**Лабораторно-практична робота № 6**

***Молекулярні інструменти генетичної інженерії. Генетична рекомбінація. Генетична трансформація клітин. Способи одержання генномодифікованих промислових мікроорганізмів. Методи одержання трансгенних рослин. Способи одержання трансгенних тварин***

# 6.1. Тема: МОЛЕКУЛЯРНІ ІНСТРУМЕНТИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

***Мета:*** Описати ферменти, які використовуються в генно-інженерних дослідженнях і проєктах. Зазначити послідовності нуклеотидів для сайтів впізнавання деяких рестриктаз II.

Серед ферментів, що використовуються в генетичній інженерії для клонування, велике значення мають ендонуклеази рестрикції – ***рестриктази***. Ці ферменти, вперше відкриті як частина системи рестрикції-модифікації ДНК у бактерій, специфічно гідролізують молекули дволанцюгових ДНК за наявності в них певних послідовностей нуклеотидів, так званих *сайтів рестрикції*. У той же час метилази використовують для обмеження числа сайтів рестрикції і отримання більших фрагментів ДНК за допомогою рестриктаз.

Застосування рестриктаз значно полегшило роботу з рекомбінантними ДНК. Кожна з сотень відомих сьогодні рестриктаз розпізнає специфічну коротку (зазвичай довжиною 4 і 6 нуклеотидів) послідовність в дволанцюговій ДНК і розщеплює її тільки в цій ділянці. Використовуючи декілька рестриктаз, можна скласти детальну карту рестрикційних сайтів для будь-якого фрагмента ДНК завдовжки від декількох сотень до десятків тисяч нуклеотидів.

Створення фосфодіефірних зв’язків у одноланцюгових розривах дволанцюгової ДНК за допомогою ***ДНК-лігази***є разом з рестриктазами одним з найважливіших етапів отримання рекомбінантних ДНК in vitro. Найбільше застосування в генно-інженерних дослідженнях знаходить ДНК-лігаза бактеріофага Т4.

До ферментів матричного синтезу нуклеїнових кислот відносяться численні ***ДНК- і РНК-залежні ДНК- і РНК-полімерази*,** що здійснюють залежний від матричних ДНК або РНК синтез нуклеїнових кислот. Ці ферменти зазвичай використовуються в генетичній інженерії для отримання дволанцюгових молекул ДНК з одноланцюгових, а також для зворотної транскрипції, тобто синтезу дволанцюгових ДНК, комплементарних мРНК, які називають комплементарними ДНК (кДНК).

Незважаючи на високу ферментативну активність ДНК-полімераз, вони не здатні ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль виконують ***РНК-полімерази***. Фермент РНК-полімераза знаходить промотори, активує матрицю ДНК і відбувається локальне розплітання подвійної спіралі ДНК. Однак, основна роль РНК-полімераз полягає у каталізі процесу транскрипції (тобто створенні РНК на підставі ланцюгу ДНК).

***Зворотні транскриптази (РНК-залежні ДНК-полімерази)*** здатні здійснювати синтез ДНК на матриці РНК, за рахунок полімеризації чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, як це має місце у випадку ДНК-залежних ДНК-полімераз.

Важливими ферментами генної інженерії також є ***полінуклеотидкіназа, термінальна трансфераза, лужні фосфатази, нуклеази, екзонуклеази, панкреатична рибонуклеаза А, панкреатична дезоксирибонуклеаза І*.**

***Завдання 1.*** Охарактеризуйте ферменти рестрикції і модифікації нуклеїнових кислот: *рестриктази, номенклатура: сайт рестрикції, паліндром,*

*«липкі» кінці, «тупі» кінці, рестриктази ІІ, ізошизомери, ДНК-метилази.*



Стрілками позначені місця розривів ланцюгів ДНК, пунктирною лінією – вісь симетрії сайтів рестрикції

*Рис. 16.* **Форми розривів дволанцюгових ДНК, утворених рестриктазами**: 5’-виступаючі (1), 3’-виступаючі «липкі» (2) і «тупі» (3) кінці

ДНК, що утворюються під дією рестриктаз *BamHI*, *KpnI* і *PvuII* відповідно.

