

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний педагогічний університет ім. А.С. Макаренка

Іншина Н. М.

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Навчальний посібник

Суми
Видавництво СумДПУ ім. А.С. Макаренка
2009

УДК 577.2
ББК 30.16
І 74

Рекомендовано до друку вченою радою
Сумського державного педагогічного університету ім. А.С. Макаренка

Рецензенти:

Каліман П.А. – доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біохімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна;

Висоцький І.Ю. – доктор медичних наук, професор, зав. каф. біохімії та фармакології Сумського державного університету;

Орлов В.Д. – доктор хімічних наук, професор, зав. каф. органічної хімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна

Іншина Н. М.

І74 Біотехнологія : навч. посіб. – Суми : Видавництво СумДПУ ім. А.С. Макаренка, 2009. – 172 с.

У посібнику наведено сучасні дані щодо методів, об'єктів біотехнології та застосування її досягнень у різних галузях діяльності людини: медицині, сільському господарстві, харчовій, хімічній та гірничодобувній промисловості, енергетичній галузі, охороні довкілля.

Матеріали посібника можуть бути використані у процесі підготовки до практично-семінарських занять, виконання завдань індивідуальної та самостійної роботи студентів. Посібник буде корисним для вчителів та учнів старшої школи, гімназій і ліцеїв, які захоплюються біологією.

УДК 577.2
ББК 30.16

© Іншина Н.М., 2009

© Видавництво СумДПУ ім. А.С. Макаренка, 2009

ЗМІСТ

ВСТУП	5
Біотехнологія як наука. Сучасні досягнення біотехнології	5
Історія розвитку біотехнології	6
Об'єкти біотехнології.....	9
РОЗДІЛ 1. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ	13
Виділення нуклеїнових кислот	14
Ферменти рестрикції і модифікації нуклеїнових кислот	14
Виділення генів.....	15
Хімічний синтез ДНК і конструювання генів	16
Вектори	17
Методи введення рекомбінантної ДНК в клітини	20
Клонування генів. Клонотеки генів.....	22
Клонотеки кДНК	23
Системи експресії рекомбінантних генів.....	24
Полімеразна ланцюгова реакція як метод ампліфікації ДНК.....	27
Методи секвенування ДНК	30
Проект «Геном людини»	31
Нові напрями генних досліджень: геноміка, генна психологія.....	33
Генна інженерія рослин	34
Вектори для трансформації рослинних клітин.....	36
Трансгенні рослини	38
Бактерії, що стимулюють ріст рослин.....	44
Генна інженерія тварин. Технологія одержання трансгенних тварин.....	52
Трансгенні риби.....	54
Переваги і недоліки використання трансгенних рослин і тварин у сільському господарстві.....	55
РОЗДІЛ 2. БІЛКОВА ІНЖЕНЕРІЯ	61
Раціональний дизайн і направлена еволюція білкових молекул.....	61
Мутації та мутагенез, їх застосування у білковій інженерії	61
Сучасні досягнення білкової інженерії. Зміна властивостей ферментів	63
Абзими – каталітичні антитіла.....	65
РОЗДІЛ 3. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ	67
Культивування клітин. Клітинні лінії	67
Клітинна інженерія рослин. Історія метода культури клітин рослин.....	70
Основні напрями клітинної інженерії рослин	71
Культури клітин вищих рослин	71
Клітинна селекція	73
Культури гаплоїдних клітин.....	74
Протопласти рослинних клітин як об'єкт біологічного конструювання	75
Мікроклональне розмноження рослин.....	77
Штучні асоціації культури клітин вищих рослин і мікроорганізмів	79
Культури тваринних клітин. Історія методу.....	80
Гібриди соматичних клітин	81

Клонування тварин.....	82
Стовбурові клітини. Історія досліджень	84
Ембріональні стовбурові клітини	85
Стромальні та гематопоетичні стовбурові клітини	87
РОЗДІЛ 4. МЕДИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ	92
Одержання рекомбінантних білків людини.....	92
Імунобіотехнологія. Технологія одержання моноклональних антитіл.....	95
ДНК-вакцини	97
Фітоселекційні вакцини	99
Генна діагностика.....	99
Генна терапія.....	101
РОЗДІЛ 5. ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ	108
Стадії біотехнологічного виробництва	108
Типи промислових біопроектів.....	112
Виробництво біомаси мікроорганізмів	113
Промисловий синтез білків за участю рекомбінантних мікроорганізмів	113
Виробництво клітинних компонентів мікроорганізмів.....	117
Промислове виробництво ферментів	117
Імобілізовані ферменти	119
Імобілізовані клітини мікроорганізмів	121
Технологія одержання мікробних ліпідів	122
Виробництво первинних метаболітів мікроорганізмів	122
Виробництво амінокислот	123
Виробництво спиртів, органічних кислот, вітамінів	124
Виробництво вторинних метаболітів мікроорганізмів.....	126
Виробництво гормонів.....	126
Виробництво антибіотиків	128
Нові продукти біопромисловості.....	130
Біогеотехнологія	132
Біоелектроніка.....	134
РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОХОРОНИ ДОВКІЛЛЯ	137
Біотехнологія очищення води	138
Показники забруднення стічних вод	141
Роль аквакультури в очищенні стічних вод.....	141
Біодеградація ксенобіотиків.....	142
Фіторе mediaція	145
Біодеградація і конверсія побутових і промислових відходів.....	146
Мікробіологічна утилізація полімерних побутових відходів.....	146
Утилізація рослинної біомаси	146
Біоенергетика	148
РОЗДІЛ 7. ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ	153
СЛОВНИК ТЕРМІНІВ	156
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	167
ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК	168

ВСТУП

БІОТЕХНОЛОГІЯ ЯК НАУКА. СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Біотехнологія є важливим розділом сучасної біології, що має вагомий пріоритет у світовій науці та економіці.

