

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

ЛЕКЦІЯ 9

Тема: Генетична інженерія та генетично-модифіковані організми

Рекомбінація генетичного матеріалу постійно відбувається в природі. Поряд з мутаціями вона створює генотипову різноманітність особин – важливу передумову для дії природного добору. Лише наприкінці XIX – на початку XX ст. селекціонери почали свідомо використовувати створений природою механізм рекомбінації для підвищення ефективності штучного добору і виведення нових високопродуктивних сортів рослин і порід тварин методом гібридизації.

Гібридизація базується на перекомбінації хромосом та генів батьківських форм під час мейозу і запліднення. У поєднанні з індивідуальним добром вона дала чудові наслідки і залишається основним методом сучасної селекції. Наукове осмислення і практичне освоєння гібридизації було першим кроком у використанні явища рекомбінації генетичного матеріалу в інтересах людини.

Проте у бактерій природа винайшла інші способи рекомбінації генетичного матеріалу, такі, як трансформація, трансдукція та кон'югація. Можна було сподіватися, що окремі деталі цих специфічних природних процесів після їх докладного вивчення також знайдуть практичне застосування. Встановлення генетичної ролі ДНК та відкриття можливості інтеграції чужої ДНК з геномом господаря послужило однією з передумов виникнення нового напрямку молекулярної біології – генної інженерії.

Рекомбінація генетичного матеріалу у прокаріотів може відбуватись кількома шляхами одним з яких є трансформація - спосіб передачі спадкової інформації клітині-реципієнту від клітини-донора за допомогою ДНК. Здатність клітин до трансформації є різною. На певній стадії життєвого циклу в окремих бактеріальних клітинах виникає особливий фізіологічний стан – стан компетентності, який характеризується максимальною здатністю клітин до трансформації. Внаслідок зміни метаболізму і проникності мембрани компетентна клітина може активно транспортувати ДНК з навколишнього середовища і поглинати її в десятки і навіть сотні разів більше, ніж у звичайному стані. Методом мічених атомів було встановлено, що в геном реципієнта включаються лише невеликі фрагменти ДНК донора і тому здебільшого трансформуються лише одна-дві ознаки, які контролюються розміщеними поряд генами. Пізніше трансформацію спостерігали в експериментах з іншими коками, бацилами, бульбочковими бактеріями, бактеріями кишкової групи, синьозеленими водоростями тощо. Вчені робили численні спроби трансформації нижчих еукаріотів (дріжджів, водоростей) та багатоклітинних рослин та тварин. Проте вони залишалися безуспішними до семидесятих років XX ст., коли виникла технологія генної інженерії і були розроблені методи так званої векторної трансформації. На сьогодні проблему трансформації еукаріотів вирішено і роль ДНК як універсального носія спадкової інформації не викликає сумнівів.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Явище трансформації поширене в природі і може відбуватися між штамми одного виду, а також між різними видами, але частота міжвидової трансформації значно менша, ніж внутрішньовидової. Потрібна для спонтанної трансформації ДНК може вивільнятися з відмерлих клітин, які зазнали лізису, а також виділятися в навколишнє середовище живими клітинами. Природна трансформація – важливий фактор еволюції прокаріотів.

Другим шляхом є трансдукція.

Відомі два типи бактеріофагів – вірулентні та помірні. Помірні фаги можуть перебувати в бактеріальній клітині в двох станах. У вегетативному (автономному) стані вони реплікуються незалежно від геному господаря, накопичуються і викликають лізис клітини, який супроводжується вивільненням фагових часток. Проте процес вірусної інфекції може здійснюватися інакше: проникнувши в клітину, помірні фаги можуть об'єднуватися з ДНК клітини-господаря. Інтегрований з бактеріальною ДНК фаговий геном називають профагом. У стані профага фагова ДНК реплікується з геномом господаря як єдине ціле і передається нащадкам. Інтеграція профага не є цілком стабільною: він може відокремлюватися від бактеріальної хромосоми спонтанно з частотою близько до 10^{-3} або його дезінтеграцію можна викликати ультрафіолетовим промінням та іншими несприятливими факторами. При цьому можлива рекомбінація генетичного матеріалу, внаслідок якої частина фагової ДНК замінюється на бактеріальну, донорну ДНК, а фаг залишає частину свого геному в хромосомі бактерії.

