.

**Рекомбінантна ДНК** – ділянки ДНК одного чи різних організмів, що об'єднуються за допомогою відповідних ферментів.

**Рекомбінантна РНК** – штучно змінена молекула РНК, яка включає нові сполучення послідовностей нуклеотидів, для відтворення яких може бути використаний як вектор геном РНК-фага.

**Рекомбінація (кресинговер)** – явище, при якому гени однієї групи зчеплення утворюють нові комбінації з генами гомологічних груп зчеплення.

**Репарація ДНК** – відновлення початкової будови ДНК, заповнення пошкодженої ділянки відповідними нуклеотидами.

**Реплікатор** – ділянка ДНК, з якої починається процес її реплікації.

**Реплікаційна вилка** – точка, в якій ланцюги батьківської дволанцюгової ДНК розходяться для того, щоби змогла відбутися реплікація.

**Реплікаційне очко** – зона ДНК, яка реплікується всередині протяжного нереплікуючого району.

**Реплікація ДНК** – біосинтез дочірніх ланцюгів ДНК на вихідній матриці, що забезпечує точне відтворення генетичної інформації.

**Реплікони** – ділянка ДНК, що містить регуляторні елементи, які забезпечують процес незалежної реплікації.

**Реплікуюча ділянка** – ділянка ДНК (реплікон), де проходить процес реплікації в певний момент часу.

**Репресія** – пригнічення активності гена, яке найчастіше зумовлюється блокуванням транскрипції.

**Репресор** – білок, здатний взаємодіяти з регуляторною послідовністю (оператором) гена і блокувати його транскрипцію.

**Рестрикційні ендонуклеази (рестриктази)** – ферменти, які розпізнають специфічні нуклеотидні послідовності, довжина яких 4-7 нуклеотидних пар і спричиняють розщеплення обох ланцюгів ДНК у сайтах, що мають симетрію другого порядку відносно центру.

**Рестрикція** – процес розщеплення чужорідної молекули ДНК під дією специфічних бактеріальних ферментів-рестриктаз.

**Рестрикційний аналіз** – дослідження певинної структури ДНК за участю ферментів рестриктаз.

**Ретровіруси** – РНК-вмісні віруси, які кодують РНК-залежну ДНК-полімеразу.

**РНК векторна** – низькомолекулярна ядерна РНК, яка виконує роль регулятора процесів транскрипції.



**РНК-затравка (праймер)** – короткий (довжина 10-60 нуклеотидів) фрагмент РНК, синтезований РНК-полімеразою на матриці батьківської ДНК.

**РНК-полімерази** – ферменти, що синтезують РНК (мРНК, тРНК, рРНК і РНК інших класів) на матриці ДНК.

**гяРНК або гетерогенна ядерна РНК** – полінуклеотидна структура (первинний транскрипт), яка за розмірами переважає іРНК у 10-20 разів і є її попередником.

**мРНК** – інформаційна (матрична) РНК, яка є матрицею при синтезі білка на рибосомі.

**рРНК** – рибосомальна РНК – компонент рибосом, необхідний для підтримання їх структури та функціонування.

**тРНК** – транспортна РНК, що бере участь у синтезі білка.

**Р-Петля** – структура, яка утворюється при гібридизації РНК з комплементарним ланцюгом дволанцюгової ДНК.

**Сайт** – найменша ділянка гена, що здатна незалежно від інших ділянок мутувати і рекомбінувати.

**Сайт-ділянка** – нуклеотидна або амінокислотна послідовність у нуклеїновій кислоті чи білку.

**Сайти заміщення** – сайти в гені, мутації в яких призводять до зміни кодової амінокислоти.

**Секвенування** – визначення нуклеотидної послідовності ДНК і РНК.

**Спейсер** – ділянка ДНК, що не транскрибується, довжина і нуклеотидна послідовність якої змінюється в широких межах.

**Сплайсинг** – процесинг РНК, який є посттрансляційним ферментним процесом видалення з первинного РНК-транскрипту інтронів з наступним з'єднанням ділянок РНК (екзонів).