Біотехнологія – це наука про методи і технології створення генетично змінених біологічних об'єктів для інтенсифікації виробництва й одержання нових видів продуктів.

У традиційному розумінні біотехнологія – це наука про методи і технології виробництва різних речовин з використанням природних біологічних об'єктів і процесів. Сучасна біотехнологія використовує методи генної і клітинної інженерії.

Згідно з визначенням Європейської біотехнологічної федерації, біотехнологія передбачає «одночасне використання біохімії, мікробіології та хімічної технології для промислового застосування корисних властивостей мікроорганізмів і культур тканин».

Біотехнологія використовує досягнення таких наук, як молекулярна і клітинна біологія, генна інженерія, мікробіологія, біохімія, біоорганічна хімія, фізіологія, генетика і селекція, медицина, ветеринарія, інженерні технології.

Розрізняють такі **напрями біотехнології**:

1. «Червона» біотехнологія – виробництво біофармацевтичних препаратів, а також корекція генетичних дефектів.
2. «Зелена» біотехнологія – розробка і введення генетично модифікованих рослин у культуру.
3. «Біла» біотехнологія – виробництво біопалива, ферментів і біоматеріалів для різних галузей промисловості.
4. Академічні та урядові дослідження (наприклад, розшифрування генома деяких організмів).

Практичні досягнення біотехнології використовуються в медицині, екології, сільському, лісному і рибному господарствах, харчовій, хімічній і гірничодобувній промисловості. У медицині біотехнологічні методи відіграють головну роль під час створення нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів, призначених для ранньої діагностики і лікування захворювань. За участі мікроорганізмів здійснюють очищення

води, повітря і ґрунту від хімічних забруднень. У багатьох країнах з допомогою методів генетичної і клітинної інженерії створено високопродуктивні і стійкі до шкідників, хвороб, гербіцидів сорти сільськогосподарських культур. Біотехнологічні процеси з використанням мікроорганізмів і ферментів широко застосовуються у харчовій промисловості. Промислове культивування мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин використовують для одержання багатьох речовин: ферментів, гормонів, амінокислот, білків, вітамінів, антибіотиків, спиртів, органічних кислот.

Новими сферами застосування біотехнології є біоелектроніка і біоелектрохімія, в яких використовується взаємодія біологічних, електричних та електронних систем. Створено аналітичні прилади нового покоління, дія яких базується на використанні електродів з іммобілізованою біологічною системою. Пріоритетним напрямом біотехнології є біоенергетика.

Історія розвитку біотехнології

Здавна люди використовували біотехнологічні процеси: випікали хліб, варили пиво, виготовляли сир та інші продукти. У всіх цих процесах беруть участь мікроорганізми. Найдавнішим біотехнологічним процесом було бродіння. Відомо, що у третьому тисячолітті до н. е. шумери виготовляли до 20 видів пива. У 1981 р. у процесі розкопок Вавилону була знайдена дощечка (6 тис. р. до н. е.), де був записаний процес виготовлення пива. Отже, окремі елементи біотехнології (використання у промисловому виробництві клітин мікроорганізмів) з'явилися давно.

Наукова основа біотехнології була закладена у працях Луї Пастера (1872 – 1876) – основоположника мікробіології. У 1814 р. петербурзький академік К.С Кірхгоф відкрив явище біокаталізу і за допомогою ферментів мікроорганізмів намагався одержати цукор із доступної вітчизняної сировини (до середини XIX ст. цукор одержували лише з цукрової тростини). У 1891 р. у США японський біохімік Такаміне отримав перший патент на використання ферментних препаратів у промислових процесах під час виробництва цукру.

На початку XX ст. зроблені перші спроби використання ферментів у різних галузях промисловості: цукровій, текстильній, тютюновій. Академік О.М. Бах започаткував прикладний напрям біохімії – технічну біохімію.

Учений розробив рекомендації щодо покращання технологій обробки різноманітної біохімічної сировини, удосконалення технологій випікання хліба, пивоваріння, виноробства, виробництва чаю і тютюну. Усі ці дослідження, а також прогрес хімічної і мікробіологічної промисловості створили передумови для виникнення сучасної біотехнології.

Основою біотехнології є мікробіологічна промисловість. У 40 – 50 х роках ХХ ст. розпочалася ера антибіотиків, був здійснений синтез пеніциліну.

У 1960 – 1970 рр. розпочався розвиток клітинної інженерії.

У 1973 р. була створена перша рекомбінантна молекула ДНК, виникла генна інженерія. У СРСР у 1970 – 1980 рр. під керівництвом академіка Ю.А. Овчинникова були виконані дослідження з уведення в бактеріальну клітину генів людини (інсуліну, інтерферону, гормону росту). Ю.А. Овчинников створив матеріально-технічну базу біоіндустрії, розробив масовий випуск генно-інженерних біопрепаратів для медицини і ветеринарії.

За останні 40 років можна виділити такі етапи в розвитку біотехнології:

- 1) 70 – 80 роки – поява і розвиток генної і клітинної інженерії (одержані інсулін, соматотропін, інтерферон людини, вакцини);
- 2) 90-ті роки – поява і розвиток агробіотехнології (створені трансгенні рослини і тварини);
- 3) сучасний етап – упровадження постгеномних технологій, тобто методів, заснованих на точних знаннях генетичної структури живих організмів.