Фаг, який втратив частину свого генетичного матеріалу і «прихопив» чужий, називається дефектним. Під час зараження дефектним фагом іншого штаму бактерій вони сприймають до свого геному фагову ДНК разом з фрагментом ДНК донора.

Явище перенесення генів від одного організму до іншого за допомогою фага називають трансдукцією. Завдяки їй реципієнт одержує незначну (близько 1 %) частку геному донора і набуває однієї-двох його ознак.

Вперше трансдукцію вивчали американські дослідники Н. Ціндер та Д. Ледерберг (1952 р.). В U-подібній трубці, розділеній бактеріальним фільтром, вони одночасно культивували два штами бактерій мишачого тифу *Salmonella typhimurium*. Один із штамів був ауксотрофом за триптофаном, а інший – міг синтезувати цю амінокислоту. Після сумісної інкубації виявилось, що окремі клітини ауксотрофного штаму, які виникали з частотою 1×10^{10} , набули здатності до синтезу триптофану. Перенесення генетичної інформації від прототрофного Tgr⁺ до ауксотрофного Tgr⁻ штаму здійснювалося завдяки помірному фагу P22. У вигляді профага він здатний включатися в різні локуси бактеріальної хромосоми і переносити різні, а можливо й всі, гени сальмонели від одного штаму до іншого. Таке явище називають неспецифічною, або загальною, трансдукцією. Інші фаги, які мають певне місце посадки у бактеріальній хромосомі, здатні переносити лише окремі гени, що знаходяться поруч. Такий тип перенесення генів називають специфічною трансдукцією.

Специфічну трансдукцію вперше виявили в кишковій паличці, яка була заражена помірним фагом λ . Його інтеграція з хромосомою *E. coli* найчастіше

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

відбувається між генами *gal* (ген, який контролює катаболізм галактози) та *bio* (ген, який контролює синтез біотину), які нанесені на генетичну карту. Під час відокремлення фаг «прихоплює» одні й ті самі гени, які знаходяться поряд, що і забезпечує специфічність цього типу трансдукції. Так, за допомогою фага можна перенести гени галактозного оперону від бактерій, які здатні використовувати галактозу як джерело вуглецевого живлення, до бактерій, які не мають цієї властивості.

Трансформація і трансдукція зумовлюють швидке поширення мутаційних змін у популяціях прокаріотів, а також забезпечують обмін генетичною інформацією між віддаленими в генетичному відношенні видами.

Ці природні явища використовуються в експериментах з трансгенозису – перенесенню генів від одних організмів до інших.

Кон'югація у бактерій

У 1946 р. Д. Ледерберг і Е. Тейтем першими почали вивчати можливість рекомбінації генетичного матеріалу різних штамів бактерій під час сумісного їх культивування. З цією метою вони відібрали два множинних ауксотрофних штами *E. coli*. Один з них унаслідок накопичення незалежних мутацій втратив здатність до синтезу трьох життєво потрібних речовин, які ми умовно позначимо як А, Б, В, а другий – втратив здатність до синтезу трьох інших метаболітів – Г, Д, Е. Кожен з цих мутантів міг рости і утворювати колонії лише тоді, коли в поживне середовище додавали три певних речовини. Бактерії обох штамів змішували і висівали разом на повне середовище, яке містило всі шість потрібних речовин. Через деякий час суміш клітин обох штамів для виявлення прототрофних рекомбінантів переносили на мінімальне середовище, де не було жодної з цих речовин. Однак на мінімальному середовищі утворилося кілька колоній бактерій. Припущення про те, що прототрофні бактерії (А+Б+В+Г+Д+Е+) виникли шляхом мутацій, було впевнено відкинуте тому, що одночасове виникнення трьох мутацій від ауксотрофності до прототрофності в одній клітині є малоімовірною подією (ймовірність одноразового виникнення трьох мутацій дорівнює добуткові ймовірностей кожної з них). Враховуючи це, Д. Ледерберг і Е. Тейтем дійшли висновку, що утворення прототрофних бактерій є наслідком рекомбінації генетичного матеріалу обох мутантних штамів:

1-й штам А–Б–В–Т+Д+Е+

2-й штам А+Б+В+Г–Д–Е–

Прототрофні А+Б+В+Г+Д+Е+ рекомбінанти

Перекомбінація генів, як показали додаткові дослідження, не була наслідком трансформації: під час додавання до культури одного штамму стерильного фільтрату середовища іншого штам рекомбінанти не виникали. Не було їх і тоді, коли штами культивувалися в окремих колінах U-подібної трубки, розділеної бактеріальним фільтром. Лише безпосередній контакт між бактеріями під час сумісного культивування їх на повному середовищі забезпечував утворення прототрофних клітин, які виявили ознаки обох вихідних штамів. У 50-х роках Б. Хейс встановив, що в бактерій, здатних до кон'югації (взаємного зближення і утворення цитоплазматичного місточка),

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

спостерігається полярність, тобто диференціація на статеві типи: один із партнерів кон'югуючої пари є донором («самцем»), а другий – реципієнтом («самкою»). Б. Хейсом були виділені два статевих типи: F^+ – донорні, «чоловічі» штами і F^- – реципієнтні, «жіночі» штами.

У 1956 р. Д. Ледерберг одержав прямі електронно-мікроскопічні докази утворення кон'югаційних пар у змішаних культурах рекомбінуючих штамів. По тонкому цитоплазматичному містку, який з'єднує дві кон'югуючі бактерії, відбувається перенесення генів в одному напрямі – від донора до реципієнта. Детермінант, який визначає статевий тип і кон'югацію у *E. coli*, був названий фактором фертильності– F . Штами, які його мають, можуть бути донорами генетичного матеріалу для тих штамів, у яких він відсутній (перші позначають як F^+ , а другі як F^- -штами)

Дослідження, проведені на молекулярному рівні, показали, що фактор F є автономною дволанцюговою, замкненою в кільце молекулою ДНК, здатною до реплікації. Такі самостійні, невеликі кільцеві молекули ДНК, які існують незалежно від основної хромосоми бактерій і становлять собою окремий реплікон, були названі плазмідами.

Плазміди – це не обов'язкові компоненти клітин прокаріотів, які можуть передаватися іншим клітинам під час кон'югації. Схема передачі бактеріальної плазміди показана на рисунку. Перед кон'югацією кожна з бактеріальних клітин містить кільцеву хромосому, а одна з клітин – донор – має ще й плазмиду – невелику кільцеву молекулу ДНК.

Під час кон'югації один з ланцюгів плазміди зображений у вигляді стрілки розривається в певній точці і через цитоплазматичний місток входить у клітину-реципієнт. Після цього на кожному з ланцюгів синтезується комплементарний ланцюг ДНК, завдяки чому утворюються дві інтактних молекули і обидві клітини внаслідок цього будуть містити по плазміді і стануть потенціальними донорами F^+ .

На одну бактеріальну хромосому донора припадає 1–2 кон'югаційних плазміди, які переносяться від клітини до клітини за описаною схемою. Проте в деяких випадках F -плазмідна кільцева молекула ДНК розривається у певному місці, і ДНК плазміди шляхом кросинговеру петлеподібно вмонтовується в хромосому бактерії, наприклад між генами x , y , z і a , b , c . Завдяки такій інтеграції виникають клітини і штами *Hfr* (high frequency of recombination) з високою частотою рекомбінацій. Коли клітина *Hfr* кон'югує F^- -клітиною, один ланцюг кільцевої хромосоми розривається в сайті інтеграції і фактор F , як локомотив, тягне за собою один з ланцюгів бактеріальної хромосоми.

Таке перенесення генів відбувається часто, і штами такого типу цілком виправдовують свою назву *Hfr*. Цитоплазматичний місток між кон'югуючими бактеріями є не міцним і може зруйнуватися спонтанно. Тому здебільшого реципієнт одержує не всю хромосому донора, а лише її частину, яка примикає до місця інтеграції. Ф. Жакоб і Е. Вольман (1957), вивчаючи кон'югацію і її генетичні наслідки, істотно вдосконалили методику досліджень і зробили значний внесок у розуміння цього процесу.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Ранні генетичні дослідження проводилися переважно на вищих організмах, але перший випадок перенесення генетичної інформації (ділянок ДНК, генів) був зафіксований у бактерій. Пізніше цей самий підхід (перенесення генів, трансгенозис) використали для вищих організмів.