*Таблиця 9*

Характеристика сайтів впізнавання для деяких рестриктаз II тиац

Фермент Сайт впізнавання 1 2

Симетричні

Фермент

3 (*N*=6)

*Pst* I *Pvu* II *Sma* I *Sac* I *Sac* II *Sal* I *Xba* I

*Xho* I

Сайт впізнавання

4

*Bal* I *Bam* HI *Bcl* I *Bgl* II *Eco* RI *Hind* III *Hpa* I

*Kpn* I

*Продовження табл. 9*

1

2

3

4

Вироджені симетричні (*N*= 6)

*Acc* I *Hae* II

*Ava* I *Hgi* AI

*Hae* I *Hind* II

Симетричні

*Asu* I

*Ava* II

Симетричні

*Alu* I

*Hae* III

*Hha* I

(*N*=5)

*Eco* RII

*Hin* fI

(*N*=4)

*Hpa* II

*Mbo* I

*Taq* I

Симетричні метиловані (*N*= 4)

*Dpn* I *Msp* I

Асиметричні (*N*=5)

*Bbv* I *Hph* I

*Hga* I *Mbo* II

***Завдання 2.*** Надайте характеристику ДНК- і РНК-лігазам.

# *Рис. 17.* Механізм лігування ДНК Т4-ДНК-лігазою

***Завдання 3.*** Охарактеризуйте ферменти матричного синтезу ДНК і РНК:

*ДНК-залежні ДНК-полімерази*, *ДНК-залежні РНК-полімерази, РНК-залежні ДНК-полімерази.*

***Завдання 4.*** Опишіть наступні ферменти генної інженерії.:

*полінуклеотидкінази*, *термінальна трансфераза, лужні фосфатази, нуклеаза Bal 31, екзонуклеаза E.coli, екзонуклеаза фага λ, нуклеаза S1, панкреатична рибонуклеаза А, панкреатична дезоксирибонуклеаза І.*

30

***Питання для самоконтролю:***

1. *Охарактеризуйте ферменти рестрикції і модифікації нуклеїнових*

*кислот.*

1. *Надайте характеристику ДНК- і РНК-полімеразам.*
2. *Опишіть групу ферментів нуклеази.*
3. *Охарактеризуйте ДНК-метилази і лігази.*
4. *Надайте характеристику ревертазі і термінальній трансферазі.*

**6.2. Тема: ГЕНЕТИЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ**

***Мета:*** Оволодіти методами створення рекДНК та описати основні групи векторів, що використовуються при цьому.

***Рекомбінантні ДНК***– це ДНК, які створені поєднанням in vitro (у пробірці) двох або більше фрагментів ДНК, отриманих із різних біологічних джерел.

Певні фрагменти ДНК, у тому числі і фрагменти, що містять структурні гени, отримують із використанням ферментів рестрикції. Рестриктази можуть створювати фрагменти як з тупими, так й з липкими кінцями. Методи з’єднання фрагментів залежать від того, які кінці у фрагментів ДНК, що поєднуються.

***З’єднання за однойменними «липкими» кінцями***(рестриктазно-лігазний метод). Деякі рестриктази, наприклад Есо R1, розрізають дволанцюгову ДНК таким чином, що протилежні ланцюги розміщуються із зсувом один від одного на рівній відстані від центру сайта впізнавання. Ці комплементарні одна до одної ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок парування основ.

***Коннекторний метод з’єднання фрагментів ДНК***. Суть методу полягає у приєднанні до кінців одного з фрагментів ДНК одноланцюгового полінуклеотиду, наприклад, **полі-А (dА),** а до іншого – комплементарного до нього, наприклад, **полі-Т (dТ).** Процес приєднання ділянок полі-А і полі-Т здійснюється за допомогою ферменту – ***кінцевої трансферази***. Фрагменти, що добудовані таким чином потім змішують і обробляють ***ДНК-лігазою***. При цьому між фрагментами вбудовуються ділянки dА/dТ. Такі додаткові послідовності можуть впливати на функції молекул, що з’єднуються, і тому бажано для отримання рекомбінантних молекул ДНК використовувати «липкі» кінці, створені внаслідок дії рестриктаз.