**Стартова точка (ініціюючий сайт)** – означає ділянку ДНК, яка відповідає першій основі, що включається в РНК.

**ТАТА-послідовність** – семичленна послідовність, розміщена на віддалі 25 п.н. перед стартовою точкою кожної транскрипційної одиниці, транскрибована РНК-полімеразою II.

**Трансдукція** – перенесення генетичного матеріалу з однієї клітини в іншу за допомогою вірусного вектора.

**Транскрипт** – молекула РНК, що утворюється в процесі транскрипції.

**Транскрипція** – матричний синтез РНК на ДНК, який здійснюється ферментами РНК-полімеразами.

**Транскрипція зворотна** – перенесення (переписування) генетичної інформації з РНК на ДНК.

**Трансляція** – синтез білка на матриці іРНК, що відбувається в рибосомах.

**Транспозиція** – переміщення гена або групи генів з одного місця геному в інше.

**Транспозон** – фрагмент ДНК, що включає ген стійкості проти певної хімічної речовини.

**Триплет** – комбінація трьох нуклеотидів іРНК, що кодує включення певних амінокислотних залишків до складу білкової молекули.

**Термінуючий кодон** – кодон, який визначає закінчення синтезу поліпептидного ланцюга – УАА, УАГ, УГА.

**Фактори елонгації** – білки, які циклічно асоціюють з рибосомою відповідно з включенням кожної нової амінокислоти в поліпептидний ланцюг.

**Фактори звільнення (термінації)** – білкові фактори бактерій та еукаріот, які беруть участь в термінації трансляції на рибосомах.

**Фактори ініціації** – білкові молекули, які зв'язуються з малою (30S) субчастиною рибосоми і необхідні для здійснення ініціації білкового синтезу.

**Фактори Г** – білкові фактори елонгації трансляції, які забезпечують приєднання аміноацил-тРНК до рибосоми.

**Фактори транскрипції** – допоміжні білки, які допомагають РНК-полімеразам проходити основні етапи транскрипції.

**Ферменти рестрикції** – ферменти, які впізнають короткі послідовності, як правило, в неметильованій ДНК і розщеплюють її.

**Фізіологічне картування** – визначення положення в хромосомі генів або фрагментів ДНК.

**Форми ДНК** – різноманітні впорядковані види просторової будови ДНК, які утворюються залежно від умов виділення.

**Цистрон** – ділянка ДНК, в якій закодована інформація про структуру одного поліпептидного ланцюга.

**Часткова денатурація** – неповна денатурація подвійної спіралі ДНК за даної температури.

## **Окремі знаменні дати у розвитку генетичної інженерії**

- 1828 - Сформульований закон зародкової подібності (К. Бер)
- 1831 - Відкрите клітинне ядро (Р. Броун)
- 1839 - Сформульована клітинна теорія (Т. Шванн, М. Шлейден)
- 1858 - Сформульоване положення «Кожна клітина з клітини» (Р. Вірхов)
- 1858 – Виділений гуанін (А. Штрекером)
- 1864 - Сформульований біогенетичний закон (Е. Геккель, Ф. Мюллер)
- 1868 - Відкриті нуклеїнові кислоти (Ф. Мішер)
- 1871 - Встановлено, що білки складаються з амінокислот (М. Любавін)
- 1873 - Відкриті хромосоми (Ф. Шнейдер)
- 1875 - Описаний процес запліднення як з'єднання двох клітин (О. Гертвіг)
- 1878 - Відкрите мітотичне ділення тваринних клітин (В. Флемінг, П. Перемежко)
- 1882 - Відкритий мейоз у тваринних клітин (В. Флемінг)
- 1883 - Показано, що в статевих клітинах число хромосом у два рази менше, ніж у соматичних (Е. ван Бенеден)
- 1888 - Відкритий мейоз у рослинних клітин (Е. Страсбургер)
- 1889 - Отримані чисті нуклеїнові кислоти (Р. Альтман)
- 1891 - Встановлено, що білки складаються з амінокислот
- 1894 – Виділено вуглеводний компонент (D-рибозу) нуклеїнових кислот (Р. Левін)
- 1901-1903 - Створення мутаційної теорії (Г. де Фріз)