Виявилося, що в двох основних групах організмів – прокаріотів і еукаріотів – генетичний матеріал знаходиться в однаковій формі (ДНК). Тому способи обміну генетичною інформацією, виявлені в одних об'єктів, властиві й іншим, навіть віддаленим у таксономічному відношенні організмам. Вивчення трансформації на молекулярному рівні засвідчило принципову можливість перенесення генів від одних організмів до інших, тобто стимулювало розвиток того напрямку молекулярної біології, який ми називаємо генетичною інженерією. Пізнання трансформації стало прологом генної інженерії.

Суть генної інженерії полягає у виділенні й штучному створенні функціонально активних генетичних структур (генів, їх блоків та рекомбінантних молекул ДНК) з наступним введенням їх в організм з метою цілеспрямованої перебудови його генотипу. При цьому введений генетичний матеріал повинен стати складовою частиною генетичної системи господаря, а саме: реплікуватися разом з його ДНК, виконувати регуляторні команди клітини, включатися в процеси транскрипції і трансляції та забезпечувати синтез відповідних продуктів (білків, гормонів) і прояв нових, не властивих для даного організму ознак і властивостей. Генна інженерія вирішує фундаментальні наукові завдання, які пов'язані з вивченням структурної організації геномів та особливостями їх функціонування в різних організмах. Разом з цим вона розв'язує завдання прикладного характеру, які пов'язані з розробкою нових методів створення високопродуктивних штамів мікроорганізмів, сортів рослин, порід тварин, а в перспективі – і генотерапії спадкових хвороб людини.

Як самостійний напрям генна інженерія виникла наприкінці 1972 р., коли П. Берг, Д. Джексон і Р. Симонс (США) опублікували роботу про створення штучним шляхом першої рекомбінантної («гібридної») молекули ДНК. До її складу входили фрагменти ДНК мавпячого вірусу, бактеріофага λ , і *E. coli*. Отже, рекомбінантні ДНК створюють шляхом з'єднання послідовностей різного походження.

Експеримент П. Берга став прологом бурхливого розвитку досліджень генної інженерії в інших країнах. Проте для їх успішного проведення потрібно було вирішити ряд важливих завдань:

1. Розробити методи одержання генів та фрагментів ДНК.
2. Навчитися свідомо перекомбінувати генетичний матеріал *in vitro*.
3. Підібрати відповідні вектори, тобто здатні до реплікації структури, які можуть приєднувати до себе різноманітні гени та фрагменти молекул ДНК і переносити їх у клітину.
4. Розробити ефективні методи виявлення генетичних трансформантів – організмів, які містять функціонально активні рекомбінантні молекули ДНК.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Сучасний рівень знань зробив можливим перехід до спрямованого конструювання молекул спадковості, окремих клітин і цілих організмів. Вчені біологи не лише вивчають будову і функціонування організмів, а й створюють нові варіанти живих систем, які не могли появитися в ході еволюції. Так з'явилися нові напрямки біології – генна, генетична та клітинна інженерія, які об'єднують під загальним терміном біоінженерія.

Генна інженерія вужче поняття, ніж генетична інженерія. Вона має відношення до окремого гена чи окремих генів. Її завдання – виділення і синтез генів, конструювання і клонування нових рекомбінантних молекул ДНК, створення банку генів.

Генетична інженерія – це ширше поняття; вона займається проблемами спрямованого конструювання (за допомогою методів генної інженерії) нових живих організмів з бажаними для людини ознаками і властивостями. Тобто, генетична інженерія – це генна інженерія + трансгенозис. За визначенням академіка Баєва генетичну інженерію можна розглядати як науку про зміну генетичної програми клітин та організмів в інтересах людини.

Техніка вирощування *in vitro* клітин вищих організмів збільшує можливості генетичної інженерії рослин і тварин, оскільки клітини і, особливо, «голі» протопласти є зручними реципієнтами для введення чужого генетичного матеріалу. Під час культивування клітин *in vitro* з ними можна здійснювати різні маніпуляції і одержувати трансгенні (трансформовані) клітини, а з них – цілі організми з новими спадковими властивостями. Генетична і клітинна інженерія спрямовані на вирішення спільного завдання – здійснення контрольованих біологічних маніпуляцій, пов'язаних з генами, хромосомами, ядрами та іншими органелами клітин з метою створення нових бажаних для людини генотипів. Тому ці напрямки часто об'єднують під загальною назвою «біоінженерія».