***Лінкерний метод з’єднання фрагментів ДНК*.** У тому випадку, коли необхідно зшити фрагменти, що створені різними рестриктазами, які мають різні, тобто не комплементарні один до одного кінці, використовують так звані лінкери (або «перехідники»). **Лінкери** – хімічно синтезовані олігонуклеотиди, що являють собою сайти рестрикції або їх комбінацію. Існує велика кількість таких генних «перехідників». Часто усередину лінкеру розташовують який- небудь регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку пов’язану із рибосомою. В цьому випадку лінкери не лише забезпечують поєднання генів, але й зумовлюють їх експресію. Існують лінкери «тупий кінець – липкий кінець».

Гени, які можна отримати одним із вище описаних способів, містять інформацію про структуру білка, але самі по собі не здатні реалізувати цю інформацію. Для цього необхідні додаткові механізми, які керують експресією, тому перенесення генетичної інформації в клітину здійснюється у складі векторів. ***Векторами*** називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (переніс у інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткову генетичну інформацію. У наш час створено значну кількість векторів, які розрізняють за профілем їх використання на декілька типів.

***Завдання 1.*** Опишіть методи конструювання рекомбінантних ДНК: *рекомбінантні ДНК, рестриктазно-лігазний метод, конекторний метод, лінкерний метод.*



*Рис. 18.* **Схема з’єднання ділянок ДНК рестриктазно-лігазним методом**



# *Рис. 19.* Схема з’єднання ділянок ДНК конекторним методом



*Рис. 20.* **Схема з’єднання ділянок ДНК лінкерним методом**

***Завдання 2.*** Охарактеризуйте загальні особливості генетичних векторів:

*генетичний вектор; вимоги, що висувають до векторів*.

***Завдання 3.*** Опишіть біологічні властивості плазмідних векторів:

*плазміда, біологічні властивості бактеріальних плазмід*.

***Завдання 4.*** Заповніть таблицю та замалюйте генетичну карту для відповідних плазмідних векторів.

*Таблиця 10*

# Характеристика плазмід

Розмір

Господар Функція (т.п.о.)

pT181

ColEl

pGKL2

pAMpi pI258

pADP-1

pWW0 pX01

pSOL1



*Рис. 21.* **Генетична карта плазмідних векторів**

***Завдання 5.*** Охарактеризуйте наступні групи векторів: *вектори на основі хромосом вірусів, надємнісні вектори YAC, BAC, PAC; штучні хромосоми тварин і людини, інтегруючі вектори, бінарні вектори.*

***Питання для самоконтролю:***

1. *Що таке рекомбінантна ДНК? Яка послідовність її конструювання?*
2. *Якими методами досягається з’єднання молекул ДНК?*
3. *Генетичні вектори: поняття, класифікація, вимоги до них.*
4. *Властивості бактеріальних плазмід і їх використання у якості*

*векторів.*

1. *Особливості використання фагів у якості векторів.*
2. *Переваги використання штучних і гібридних векторів.*
3. *Застосування pPAC, pNAC, pBAC, pYAC у клонуванні ДНК.*
4. *Принципи використання вірусних векторів.*
5. *Що являють собою транспозони? Яка їх роль і механізми переміщення?*
6. *Виділення генів із геному донора.*
7. *Особливості введення рДНК у клітини.*

**6.3. Тема: Генетична трансформація клітин**

***Мета:*** Засвоїти методи переносу ДНК. Визначити суть компетентності бактеріальних і грибних клітин та методи її підвищення. Описати принципи і мету створення бібліотек ДНК, а також груп методів пошуку клонів у них.

***Трансформація*** – генетична модифікація клітини шляхом введення і подальшої експресії в ній чужорідного генетичного матеріалу (ДНК). Зараз це загальна лабораторна процедура в молекулярній біології.