- 1902 - 1907 - Висловлене припущення, що гени розташовані в хромосомах незалежно один від одного (У. Сеттон, Т. Бовері)
- 1906 - Почате використання дрозофіли в якості моделі у генетичних експериментах
- 1908 - Сформульований закон розподілення алейних генів у популяціях (Г. Харді, В. Вайнберг)
- 1910 – Виділені азотисті основи, що входили до складу нуклеїну (Коссел)
- 1914 – Запроваджений метод фарбування тимусної нуклеїнової кислоти (Фельген)
- 1915- Описані бактеріофаги (Ф. Туорт)
- 1931 - Сконструйований електронний мікроскоп (Е. Руске, М. Кноль)
- 1940 – Опубліковані дані про принцип комплементарності живих молекул (М. Дельбрюк, Л. Полінг)
- 1941 - Експериментально доведено, що синтез факторів росту контролюється генами (Д. Білл, Е. Татум)
- 1944 - Доведена генетична роль ДНК (О. Евері, С. Маклеод, М. Маккарті)
- 1946 - Відкрита система рекомбінацій у бактерій (Д. Ледерберг, Е. Татум)
- 1952 - Остаточо доведена генетична роль ДНК (А. Херши, М. Чейз)
- 1952 - Відкриті мігруючі генетичні елементи рослинних клітин (В. Мак-Клинток)
- 1952 - Досліджено на сальмонелі явище генетичної трансдукції, тобто перенос генетичного матеріалу за допомогою бактеріофага (Ціндер, Лідерверг)
- 1953 - Сформульовані уявлення і створена модель структури

ДНК (Дж. Уотсон, Ф. Крік)

1954 - Сформульована ідея про триплетність генетичного коду (Г. Гамов)

1955 - Відкриті рибосоми (Дж. Палладе)

1956 - Установлено, що диплоїдний набір хромосом людини містить 46 хромосом (Тіо, Леван)

1958 – Виникнення теорії “один ген – один фермент” (Бідл, Теймур)

1961 – Вдалося прочитати перші три “букви” генетичного коду: ААА для амінокислоти фенілаланіну (М. Ніренберг)

1961-1964 - Встановлені основні властивості генетичного коду (С. Бреннер, Ф. Крік, Л. Барнет, Р. Уотс-Тобін)

1961 - Визначення генетичного коду білків (Ф. Крік)

1961 Регуляція білкового синтезу в прокариот на прикладі лактозного оперона *E. coli* (Ф. Жакобу, Ж. Моно)

1961 - Розробка методу одержання безклітинної системи *E.coli*, який забезпечує синтез білка на іРНК, виділеної із різних клітин (Х.Маттеї, М.Ніренберг)

1961 – Описано явище ренатурації ДНК (Мармур, Доті)

1962 - Сформульовані уявлення про регуляцію активності генів спеціальними генами-операторами (Ф. Жакобу, Ж. Моно)

1964 - Відкриті транспозуючі (переміщувані) генетичні елементи мікроорганізмів (Е. Кондо, С. Мітсухаши)

1965 – Присуджена Нобелівська премія за дослідження генетичної регуляції синтезу ферментів (Ф.Жакобу і Ж.Моно)

- 1965 - Відкриття Рес мутантів *E.coli*, що нездатні до генетичної рекомбінації (А.Кларк)
- 1966 – Розшифрований генетичний код (М.Ніренберг, Очоа, Х.Корана)
- 1967 - Розшифрована послідовність нуклеотидів тРНК (О. Баєв)
- 1967 - Проведено штучний синтез генетичної речовини вірусу інфекційної ДНК (Ф.Корнберг, М.Джуліан)
- 1967 – Відкрита ДНК-лігаза – фермент, що використовується для зшивання ДНК. (Гіллерт)
- 1968 - Здійснений хімічний синтез гена (Х. Корана)
- 1969 - Створений “словник” генетичного коду для амінокислот (М.Ніренберг)
- 1969 - Виділення генів групи лактозного оперону (Дж. Шапіро, Дж. Беквіт)
- 1969 – Виділений перший ген з кишкової палички (Дж. Беквіт)
- 1970 - Відкрита обернена транскрипція (Х. Темін, Д. Балтіморе)
- 1970 – Відкриття рестриктаз (В. Арбер)
- 1970 - Здійснено синтез структурного гена (Г. Корана)
- 1972 - Отримана перша рекомбінантна ДНК (П. Берг)
- 1972 – Досліджена регуляторна система, що визначає кількість копій плазміди *E.coli* (Нордстремом)
- 1972-1973 – Розроблена технологія клонування ДНК (Бойєр, Коен, Берг)
- 1973 – Перенесення гену з одного організму в інший (Коен, Бойєр)
- 1974 - Були сконструйовані перші фагові вектори з використанням різних делецій (А. Рамбахом, П.Тіоле)