Гени, які потрібні для експериментів, синтезують штучно або виділяють з бактеріальних клітин за допомогою *трансдукуючих фагів*. У 1968 р. Х. Корана вперше синтезував ген аланінової тРНК. На той час структурні формули багатьох тРНК були вже відомі завдяки роботам американського біохіміка Р. Холлі (Нобелівська премія, 1968 р.) та інших дослідників. Виходячи з нуклеотидної послідовності аланінової тРНК, Х. Корана спроектував на папері структуру гена, з якого вона транскрибується, а потім синтезував його. Обидва комплементарні ланцюги гена, кожен довжиною 77 нуклеотидів, були розбиті на блоки від 8 до 12 нуклеотидів завдовжки. Блоки синтезувалися методами класичного органічного синтезу. Для з'єднання їх використовувався фермент ДНК-лігаза. Він здійснює репарацію розривів ланцюгів молекули ДНК, каталізуючи з'єднання фосфату одного нуклеотиду з цукром іншого. Успішне з'єднання блоків забезпечувалося також і тим, що вони мали «липкі кінці» – одноланцюгові комплементарні виступи, які, спарюючись між собою, утримували фрагменти разом для того, щоб лігаза проявила свою дію. Синтез гена був справжнім тріумфом біоорганічної хімії та молекулярної біології. Однак синтезований ген не проявив активності у живій системі. Повна і функціонально активна генна структура (ген

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

+регуляторна ділянка, всього 199 нуклеотидів) була синтезована Х. Кораною в 1976 р. Штучно створений ним ген.тирозинової тРНК *E. coli* працював під час введення в геном фага Т4 в клітинах кишкової палички. Проте середній розмір гена становить 1000-1500 нуклеотидів, що значно ускладнює його синтез. Тому хімічний синтез застосовують тоді, коли продукт гена і сам ген має невеликі розміри. Так, методика, розроблена Х. Кораною, застосовувалася для синтезу гена, який контролює синтез інсуліну в людини.

В Інституті біоорганічної хімії та Інституті загальної генетики (Москва) таким чином синтезували безліч генів, зокрема гени брадикініну і енкефаліну. Новосибірські вчені синтезували ген ангіотензину – невеликого білка, який складається з 10 амінокислот. Спочатку амінокислоти написали у тій послідовності, в якій вони розміщені в білку, і під кожною з них позначили відповідний кодон.

Тобто одержали «проект» гена, а потім синтезували ген разом з регуляторними ділянками. Ген вмонтували в спеціально створену плазмиду і ввели її в клітини *E. coli*. Штучний ген почав там працювати і забезпечив синтез нетипового для кишкової палички продукту – ангіотензину.

Штучно створені гени та фрагменти ДНК при введенні їх в клітину не мають самостійно відтворюватись і передаватись потомству. Для подолання цієї перешкоди їх включають до складу генетичної структури, яка здатна до реплікації. Така структура, яка становить собою окремий реплікон і використовується для перенесення генетичного матеріалу, носить назву вектора, або переносника. *Вектор* – це молекула ДНК, яка здатна переносити в клітину чужий ген і забезпечувати там його розмноження (реплікацію). Вектор може реплікуватися або автономно, або після його інтеграції з геномом.

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

Спочатку відкриття плазмід не викликало особливого інтересу. Про плазмиди заговорили медики в 1959 р., коли японські дослідники виявили, що неефективність найкращих на той час антибіотиків при лікуванні дизентерії у багатьох хворих, зумовлена тим, що бактерії, якими заражені ці пацієнти, мають у своїх клітинах плазмиди, що містять кілька генів стійкості до різних антибіотиків. Пізніше з'ясували що майже завжди гени стійкості до антибіотиків містяться у плазмідах. Здатність переходити з однієї бактерії до іншої (під час кон'югації) призводить до того, що У 1972 р. американські дослідники вперше одержали рослину, яка утворилася з гібридного протопласту двох видів тютюну. У 1978 р. Г. Мельхерс одержав рослину з продукту злиття протопластів помідорів і картоплі (помітопля). Р. Г. Бутенко (Інститут фізіології рослин, Москва) створила соматичний гібрид двох віддалених видів картоплі. Японські дослідники шляхом злиття протопластів рису і проса вперше в світі одержали соматичні гібриди однодольних. У 1978 р. Ю. Ю. Глеба (Київ) розробив метод культивування окремих протопластів у

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

мікрокраплях. Певна кількість протопластів розвивалися в цілі рослини. Він одержав соматичний гібрид арабідопсису і рапсу – *Arabidobrassica* (*Arabidopsis thaliana* + *Brassica rapa*).