***Трансдукція***(від лат. transductio – переміщення) – форма горизонтального перенесення генів, при якій передача генетичного матеріалу від однієї клітини до іншої відбувається за допомогою віруса (бактеріофага у випадку бактерій), що, як і у випадку інших форм горизонтального перенесення генів, призводить до зміни спадкових властивостей. Вірус, що переносить клітинну ДНК або РНК, називається трансдукційною частинкою. Розрізняють два види трансдукції: загальну (генералізовану), за якої може переноситись будь-яка ділянка геному клітини, та спеціалізована, під час якої завжди переноситься один і той самий набір генів.

***Бактеріальна кон’югація***– передача генетичного матеріалу між бактеріями через прямий міжклітинний контакт. Це один з механізмів горизонтального переносу генів, як і трансформація та трансдукція, хоча ці механізми не вимагають контакту між клітинами. Бактеріальна кон'югація відносно рідкісна серед бактерій, хоча і звичніша у панміктичних популяціях.

В бактеріях для опису процесів трансформації використовується термін ***компетентність***– стан, коли бактерії мають здатність приймати ДНК із зовнішнього середовища. Існують дві форми компетентності, природна і штучна.

***Природна компетентність.***Бактерії багатьох видів (можливо, більшості) природно здатні до прийняття ДНК. В стані компетентості бактерії виробляють особливий низькомолекулярний білок (фактор компетентності), що активує синтез автолізину, ендонуклеази і ряду факторів транскрипції. Автолізин частково руйнує клітинну стінку, що сприяє проникненню ДНК через неї, а також знижує чутливість бактерій до осмотичного шоку. В стані компетентності також знижується загальна інтенсивність метаболізму.

***Штучна компетентність***не кодується в генах клітин. Натомість, вона викликається лабораторними процедурами, в яких клітини пасивно робляться проникними для ДНК, використовуючи умови, які зазвичай не зустрічаються в природі. Ці процедури порівняно легкі і прості, і широко використовуються в молекулярній біології і генній інженерії бактерій. Штучно компетентні клітини стандартних бактеріальних штамів навіть виробляються комерційно, їх можна придбати замороженими і готовими для використання.

***Бібліотека ДНК* –** сукупність фрагментів ДНК певного біологічного об'єкту (хромосоми, типу клітин, тканини, пухлини, організму тощо), які вставлені у генетичні вектори і розмножені до великої кількості. Часто бібліотекою ДНК називають і колекцію мікроорганізмів (бактерій, дріжджів), у яких зберігаються ці генетичні вектори. Бібліотеки ДНК використовують для вивчення геномів і транскриптомів живих організмів, окремих їх частин, патологічно змінених тканин і органів.

***Завдання 1.*** Опишіть методи переносу спадкового матеріалу: *трансформація, трансфекція (транзиєнтна трансформація), кон’югація.*



*Рис. 22.* **Схема загальної трансдукції**



*Рис. 23.* **Схема бактеріальної кон’югації**

***Завдання 2.*** Опишіть механізми трансформації і способи підвищення її ефективності: *компетентність, природна компетентність, штучна компетентність, трансформація клітин грибів*.

***Завдання 3.*** Поясніть суть і мету створення бібліотек ДНК: *бібліотека ДНК, мета і суть створення бібліотеки ДНК, геномні бібліотеки, бібліотеки кДНК.*

***Завдання 4.*** Охарактеризуйте способи пошуку трансформованих клітин.

***Питання для самоконтролю:***

1. *Надайте характеристику наступним поняттям: трансформація, трансфекція, трансдукція, кон’югація.*
2. *Механізми трансформації і способи підвищення її ефективності.*
3. *Експресія чужорідних генів у мікроорганізмах.*
4. *Що таке банк генів і банк кДНК?*
5. *Методи скринінгу геномних бібліотек і клонотек.*

# 6.4. Тема: МЕТОДИКА СТВОРЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ ГОРМОНІВ

***Мета:*** Засвоїти особливості будови й функціонування інсуліну і соматотропіну. Визначити напрямки використання відповідних гормонів у медицині і тваринництві. Оволодіти методиками створення рекомбінантних гормонів.

***Інсулін*** (від лат. insula – острів) – гормон пептидної природи, що утворюється у бета-клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Впливає на багато аспектів обміну речовин практично у всіх тканинах. Основна дія інсуліну полягає в зниженні концентрації глюкози в крові.