Основні дати історії біотехнології

1917 р. – Карл Ерекі ввів термін «біотехнологія»;

1943 р. – здійснено промислове виробництво пеніциліну;

1944 р. – Евері, Мак Леод і Мак Карті встановили, що генетичний матеріал є ДНК;

1953 р. – Дж. Уотсон і Ф. Крік визначили структуру ДНК;

1959 р. – С. Очоа, А. Корнберг одержали Нобелівську премію за відкриття ферментів ДНК-полімераз і лігаз;

1961 – 1966 рр. – розшифровано генетичний код;

1970 р. – виділено фермент рестриктаза;

1973 р. – Г. Бойер і С. Коен розробили технологію рекомбінантних ДНК і здійснили клонування генів;

1975 р. – Р. Келер і С. Мільштейн розробили технологію використання гібридом для одержання моноклональних антитіл;

1976 р. – розроблено методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК (секвенування);

1978 р. – фірма Genentech випустила інсулін людини, одержаний за допомогою трансгенних бактерій *E.coli*;

1980 р. – у США видано перший патент на одержання рекомбінантних мікроорганізмів, що утилізують нафту;

1981 р. – розроблено перші автоматичні синтезатори ДНК;

1983 р. – для трансформації рослин уперше застосовано Ті-плазмідиди;

1985 – 1988 рр. – розроблено метод полімеразної ланцюгової реакції;

1990 – 2003 рр. – здійснено проект «Геном людини»; розшифровано 99% генома людини з точністю 99,99%;

1996 р. – секвенувано геном дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*;

1997 р. – клоновано вівцю Доллі із соматичної клітини;

2004 р. – клонування корів, молоко яких містить гормон росту людини; клонування комах.

Найвагомішими відкриттями біологічної науки ХХ ст. були: визначення ролі ДНК як носія спадкової інформації, розшифрування генетичного коду, розробка технології рекомбінантних ДНК, створення гібридомної технології, секвенування геномів бактерій, дріжджів, нематоди, рослини арабідопсис, людини.

Удосконалення методів мас-спектрометрії, ядерного магнітного резонансу, альфа-променевої кристалографії дозволило здійснити революційний прорив у можливостях кількісної та якісної ідентифікації білків, розумінні структури індивідуальних білків і мультиферментних комплексів. Важливим відкриттям у біології є розшифрування структури нуклеосоми і комплексу РНК-полімерази.

Найбільш значущими досягненнями біотехнології початку ХХІ ст. є розробка високошвидкісних методів секвенування ДНК і потужних обчислювальних засобів для розшифрування геномів, створення карти генома людини.

Розвиток нових технологій дає змогу вченим застосовувати отримані дані про будову генома і розпочати пошук відповідей на принципово нові питання про комплексну природу живих клітин.

На сьогодні пріоритет у розвитку біотехнології належить США. Частка країн у світовому виробництві біотехнологічної продукції становить: США – 42%, країни Євросоюзу – 22%, Китай – 10%, Індія – 2%.

В Україні новаторами біотехнологічних досліджень є:

- Інститут фармакології і токсикології АМН України;
- Київський політехнічний університет;
- Інститут біології клітини НАН України;
- Південно-Східний науковий центр (НТУ «ХПІ», Національний фармацевтичний університет; Інститут кріобіології і кріомедицини НАН України, Інститут низьких температур НАН України).

Об'єкти біотехнології

Об'єктами біотехнології є живі організми, а також їх клітинні компоненти. Біосфера Землі надзвичайно різноманітна. На сьогодні відомо близько 300 000 різних видів рослин, понад 1 млн тварин (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість біологічних видів, що населяють сучасну Землю

Група організмів	Загальна кількість видів	Кількість відомих видів (%)
Тварини (ссавці, птахи, риби)	$3,5 \cdot 10^4$	> 90
Членистоногі / безхребетні	$10^6 - 10^7$	10
Нематоди	$5 \cdot 10^5$	3
Вищі рослини	$2,7 \cdot 10^5$	> 90
Водорості	$10^4 - 10^5$	≈ 70
Мохоподібні	$2,5 \cdot 10^4$	70
Гриби	$1,5 \cdot 10^6$	≈ 5
Бактерії	$10^4 - 10^5$	≈ 1–10
Археї	$10^5 - 10^6$	≈ 0,1–1
Віруси	$10^5 - 10^6$	≈ 4

Основними об'єктами біотехнології є: субклітинні структури (віруси, плазміди, ДНК мітохондрій і хлоропластів, ядерна ДНК), мікроорганізми (бактерії і ціанобактерії, гриби, водорості, найпростіші), клітинні лінії комах, рослин і тварин, багатоклітинні організми (рослини, тварини).

Бактерії і ціанобактерії

Серед бактерій у біотехнологічних дослідженнях найчастіше використовується кишкова паличка *Escherichia coli*. *E.coli* – грамнегативна бактерія родини ентеробактерій, факультативний анаероб. Це непатогенна рухлива бактерія довжиною менш ніж 1 – 2 мкм. Кишкова паличка є

представником нормальної кишкової мікрофлори ссавців, вона також мешкає у ґрунті і воді. Розмножується поділом кожні 22 хв.

У 1922 р. був ізольований штам *E.coli* K-12, який використовується в експериментальних дослідженнях. Цей штам втратив життєздатність у кишечнику людини, він не може розмножуватися і тривалий час існувати за межами лабораторії. Штам *E.coli* K-12 нетоксичний і непатогенний для людини.