Внаслідок злиття протопластів мікоризного гриба з роду *Rhizopogon* і клітин азотобактера був одержаний гібридний організм, який став фіксувати азот. Ця здатність нового організму збереглася в природних умовах на коренях сосни.

Дж. Пауер одержав соматичні гібриди двох видів петунії, які не схрещувалися звичайним статевим шляхом. Завдяки цьому від виду *Petunia parviflora* в селекцію цієї декоративної рослини ввели нову ознаку – розгалужене сланке стебло.

Цікаво, що шляхом соматичної гібридизації утворюються гібриди між раковими і нормальними клітинами. Це застосовують для одержання гібридом – продуктів злиття лімфоцитів і пухлинних клітин кісткового мозку. Гібридами продукують моноклональні антитіла. Цю особливість вони успадковують від певного клону лімфоцитів. Разом з цим гібридами здатні до необмеженого поділу на поживному середовищі. Ця властивість потенційного безсмертя одержана ними від пухлинних клітин.

Моноклональні антитіла здатні розпізнавати різні типи макромолекул та їхні індивідуальні особливості. Вони мають значні переваги над звичайними сиворотками, оскільки ідеально реагують з певною органічною субстанцією і використовуються для діагностики і лікування захворювань.

В.А. Енгельгардт вважає, що є всі можливості виробляти антитіла, спрямовані проти одного конкретного індивідуального білка. Ці клітини (гібридами) успішно розвиваються поза організмом, в культурі *in vitro*, і завдяки цьому можна одержувати значну кількість ідеальних чистих антитіл. Гібридами – ідеальні інструменти діагностики багатьох хвороб, особливо раку.

Клітина, яка здатна реалізувати генетичну інформацію дати початок усім типам тканин і цілому організму, називається *тотипотентною*. Прикладом такої клітини може бути зигота. Біологів здавна цікавило питання про те, до якого часу в ході диференціації клітин зберігається ця властивість. Розділяючи ранні зародки амфібій на окремі клітини, дослідники переконалися в тому, що клітини певний час залишаються тотипотентними. Природним доказом тотипотентності клітин раннього зародка є народження ідентичних близнюків у людини (кожна з 2-4 клітин у разі їх спонтанного роз'єднання може дати початок нормальному ембріону). У 8-клітинному зародку кролика можна вбити голкою 7 клітин і лише з однієї одержати нормальну тварину.

Ще в 1902 р. німецький ботанік Г. Габерланд вперше вловив думку про те, що всі живі рослинні клітини тотипотентні. Він вважав, що шматочок рослинної тканини і навіть окрема клітина здатні утворити цілу рослину, але він не зміг цього здійснити, оскільки на той час вчені не знали як культивувати рослинні клітини *in vitro* і які речовини слід додати до культурального середовища, щоб примусити калусну тканину диференціюватися.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Для вивчення питання тотипотентності клітинних ядер у ході диференціації американські вчені Р. Бріггс і Т. Кінг у 1952 р. Розробили метод трансплантації ядер у без'ядерні (енуклейовані) яйцеклітини жаби.

При цьому ядро яйцеклітини вилучають тонкою голкою, а скляною мікропіпеткою вносять ядро однієї з клітин раннього зародка. Ядра клітин, взяті із зародка на стадії бластули, у 80% випадків забезпечували нормальний розвиток. Під час трансплантації ядер з клітин зародка, який перебував на стадії гаструли, нормальний розвиток спостерігався лише в 20 % випадків. Якщо ж використовувались ядра клітин зародка, в якому почав формуватись зачаток центральної нервової системи, то в жодному з випадків не спостерігалось утворення нормальних зародків. Ці факти свідчили про стабільну інактивацію багатьох генів у ході диференціації клітин, адже цитоплазма яйця не змогла активувати ті гени, які забезпечують нормальний розвиток.

Рослинні клітини здатні до повторної диференціації. Будь-яка жива рослинна клітина може реалізувати генетичну інформацію і дати початок усім типам тканин і цілому рослинному організму.