Зазвичай підшлункова залоза великої рогатої худоби і свиней не використовується в м'ясній та консервній промисловості і поставляється на фармацевтичні підприємства, де проводять екстракцію гормону. Для отримання 100 г кристалічного інсуліну необхідно 800-1000 г вихідної сировини.

Роботи з генно-інженерного отримання інсуліну почалися близько 40 років тому. У 1978 році з'явилося повідомлення про отримання штаму кишкової палички, яка продукує щурячий проінсулін (США). У цьому ж році були синтезовані окремі ланцюга людського інсуліну за допомогою експресії їх синтетичних генів в клітинах *E.coli*:

1. Кожен з отриманих синтетичних генів підлаштовувався до 3'-кінця гена ферменту В-галактозидази і вводився у векторну плазміду – pBR322.
2. Клітини E.coli, трансформовані такими рекомбінантними плазмідами, виробляли гібридні (химерні) білки, що складаються з фрагмента В- галактозидази і А і В пептиду інсуліну, приєднаного до неї через залишок метіоніну.
3. Після обробки химерного білка бромцианом і протеолітичного відщеплення С-пептиду утворюється інсулін.

***Соматотропін***(СТГ, соматотропний гормон, соматропін, гормон росту)

– один з гормонів передньої долі гіпофіза. Відноситься до родини поліпептидних гормонів, у які входять також пролактин і плацентарний лактоген.

Оскільки ген гормону росту має складну структуру і містить інтрони, то процедура клонування починається з отримання кДНК на підставі мРНК за допомогою ***ревертази*.** Створюються гомогенні фрагменти ДНК довжиною 531 п.н., до яких потім ферментативним шляхом приєднують регуляторні елементи для забезпечення експресії цього рекомбінантного гена у клітині-реципієнті. На етапі створення кДНК можна за допомогою рестриктаз відокремити певні центри активності і в подальшому використовувати міні-гени гормону росту із спрямованої дією. Другий шлях полягає в тому, щоб зменшити зв’язування гормону з рецепторами тих клітин, стимуляція яких не бажана. Для цього в отриманих фрагментах кДНК здійснюють ***сайт-специфічний мутагенез***(мутацію в певних ділянках ДНК), внаслідок якого відбувається заміна одних амінокислот на інші, завдяки цьому високо специфічні рецептори певних клітин

40

не розпізнають гормон, зв’язування не відбувається і модифікований гормон росту зв’язується лише зі «своїм» рецептором. Генно-інженерний препарат має безперечні переваги: доступний у великих кількостях, гомогенний, не містить вірусів.

***Завдання 1.*** Надайте характеристику інсуліну: *інсулін, будова інсуліну та механізм його утворення, фізіологічна дія інсуліну, пов’язані з інсуліном захворювання*.



*Рис. 24.* **Будова зрілої молекули інсуліну**

***Завдання 2***. Опишіть методи створення рекомбінантного інсуліну: *метод перетворення інсуліну свині домашньої, метод хімічного синтезу інсуліну, метод створення рекомбінантного інсуліну*.

***Завдання 3.*** Охарактеризуйте соматотропін: *соматотропін, особливості дії соматотропіну*.

***Завдання 4.*** Опишіть методику створення генно-інженерного

соматотропіну.

***Питання для самоконтролю:***

1. *Характеристика інсуліну.*
2. *Методика одержання рекомбінантного інсуліну.*
3. *Характеристика соматотропіну.*
4. *Синтез і використання генно-інженерного соматотропіну.*
5. *Альтернативні способи регулювання синтезу гормону росту тварин.*

41

# 6.5. Тема: СТВОРЕННЯ ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛІННЯ

***Мета:*** Розглянути та засвоїти різні підходи щодо класифікації вакцин.

Вивчити методики створення генно-інженерних вакцин.

***Вакцина*** – це препарат, що складається з ослаблених або вбитих збудників хвороб, їх компонентів чи продуктів життєдіяльності, які застосовуються для створення активного імунітету у тварин і людей.