E.coli є продуцентом багатьох корисних речовин. Підраховано, що в цитоплазмі *E.coli* знаходиться 200 млн молекул вуглеводів, 30 млн молекул амінокислот, 1 млн молекул (5000 різних типів) білків, 25 млн молекул ліпідів. У кожній бактеріальній клітині міститься 10 000 рибосом.

Бактерії використовуються у промислових виробництвах таких сполук:

- оцту (*Acetobacter* і *Gluconobacter suboxidans*);
- молочнокислих продуктів (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*);
- білка та амінокислот (*Methylomonas*, *Corunebacterium*);
- вітамінів (*Clostridium*);
- розчинників та органічних кислот (*Clostridium*).

Бактерії також використовуються для виробництва біогазу, вилуговування руд й утилізації гірничодобувних відходів, біотрансформації промислових і побутових відходів, фіксації атмосферного азоту. У генній інженерії бактерії використовуються для створення геномних клонотек.

Гриби

Серед еукаріотичних мікроорганізмів у біотехнології найчастіше використовуються дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Це непатогенні мікроорганізми довжиною приблизно 5 мкм. *S. cerevisiae* розмножуються брунькуванням.

У 1996 р. був повністю розшифрований геном *S. cerevisiae*. Встановлено, що більшість генів *S. cerevisiae*, які регулюють клітинний поділ, подібні до людських.

Із 500 відомих видів дріжджів першими почали культивувати *S. cerevisiae* для виробництва спирту. За рік у світі використовують понад 1 млн т цих дріжджів.

У біотехнологічній промисловості гриби використовують для одержання таких продуктів:

- антибіотиків (*Penicillum*, *Streptomyces*);
- гормонів росту рослин – ауксини і гіббереліни (*Fusarium*);
- каротиноїдів (*Rhaffia rhodozima*);
- білка (*Saccharomyces lypolitica*, *Candida*);
- ферментів (*Penicillum*);
- соєвого соусу (*Aspergillus oryzae*);
- сирів на зразок рокфор і камамбер.

Харчові продукти на основі зброджених пліснявими грибами *Rhizopus oligosporus* соєвих бобів або пшениці містять у 5 – 7 разів більше вітамінів (рибофлавін, нікотинова кислота) і у кілька разів більше білка.

Найпростіші

Найпростіші є нетрадиційними об'єктами біотехнології, найчастіше їх використовують як компонент активного мулу під час очищення стічних вод. Найпростіші джгутикові використовуються для біосинтезу ліпідів, евгленові джгутикові є продуцентами полісахаридів.

Представники родів *Astasia* та *Euglena* синтезують полісахарид парамілон (50% від маси клітин) – стимулятор імунної системи для ссавців, що має протипухлинну дію. Евгленові – продуценти глюканів – структурних гетерополісахаридів (містять глюкозу, манозу, ксилозу, арабінозу, рибозу, галактозу, рамнозу, фруктозу, глюкозамін), що використовуються в медицині, харчовій і текстильній промисловості.

Водорості

Основний шлях використання водоростей – одержання білка. В їжу використовують не менш ніж 100 видів водоростей (морська капуста, аларія, порфіра, родименія, хондрус, ундарія). Гідролізати білка одноклітинних водоростей родів *Chlorella* і *Scenedesmus* використовуються в медицині і харчовій промисловості.

Водорості є продуцентами багатоатомних спиртів. Наприклад, одноклітинна водорість *Dunaliella bardawil* у значних кількостях синтезує гліцерол (85% від сухої маси клітини). Бурі водорості синтезують 6-атомний спирт – манніт, що застосовується у харчовій та паперовій промисловості, фармацевтиці, під час виготовлення вибухівок.

Водорості – єдине джерело агару, агароїдів, каррагініна, альгінатів. Червоні водорості (лауренція, грацилярія, гелідіум) використовуються для одержання полісахариду агару. Вміст агару становить 30–40% від маси водоростей.

Бурі водорості – джерело альгінатів – солей альгінової кислоти, що використовуються для виготовлення таких матеріалів:

- якісних мастил для деталей машин;
- медичних препаратів;
- синтетичних волокон і пластика;
- стійких лакофарбових покриттів;
- шовку;
- клейких речовин, будівельних матеріалів;
- харчових продуктів (фруктових соків, морозива).

У сільському господарстві водорості використовуються як добрива, їх біомаса збагачує ґрунт на Фосфор, Калій, Йод, мікроелементи, поповнює бактеріальну азотфіксуючу мікрофлору.

Культури еукаріотичних клітин

Культури еукаріотичних клітин використовуються для вивчення біохімічних властивостей різних тканин, а також як продуценти корисних речовин. Об'єктами біотехнології є клітинні лінії рослин, тварин і людини.

Культури клітин, що здатні до необмеженого росту *in vitro*, називають клітинними лініями. Клітинні лінії використовуються для розмноження вірусів, одержання рекомбінантних білків і вакцин.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні напрями біотехнології. Які з них є пріоритетними?
2. Які наукові відкриття стали передумовами для розвитку сучасної біотехнології?
3. Назвіть найвагоміші досягнення сучасної біотехнології.
4. В яких галузях промисловості використовуються досягнення сучасної біотехнології? Що таке агробіотехнологія?
5. Поясніть, яким чином біотехнологічні методи використовуються у медицині.
6. Поясніть термін «постгеномні технології».
7. Які країни є світовими лідерами у розвитку біотехнології?
8. У яких біотехнологічних процесах використовуються бактерії і гриби?
9. Які речовини одержують з використанням водоростей і найпростіших?
10. З якою метою вирощують культури клітин?