1976 - Були виділені специфічні гени із застосуванням гібридизації ДНК-РНК при введенні в середовище молекул РНК (Томас).

1977 - Висунута гіпотеза, що в геномній ДНК, з якою транскрибується іРНК овальбуміну, містяться ділянки, які відсутні в інформаційній РНК (Шабон, Бретнах)

1979 – Встановлено, що клітини прокариот і еукаріот ДНК мають систему захисту, що залежить від активності рестрикції і їх модифікації (Модриха, Ханавольта)

1979 - Нормальне функціонування штучно синтезованого гена (Г. Корана)

1980 - Одержання трансгенних тварин (Дж.Гордон).

1981 - Типова бактерія містить біля  $10^{-11}$  мг ДНК (Г. Стент і Р.Келіндаром)

1982 - Показана можливість зміни фенотипу ссавців за допомогою рекомбінантних молекул ДНК (Р. Полмітер, Р. Бринстер)

1982 - Приведені дані, що білки-коліцини кодуються лише цим типом плазмід (П. Брода)

1983 - Частка геному для структурних генів у деяких організмів еукаріот складає лише 2-10% від всієї кількості ДНК (А. Нейфах, К. Газарян)

1985 - Одержання трансгенних кролів (Р.Хамер)

1986 – Узагальнення основних біологічних і фізичних характеристик типів бактеріальних векторів (В. Рибчин)

1987 – Розщеплення молекули ДНК за допомогою рестриктаз (Б.Льюїн)

1990 – Перший харчовий продукт, модифікований методом біотехнології (фермент, який застосували при виробництві сиру)



## ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Анализ генома. Методы.-М.: Мир, 1990. – 240 с.
2. Артамонов В.И. Биотехнология – агропромышленному комплексу.-М.: Наука, 1989.-160 с.
3. Белоус А.М., Годин В.П., Панков Е.Я. Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы.- М.: Медицина, 1976.-200 с.
4. Бердышев В.Г., Дуброва Ю.Е., Карпенчук К.Г. Строение, функции и эволюция генов.-К.: Наукова думка, 1980.-216 с.
5. Бердышев В.Г., Коваленко С.П. Код спадковості.-К.: Наукова думка, 1969.-449 с.
6. Гале Е.Ф., Кундлифле Е.К. Молекулярные основы антибиотиков.-М.: Мир, 1975.-500 с.
7. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І.та ін. Біотехнологія /Підручник.-К.:Інкос, 2006.- С. 126-177.
8. Генетические функции органоидов цитоплазмы. Под ред. С.А.Нейфага.-Л.: Наука, 1974.-196 с.
9. Георгиев Г.П. О структуре единиц транскрипции в клетках эукариот/ Успехи биологической химии.-1973.- Т.14.-С.3-46.
10. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология.- М.: Мир, 2002.- 312 с.
11. Гюнтер Э и др. Основы общей биологии.-М.: Мир, 1982. - 407 с.
12. Дебобов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов.- М.: Высшая школа, 1988.- 206 с.
13. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий.-М.: Мир, 1984.- 176 с.
14. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот.- М.: Мир, 1976.- 412 с.