Цю думку, висловлену вперше Г. Габерландтом, було підтверджено Ф. Стюардом в 1950р. Він ізолював маленький шматок флоєми кореня моркви і вмістив його в рідке культуральне середовище у колбу, яка оберталася. В середовищі була сахароза, фізіологічно необхідні елементи і окремі вітаміни. Однак для росту і диференціації потрібні були ще якісь речовини. Ф. Стюард виявив їх у кокосовому молоці. Під час його додавання клітини, які відокремлювалися від ростучої клітинної маси, після перенесення їх на агаризоване середовище ділилися і в окремих випадках утворювали пагони. Цей експеримент засвідчив, що флоємні клітини містять всю генетичну інформацію, потрібну для розвитку типової рослини цього виду. За наявності відповідних сигналів, які надходять з навколишнього середовища, у ізольованих клітинах «включаються» гени, які не експресувалися в клітинах флоєми. У культурі ізольованих клітин і тканин можна одержати цілу рослину з клітин пелюстки квітки, пиляка, мікроспори, в'язальця пиляка, флоєми, паренхімних клітин бульби картоплі, серцевини стебла тощо. Тотипотентність є цікавою властивістю рослинних клітин.

Здатність до соматичного ембріогенезу властива також губкам, кишковопорожнинним і червам. Клітини ссавців культивуються важко, а примусити їх диференціюватися ще важче, оскільки вони високоспеціалізовані. Рівень складності, який був досягнутий внаслідок диференціації, буває таким високим, наприклад у нейронів, що перешкоджає навіть росту і поділу клітин. Хоча в ядрах диференційованих клітин зберігається генетичний матеріал, більша його частина залишається репресованою і активувати його, здебільшого, не вдається.

Природним доказом генетичної рівноцінності клітин, що виникають шляхом мітозу, є однайцеві близнюки. Вони утворюються з однієї зиготи, яка зазнає мітотичного поділу. Утворені клітини відокремлюються і дають початок двом або кільком ембріонам. Отже, тут маємо безстатеве розмноження. Такі

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

близнюки внаслідок ідентичності генетичної програми (ДНК) мають однакові білки, і імунологічної несумісності під час трансплантації тканин і органів у них не спостерігається. Обмін речовин відбувається однотипне, що й забезпечує високу морфологічну подібність.

Чимало видів рослин, тварин і мікроорганізмів розмножуються безстатевим шляхом за допомогою мітотичного поділу клітин. Сукупність клітин або особин, які виникли від спільного предка шляхом безстатевого розмноження, називають *клоном*. Прикладами клонів можуть бути: однойцеві близнюки, окремі колонії мікроорганізмів, сорти рослин, які розмножуються вегетативно. Клони характеризуються високою генетичною стабільністю потомства навіть у разі гетерозиготності вихідного предка.

Більшість сортів плодових і всі сорти картоплі є клонами, тобто вегетативним потомством однієї рослини, відібраної селекціонером.

Слід зауважити, що ріст рослин і тварин зумовлюється мітотичним поділом клітин і їх ростом. Усі клітини певного організму, наприклад людини, належать до одного клону.

Наприкінці XX ст. спеціалісти Рослінського інституту (Шотландія) повідомили про вівцю Доллі, що з'явилася на світ завдяки трансплантації ядер. Доктор Кемпбел з клітин грудної залози вагітної 6-річної вівці добували ядра і переміщували їх в енукейовані яйцеклітини інших овець.

Було проведено 400 таких маніпуляцій і лише в 1 випадку (з 400) народилася Доллі, генотип якої був ідентичний генотипу вівці-донора ядра.

Культура ізольованих тканин і клітин — це метод вирощування відокремлених від організму тканин і клітин на відповідних поживних середовищах за умов стерильності. Засновниками цього методу є американські вчені Р. Гаррісон (1907) і А. Каррель (1912). Методи вирощування рослинних тканин були розроблені значно пізніше Ф. Уайтом і Р. Готре. У культурі ізольовані клітини і тканини зберігають характерні властивості того виду, з якого вони були взяті. Це зумовлюється стабільністю їх основних генетичних характеристик, адже соматичні клітини мають такий самий генотип, як і зигота, з якої вони виникли.

Культура клітин і тканин використовується також в наукових дослідженнях. Вона є зручною моделлю для вивчення процесів диференціації клітин як основи індивідуального розвитку та морфогенезу.

У культурі соматичних клітин було виявлено можливість їхнього злиття. Злиття диплоїдних соматичних клітин і їхніх ядер одержало назву соматичної гібридизації. Цікаво, що зливатися можуть клітини різних видів. Внаслідок цього утворюється гетерокаріон, тобто клітина, яка містить ядра двох видів, наприклад людина/комар; людина/миша. Після злиття ядер утворюється гібридна клітина.