РОЗДІЛ 1. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ

Генна інженерія – це сукупність прийомів, методів і технологій створення рекомбінантних ДНК, виділення генів із клітин, здійснення маніпуляцій з генами і введення їх в інші організми.

Генна інженерія є інструментом біотехнології. Особливістю генної інженерії є здатність створювати структури ДНК, яких ніколи не було в живій природі. Генна інженерія відкрила перспективи створення мікроорганізмів, рослин і тварин з новими корисними властивостями. Одним з важливих напрямів генної інженерії є створення ліків нового покоління, що є біологічно активними білками людини.

Генна інженерія використовує досягнення таких наук, як молекулярна біологія, цитологія, генетика, мікробіологія.

Датою появи генної інженерії вважають 1973 р., коли Г. Бойер і С. Коен створили першу рекомбінантну ДНК, що містила фрагменти ДНК фага λ E.coli і вірусу SV40 мавпи.

Етапи розвитку генної інженерії пов'язані з такими досягненнями:

- створення рекомбінантних молекул ДНК *in vitro* (одержання гібридів плазмід із різних штамів бактерій);
- одержання рекомбінантних молекул ДНК між хромосомними генами прокариот і різними плазмідами;
- введення генів тварин у векторні молекули ДНК.

Основним завданням генної інженерії є конструювання *in vitro* функціонально активних генетичних структур – рекомбінантних ДНК.

В експериментах з рекомбінантною ДНК була одержана основна частина інформації про структуру гена.

Технологія рекомбінантних ДНК включає такі методи:

- виділення нуклеїнових кислот;
- виділення генів;
- хімічний синтез генів;
- створення векторів;
- конструювання рекомбінантної ДНК;
- введення рекомбінантної ДНК у клітини або організми (трансформація);
- ідентифікація клітин, що несуть рекомбінантну ДНК;
- клонування ДНК;

- ампліфікація ДНК;
- секвенування.

Виділення нуклеїнових кислот

Генно-інженерні роботи розпочинаються з одержання препаратів високоочищених нуклеїнових кислот. Сучасні методи виділення нуклеїнових кислот містять такі етапи:

- 1) руйнування клітин;
- 2) інактивація нуклеаз для запобігання розщепленню нуклеїнових кислот;
- 3) очистка виділених нуклеїнових кислот.

Зі зруйнованих клітин одержують хромосоми. Цей процес здійснюють автоматично в цитометрах. Сучасні методи дозволяють одержати за добу $7,5 \cdot 10^7$ індивідуальних хромосом людини.

Під час виділення нуклеїнових кислот до складу буферних розчинів для руйнування клітин вводять інгібітори нуклеаз. Як інгібітори нуклеаз використовують неспецифічні денатуруючі агенти (іонні детергенти, гуанідинхлорид, фенол, хлороформ), а також специфічні інгібітори (ванадієві комплекси рибонуклеозидів або інгібітор РНКазизі із плаценти людини).

Для відокремлення домішок РНК від ДНК використовують високоочищені препарати ферментів РНКаз (найчастіше панкреатичну РНКазу), а під час виділення РНК – препарати ДНКаз. У процесі використання методів виділення ДНК із тканин тварин одночасно виділяється мітохондріальна та ядерна ДНК. Якщо необхідно виділити ядерну ДНК, спочатку одержують ядра клітин, якщо мітохондріальну – мітохондрії.

Для очищення ДНК від білків (депротеїнізації) застосовують протеолітичні ферменти (протеїназу К із *Trirachium album* або протеїназу із *Streptomyces griseus*), фенол, хлороформ.

Для додаткового очищення плазмідної ДНК іноді застосовують гель-фільтрацію або електрофорез в агарозному гелі. Для очищення еукаріотичної мРНК застосовують метод афінної хроматографії на оліго(dT)-целюлозі.

Ферменти рестрикції і модифікації нуклеїнових кислот

Рестриктази використовують для виділення фрагментів ДНК. Рестриктази – це високоспецифічні ферменти. Вони розрізають

полінуклеотидний ланцюг у специфічних ділянках – сайтах рестрикції. Ідентифіковано понад 900 рестриктаз. Рестриктази руйнують вірусні ДНК. Власна бактеріальна ДНК захищена від рестриктаз наявністю метильних груп у складі азотистих основ.

Назви рестриктаз утворюються з перших літер видових назв бактерій, у яких вони були виявлені. Наприклад, EcoR – E.coli. Цифри, що розташовуються за літерами, вказують на послідовність відкриття рестриктаз у клітинах бактерій одного виду, наприклад EcoR I, EcoR II. Крім EcoRI, EcoRII із бактеріальних клітин були виділені сотні рестриктаз.

ДНК-метилази здійснюють метилування ДНК. E.coli містить 2 типи ДНК-метилаз: Dam-, Dcm-метилази. Dam-метилази здійснюють метилування N₆-положення аденіну в послідовності ГАТЦ, Dcm-метилази метилують C₅ цитозину в послідовностях ЦЦАГГ і ЦЦТГГ. Метилування ДНК захищає її від руйнування під дією рестриктаз.

ДНК- і РНК-лігази беруть участь у процесах реплікації, репарації, рекомбінації нуклеїнових кислот. За допомогою лігаз фрагменти нуклеїнових кислот з'єднуються між собою. Найбільше застосовується ДНК-лігаза бактеріофага T4.