З урахуванням традиційного і сучасного підходів всі вакцини класифікують:

за спрямованістю застосування на протибактеріальні, протигрибкові, противірусні;

за здатністю розмножуватись (до реплікації) на живі та інактивовані;

за сировинними компонентами на корпускулярні, спліт-вакцини, субодиничні і вакцини з екзопродуктів (анатоксини).

за кількістю типів антигенів на моно-, полівалентні, асоційовані;

за видовою належністю вакцинного штаму на гомологічні і гетерологічні.

за способом отримання на генно-інженерні, хімічні та синтетичні.

***Живі (атенуйовані) вакцини***являють собою імунопрофілактичні препарати, які складаються зі спадково змінених форм збудників інфекційних захворювань, суспендованих або висушених у відповідних фізіологічних середовищах.

***Інактивовані (неживі) вакцини***– це препарати, які містять інактивовану культуру штамів збудників інфекційних хвороб, які при цьому втратили вірулентність і здатність до репродукції, але зберегли імуногенні властивості.

***Корпускулярні вакцини***складаються з мікроорганізмів, які переважно зберегли цілісність своєї будови – бактерійних клітин чи вірусних корпускул.

***Спліт-вакцини***складаються з очищених і зруйнованих бактерій (субклітинні) та вірусів (субвіріонні).

***Субодиничні (компонентні) вакцини***– різновид вакцин, які складаються з окремих (головних, або мажорних) антигенних компонентів, здатних забезпечити розвиток імунітету.

***Анатоксини*** являють собою бактеріальні екзотоксини, знешкоджені шляхом тривалої обробки розчином формальдегіду в умовах підвищеної температури (+ 37 °С).

***Моновалентні вакцини***містять антигени одного типу (виду) інфекційного збудника. ***Полівалентні (політипові, поліваріантні, поліштамові) вакцини***складаються з декількох типів, варіантів або штамів збудника однієї хвороби. ***Асоційовані (комбіновані, комплексні) вакцини***містять антигени декількох збудників різних інфекційних захворювань.

***Гомологічні вакцини***готують з того виду збудника, проти якого передбачається створити імунітет.

***Генно-інженерні вакцини* –** це вакцини виготовлені за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

***Синтетичні вакцини***– це препарати, що містять штучно синтезовані короткі пептиди, які імітують невеликі ділянки антигенів збудників, здатні викликати специфічну імунну відповідь організму і захистити його від захворювання.

Вакцини, що містять лише окремі компоненти патогенного організму, мають назву **«субодиничні»** і створюються за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

***Завдання 1.*** Надайте визначення і класифікацію вакцин: *вакцина, вакцинація, вакцини за здатністю до розмноження (до реплікації), вакцини за спрямованістю застосування, вакцини за сировинними компонентами, вакцини за кількістю типів антигенів, вакцини за видовою належністю вакцинного штаму, вакцини за способом отримання*.

***Завдання 2.*** Опишіть і схематично замалюйте методику створення генно-інженерної субодиничної вакцини.

***Завдання 3.*** Опишіть і схематично замалюйте методику створення генно-інженерної векторної вакцини.

***Завдання 4.*** Опишіть методику створення генно-інженерної вакцини через модифікацію геному патогенного мікроорганізму.

***Завдання 5.*** За матеріалами завдання 1 проведіть класифікацію вакцин із завдань 3-5: субодинична вакцина, векторна вакцина, атенуйована вакцина.

***Питання для самоконтролю:***

1. *Надайте визначення і класифікацію вакцин.*
2. *Охарактеризуйте живі генно-інженерні вакцини.*
3. *Охарактеризуйте неживі генно-інженерні вакцини.*
4. *Методики створення генноінженерних субодиничної та векторної*

*вакцин.*

1. *Методика створення генноінженерної вакцини через модифікацію геному патогенного мікроорганізму.*

**Зробіть висновки.**

***Джерело:* Генна інженерія у тваринництві**: ***Методичні вказівки*** до проведення практичних занять для здобувачів третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти ступеня доктора філософії (PhD) спеціальностей **204 «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва»** / Розробник: Сусол Р. Л. Одеса: ОДАУ, 2020. 49 с.