Для одержання соматичних гібридів дві культури клітин після їх спеціальної обробки змішують у посудині з поживним середовищем і залишають на кілька годин. Спонтанне злиття клітин різного генотипу відбувається рідко, і для його стимуляції використовують інактивованій вірус Сендая, нешкідливий для людини і тварин. Потім суспензію вихідних і

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

гібридних клітин висівають на селективне середовище, на якому гібридні клітини розмножуються і дають початок клонам.

Завдяки соматичній гібридизації можна здійснити рекомбінацію генетичного матеріалу віддалених в еволюційному відношенні організмів. Злиття відбувається з великою частотою і одна клітина з п'яти може виявитися рекомбінантною. Цей метод застосовують також для актиноміцетів, бацил, корінебактерій, нитчастих грибів, дріжджів та інших організмів.

Метод соматичної гібридизації використовується в генетиці для картування генів, зокрема в такого складного генетичного об'єкту, як людина. З цією метою одержують, наприклад, соматичні гібридні клітини людини і миші. Вони характеризуються двома важливими особливостями:

1. Випадковою елімінацією (втратою) хромосом одного з видів.
2. Одночасним проявом генів обох компонентів.

У процесі розмноження гібридних клітин втрачаються, звичайно, хромосоми людини, а хромосоми миші залишаються ($2n$ миші = 40; $2n$ людини = 46). Переважна більшість клітин містить від 41 до 55 хромосом (40 мишачих + кілька людських).

Для картування генів спочатку з'ясовують, чи розміщені два або більше генів в одній хромосомі, а потім з'ясовують, в якій хромосомі та в якій її ділянці локалізуються окремі гени. Випробовуючи ряд клонів на наявність різних ферментів людини, порівнюють характер вираженості генів (тобто наявність ферментів) з присутністю або відсутністю певних хромосом. Два гени, які присутні або відсутні завжди разом, вважаються синтенними, тобто розміщеними в одній хромосомі. Одержання однохромосомних ліній (40 мишачих хромосом + 1 певна хромосома людини) значно полегшує роботу.

Для того щоб визначити, в якому місці хромосоми знаходиться ген, використовують хромосомні перебудови – транслокації (міжхромосомні обміни фрагментами) та делеції (втрати окремих ділянок хромосом, у даному разі кінцевих).

Завдяки використанню методу соматичної гібридизації вдалося визначити локалізацію багатьох генів людини. Таким самим способом можна картувати гени в сільськогосподарських тварин і це, безперечно, сприятиме прогресу їх селекції.

Прикладами генетично модифікованих організмів є морозостійка картопля, картопля, що не пошкоджується колорадський жуком, помідори з перенесеними до них генами американської плоскої риби (стійкі до низьких температур), *E. coli* з генами інсуліну, інтерферону та соматотропіну людини, помідорні дерева, які плодоносять цілий рік і дають кілька центнерів плодів з рослини (Японія), бактерії, що очищають середовище від нафтових забруднень (Росія) та ін.

ГМО одержують шляхом введення в генотип різних с-г культур генів інших рослин, тварин, бактерій і навіть людини. Але перенесення лише 1 гена надає організмові лише одну бажану для людини властивість і не може впливати на комплекс ознак.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Сучасна наука ще не навчилася вміло маніпулювати з усім арсеналом генів. Кількісні ознаки організмів зумовлені полігенно, а що це за гени ми не знаємо. А саме ці ознаки найбільше цікавлять людину.

Генетично модифіковані харчові продукти (ГМХП) завжди містять у своєму складі певну кількість ГМО (наприклад, варена ковбаса, що містить трансгенну сою, картопляні чіпси з генетично модифікованою картоплею). ГМПХ займається харчова біотехнологія.

Американці схильно ставляться до ГМХП і вони поширюються в Штатах високими темпами. В ЄС спостерігається виважене і навіть скептичне ставлення до ГМХП. Обов'язково на етикетках продтоварів вказано наявність ГМО. Вміст ГМО в ГМХП не повинен перевищувати в ЄС 0,9% ($\approx 1\%$). В Україні обіцяли ввести маркування ГМПХ з січня 2008р. Тестують ГМО лише 3 лабораторії України.