ДНК-полімерази найчастіше використовуються серед інших ферментів матричного синтезу ДНК. ДНК-полімерази каталізують синтез ДНК. Розрізняють кілька типів ДНК-полімераз у прокариот та еукаріот. Найбільше застосовується ДНК-полімераза I E.coli. У методі ПЛР використовують Taq-полімеразу, виділену із термофільних мікроорганізмів.

Зворотні транскриптази (ревертази) використовуються для синтезу комплементарної ДНК на основі РНК.

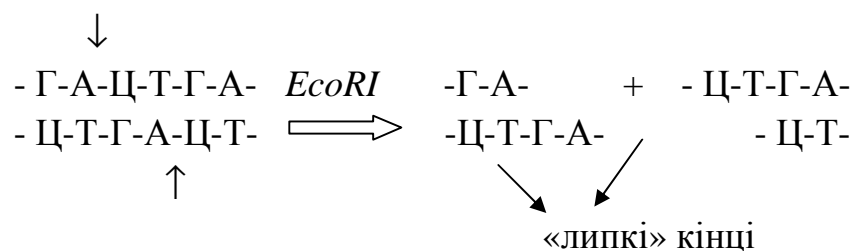
Урацил-ДНК-глікозидази ліквідують залишки урацилу в ДНК, що утворюються в результаті окиснювального дезамінування цитозину.

Виділення генів

Для розуміння молекулярних механізмів функціонування окремих генів і взаємопов'язаних генетичних систем велике значення має робота з ізольованими генами. Такі дослідження дозволяють установлювати розміри генів, виділяти їх у чистому вигляді, ідентифікувати елементи структури, важливі для функціонування.

Першим етапом у виділенні генів є розрізання рестриктазами ДНК на невеликі фрагменти. Рестриктази розщеплюють полінуклеотидний ланцюг у специфічних ділянках – сайтах рестрикції. Як правило, сайти рестрикції є паліндромними послідовностями, в яких спостерігається подвійна симетрія (у напрямку 5'→3' послідовності нуклеотидів ідентичні). Відомо понад 200 унікальних послідовностей ДНК, що розпізнаються специфічними рестриктазами. Ферменти рестрикції здійснюють непрямий розріз через обидва ланцюги ДНК, а ступінчатий, у результаті чого утворюються «липкі» кінці, які можуть легко з'єднуватися один з одним.

Наприклад,



Якщо змішати два фрагменти ДНК з ідентичними «липкими» кінцями, то вони з'єднуються. Лінійні «липкі» кінці з'єднуються водневими зв'язками. Для ковалентного з'єднання розривів використовують фермент ДНК-лігазу бактеріофага T₄ (каталізує утворення 3',5'-фосфодіестерного зв'язку).

За допомогою ферментів рестрикції хромосому ДНК і ДНК плазмиди вдається перевести в лінійну форму, а згодом їх фрагменти з'єднати.

Хімічний синтез ДНК і конструювання генів

Найпоширенішим методом хімічного синтезу ДНК є фосфорамідний. Вихідними речовинами є модифіковані дезоксирибонуклеозиди. Модифікація полягає у приєднанні до аміногруп дезоксиаденозина і дезоксицитидина бензольної групи, а до аміногрупи дезоксигуанозина – ізобутирильної. Тимідин, у якого відсутня аміногрупа, не модифікують. Модифікація азотистих основ необхідна для захисту нуклеозидів від небажаних побічних реакцій під час нарощування полінуклеотидного ланцюга.

Розроблено прилади для автоматичного хімічного синтезу ДНК – ДНК-синтезатори, які синтезують одноланцюгові фрагменти ДНК довжиною до 50 нуклеотидів. За добу синтезується ДНК довжиною 100 – 120 пар азотистих основ. Синтезовані хімічним шляхом олігонуклеотиди

можна використовувати для конструювання генів, ампліфікації специфічних ДНК, направлених мутацій ізольованих ДНК, як зонди для ДНК-гібридизації, праймерів.

Конструювання генів здійснюють з олігонуклеотидів, синтезованих хімічним шляхом. У цьому процесі використовують ферменти ДНК-полімерази I *E.coli* і ДНК-лігазу. Гени довжиною понад 300 пар нуклеотидів збирають з окремих модулів – одноланцюгових фрагментів довжиною 20 – 100 нуклеотидів. Гени, довжина яких перевищує 1000 пар нуклеотидів, конструюють із дволанцюгових фрагментів.

Вектори

Вектори – молекули ДНК, що використовуються для перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Ідеальна векторна молекула повинна володіти такими властивостями:

- тривалий час існувати в популяції клітин-реципієнтів;
- мати біохімічні або генетичні маркери, що дозволили б виявити наявність вектора у клітинах;
- структура векторної молекули повинна допускати вбудовування в неї чужорідної послідовності нуклеотидів без порушення її функціональної цілісності.

Як вектори використовують плазміди, косміди, хромосоми вірусів, штучні хромосоми бактерій, бактеріофагів, дріжджів, ссавців (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика різних векторів для клонування ДНК

Вектор	Джерело	Структура	Розмір вставки (тис. п. н.)
Плазміди	<i>E.coli</i>	Кільцева	0,1 – 10
Хромосома фага λ	<i>E.coli</i>	Лінійна	5 – 25
Косміди	<i>E.coli</i>	Кільцева	35 – 45
Штучні хромосоми бактерій (ВАС)	<i>E.coli</i>	Кільцева	до 300
Штучні хромосоми бактеріофагів (РАС)	<i>E.coli</i>	Кільцева	100 – 300
Штучні хромосоми дріжджів (УАС)	<i>S.cerevisiae</i>	Лінійна хромосома	100 – 2000
Штучні хромосоми ссавців (МАС)	Клітини ссавців	Лінійна або кільцева	41000

Плазмідні вектори найчастіше використовуються в генній інженерії. Плазмідні – це позахромосомні дволанцюгові кільцеві молекули ДНК, що автономно реплікуються. У клітині плазмідні працюють як ген, здійснюючи синтез нових білків.