15. Дымшиц Г.М. Сюрпризы митохондриального генома // Природа.- 2002.-№ 6.- С.54-61.
16. Елинов Н.П. Основы биотехнологии.- СПб.: Наука, 1995.- 599 с.
17. Завертяев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота.- Л.: Агропромиздат, 1989.- 252 с.
18. Зеленин А.В. Генная терапия на границе третьего тысячелетия//Вестник РАН.-2001.-Т.71, №5.-С.№387-395.
19. Кендрю Дж. Нить жизни.-М.:Мир, 1968.-121 с.
20. Киселев Л.Л. Геном человека и биология XXI века// Вестник РАН.-2000.-Т.70, №5. – С.412-424.
21. Кориберг А. Синтез ДНК.-М.: Мир, 1976 – 380 с.
22. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран.-К.:Наукова думка, 1990.-176 с.
23. Культура живых клеток. Методы. Под.ред.Р.Френш.- М.:Мир, 1969.-331 с.
24. Льюин Б. Гены.- М.: Мир, 1986 – 620 с.
25. Манделес С. Установление первичной структуры нуклеиновых кислот.-М.:Мир, 1975.-319 с.
26. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.- М.: Мир, 1984.- 48 с.
27. Мирский А., Боннер Дж., Опфри В. Гистоны и перенос генетической информации.-М.:Мир, 1968.-143 с.
28. Ніколайчук В.І., Горбатенко І.Ю. Генетична інженерія.- Ужгород, 1999.- 101 с.
29. Нуклеиновые кислоты. Под.ред. Е.Чаргаффа и Дж.Дэвидсона.-М.:Иностр.литература, 1962.-455 с.
30. Печуркин Н.С. Популярные аспекты биотехнологии.- М.: Медицина, 1996.- 236 с.
31. Рекомбинантные молекулы: задачи для науки и практики. Под.ред.Р.Бирса.-М.:Мир, 1980.-624 с.

32. Рогаев Е.И., Боринская С.А. Гены и поведение// Химия и жизнь.- 2000.-№3.- С.20-25.
33. Россіхін В.В. Біотехнологія: вступ у науку майбутнього. – Харків: Колорит, 2005.-280 с.
34. СассоА. Биотехнология: свершения и надежды.- М.:Мир, 1987.-410 с.
35. Davic K. Cracking the Genome.- N.Y.: The Free Press, 2001
36. Lander E.S. et all. Initial Sequencing and Analysis of the Humen Genome//Natyre.–2001.-Vol. 39, N 6822.-P.860-921.
37. Venter J.C. et all. The Sequence of Humen Genome // Science.- 2001.- Vol. 291, N 5507.- P.1304-1351.

## ЗМІСТ

Вступ	3
I. Теоретичні (молекулярно-біологічні) основи генетичної інженерії	5
1.1. Фундаментальні дослідження структури і функції ДНК	5
1.2. Біосинтез білка	32
1.2.1. Генетичний код	33
1.2.2. Етапи трансляції (біосинтезу білка)	41
II. Біотехнологічні засоби генетичної інженерії	64
2.1. Загальна характеристика ферментів	64
2.2. Рестриктази, фактори модифікації та репарації. Генетичне картування	75
2.3. ДНК- і РНК-полімерази та пов'язані з ними процеси реплікації, транскрипції і трансляції	90
2.4. Зворотні транскриптази (ревертази)	106
III. Генетичні вектори	108
3.1. Плазміди	108
3.2. Фагові вектори	117
3.3. Косміди і ниткоподібні фаги	123
IV. Основні операції генетичної інженерії	128
4.1. Виділення генів із геному донора	128
4.2. Хімічний синтез генів	136
4.3. Одержання ДНК-копій на матриці РНК	137
4.4. Технологія рекомбінантних ДНК	140
4.5. Експресія чужорідних генів у мікроорганізмах	153
V. Одержання трансгенних тварин	165
5.1. Одержання трансгенних кролів	170
5.2. Одержання трансгенних овець	171
5.3. Одержання трансгенних свиней	172
5.4. Перенос чужорідних генів худобі	174
Контрольні запитання	180
Тестові питання з курсу “Генетична інженерія”	186

Словник термінів	193
Окремі знаменні дати у розвитку генетичної інженерії	204
Список використаної літератури	209
Зміст	212

*Навчальне видання*

**Кравців Роман Йосипович  
Колотницький Анатолій Гнатович  
Буцяк Василь Іванович**

**Генетична інженерія**