Першу плазмідну відкрили Дж.Дж. Келлі, Г.О. Сміт та К. Уілкокс у 1968 р. Американський біохімік Стенлі Коен висловив припущення про те, що плазмідні можна використовувати для перенесення генів. Проведено експерименти з плазмідними різних видів бактерій. Учені створили рекомбінантні плазмідні з фрагментів плазмід золотистого стафілокока *Staphylococcus aureus* (стійкість до пеніциліну) і кишкової палички *E.coli* (стійкість до тетрацикліну). Гібридні плазмідні ввели в клітини *E.coli*, отриманий штам був стійким до пеніциліну і тетрацикліну. Цей експеримент довів, що можна здійснювати перенесення генетичної інформації між різними видами організмів.

Плазмідні є практично у всіх бактерій. Головна хромосома бактерій містить 1000–5000 генів. Плазмідні містять менш ніж 5% генетичної інформації (50–250 генів). Одні з них містять гени, що забезпечують їх перенесення з однієї клітини в іншу (F-плазмідні), інші містять гени стійкості до антибіотиків (R-плазмідні) або гени, що забезпечують утилізацію ксенобіотиків (плазмідні деградації). Розмір плазмід може бути менше 1 і більше 500 тис. п. н.

Деякі плазмідні представлені в клітинах 10–100 копіями, які називаються висококопійними. Низькокопійні плазмідні містяться у клітинах у кількості 1 – 4 копії. Частка плазмідної ДНК становить 0,1–5% від загального вмісту ДНК у клітині.

Плазмідні серії pBR використовуються як основа для конструювання плазмідних векторів. Ці плазмідні створені на основі природної плазмідні, що дає клітинам *E.coli* стійкість до коліцину. Недоліком плазмідних векторів є їх мала ємність.

Вектори на основі хромосоми бактеріофага λ використовують, якщо необхідно вбудувати великий фрагмент ДНК. Молекула ДНК бактеріофага λ має довжину близько 45 тис. п. н., усередині молекули розміщується ділянка довжиною 15 тис. п. н., яку можна замінити на будь-який фрагмент ДНК. У вектори на основі хромосоми бактеріофага λ можна вбудовувати фрагменти ДНК довжиною 15–25 тис. п. н.

Вірусні вектори застосовуються в експериментальній генній терапії під час лікування людей. Недоліком векторів на основі хромосоми бактеріофага λ є те, що генетичний матеріал вбудовується в будь-які ділянки молекули ДНК, процес перенесення генів важко контролювати.

Косміди – це невеликі плазміди, в які *in vitro* введені *cos*-сайти ДНК бактеріофага λ . *Cos*-сайти розміщуються на відстані 35–45 тис. п. н. один від одного, між *cos*-сайтами міститься весь геном фага, він може бути замінений на аналогічний за довжиною фрагмент чужорідної ДНК. Косміди можуть включати до 40 тис. п. н. чужорідної ДНК і при цьому активно ампліфікуватися в клітинах *E.coli*.

Фазміди – це векторні молекули ДНК, що містять генетичні елементи плазмід і хромосом бактеріофагів.

Штучні хромосоми – це дволанцюгові молекули ДНК з теломерами на кінцях, центромерою і сайтами зв'язування для ДНК-полімерази. З метою введення великих фрагментів ДНК у диференційовані та ембріональні клітини створено штучні хромосоми бактерій (ВАС – bacterial artificial chromosome), бактеріофагів (РАС – P1 phage-derived artificial chromosome), дріжджів (УАС – yeast artificial chromosome), ссавців (МАС – mammalian artificial chromosome) і людини (НАС – human artificial chromosome).

Найчастіше застосовують бактеріальні штучні хромосоми, створені у 1992 р. Основою їх є F-плазміда *E.coli*, бактеріальні теломери та центромера. Ці структури дозволяють уводити в клітину великий фрагмент ДНК довжиною до 300 тис. п. н. Бактеріальні штучні хромосоми достатньо стабільні в бактеріальному геномі, під час росту і розмноження бактерій штучні хромосоми реплікуються.

Над створенням перших штучних хромосом на основі дріжджів працювали А. Мюрей і Дж. Шостак (1983) та Д. Берк (1987). Такі штучні хромосоми можуть включати ще більший обсяг генетичного матеріалу – фрагмент ДНК довжиною до 1 млн п. н. Недоліком їх є менша стабільність порівняно з бактеріальними штучними хромосомами.

Штучні хромосоми тварин і людини дають змогу вводити в них цілі генетичні локуси й одержувати експресію відповідних генів у культурі клітин чи трансгенних тваринах. Перші штучні хромосоми людини створено у 1997 р. Штучні хромосоми не вбудовуються в геном клітини. У середині клітини вони функціонують як автономні мініхромосоми, здійснюючи експресію генів. Штучні хромосоми вводять у клітини шляхом електропорації. Під дією

електричних імпульсів у клітинній мембрані утворюються пори, через які штучні хромосоми проникають усередину клітини.

Методи введення рекомбінантної ДНК у клітини

Існують 4 групи методів введення рекомбінантної ДНК:

- хімічні (використання ліпосом, іонів металів та інших хімічних реагентів);
- фізичні (електропорація, лазерне опромінення);
- механічні (мікроін'єкція, балістична трансформація);
- біологічні методи (перенесення генів у процесі вірусної інфекції – трансфекція).

Процес поглинання клітинами екзогенної ДНК називається трансформацією.

Ефективність трансформації визначають як число трансформантів на 1 мкг уведеної ДНК. Сучасні методи трансформації бактеріальних клітин дозволяють одержати до 10^7 – 10^8 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК.

Клітини, що здатні поглинати чужорідну ДНК, називають компетентними. Кількість компетентних клітин можна збільшити, використовуючи спеціальне поживне середовище або умови культивування.

Частоту трансформації і трансфекції клітин *E.coli* можна підвищити різними способами: тепловий шок, дія іонів металів (Ca^{2+} , Rb^+).

Якщо клітини *E.coli* обробити CaCl_2 за температури 0°C , а потім підвищити температуру до 42°C і витримувати протягом 1,5 хв, відбувається локальне пошкодження клітинної стінки. Цей метод забезпечує частоту трансформації 10^3 (на 1000 клітин 1 трансформована).

Для введення рекомбінантної ДНК у клітини тварин і людини використовують ліпосоми. Ліпосоми проникають усередину клітин шляхом ендоцитозу.

Електропорація (короткочасний вплив електричного поля протягом 10 мікросекунд – 100 мілісекунд) дозволяє одержати 10^9 – 10^{10} трансформантів на 1 мкг ДНК. Під дією електричного струму збільшується проникність клітинних мембран. Електропорацію використовують для введення в *E.coli* бактеріальних штучних хромосом. Умови проведення електропорації для різних бактерій відрізняються. Ефективність

трансформації для коротких плазмід становить 10^9 , а для довгих (135 тис. п. н.) – 10^6 .

Лазерне опромінення застосовують для створення мініпор (діаметр 2–120 нм) у мембранах клітин-реципієнтів рекомбінантної ДНК.

Мікроін'єкції рекомбінантної ДНК здійснюють за допомогою мікроманіпуляторів, оснащених скляними мікрокапілярами, якими проколюють мембрани клітин. Цей метод інтенсивно застосовується під час створення трансгенних тварин. Великі фрагменти ДНК уводять безпосередньо в ядра клітин. З усіх методів трансформації лише мікроін'єкція дозволяє вводити в клітини дозовану кількість молекул ДНК.

Бомбардування клітин мікрочастинками вольфраму, золота або льоду, на поверхні яких міститься рекомбінантна ДНК, називають балістичною трансформацією. Цей метод дозволяє вводити ДНК не лише в ядра, а й у мітохондрії і хлоропласти. Балістична трансформація використовується в генотерапії, для імунізації організму за допомогою ДНК-вакцин, а також для одержання трансгенних рослин і тварин.

Найчастіше в генній інженерії застосовуються біологічні методи введення рекомбінантної ДНК, за яких перенесення генів здійснюється у процесі вірусної інфекції.

Для ідентифікації трансформованих клітин використовують такі методи:

- тестування на резистентність до певних антибіотиків;
- гібридизація із зондом, комплементарним певній ділянці необхідного гена;
- імунологічні тести, виявлення специфічного білка – продукту клонованого гена.

Для перевірки експресії вбудованих генів використовують так звані **репортні гени**, продукти експресії яких легко виявити. Найчастіше як репортні гени використовують ген зеленого флуоресцентного білка (GFP) або ген β -галактозидази. β -галактозидаза розщеплює штучний субстрат Xgal (5-бром-4-хлор-3-індоліл-D-галактопіранозид) з утворенням продукту реакції блакитного кольору. Бактеріальні колонії, що містять рекомбінантні плазміди з геном β -галактозидази, забарвлені у блакитний колір.

Клонування генів. Клонотеки генів

Клоном називають сукупність ідентичних копій, утворених з одного попередника. Клони генів використовують для вивчення їх структури.

Суть клонування полягає у введенні ділянки ДНК у бактеріальну клітину, де вона реплікується. Одна клітина забезпечує утворення колонії, яка містить велику кількість ідентичних клітин: наприклад, під час вирощування на агарі за одну ніч клітина *E.coli* утворює 10^7 клітин в одній колонії. Отже, за допомогою бактеріальних клітин забезпечується синтез значної кількості копій необхідних генів.

Етапи клонування генів:

- розщеплення ДНК рестриктазами;
- обробка рестриктазами вектора для клонування;
- з'єднання двох фрагментів ДНК за допомогою ДНК-лігази фага T₄;
- трансформація клітин-реципієнтів;
- ампліфікація ДНК у трансформованих клітинах.

Клонотека генів – це набір різних послідовностей нуклеотидів ДНК, клонованих у складі векторних молекул, які в сумі утворюють увесь геном організму.

Для створення клонотеки генів рекомбінантну ДНК упаковують у фаги та інфікують ними бактерії. Чим коротші фрагменти ДНК для клонотек генів і чим складніший досліджуваний геном, тим більшу кількість клонів необхідно одержати, щоб клонотека була повною. Наприклад, щоб створити геномну клонотеку із фрагментів ДНК довжиною 20 тис. п. н. (будь-яка послідовність представлена з вірогідністю 99%), для бактерій необхідно мати 460 клонів, для ссавців – 600 000, для покритонасінних рослин – кілька мільйонів.

Розмір клонотеки, що містить з необхідною вірогідністю будь-яку послідовність генома, можна обчислити за формулою:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f),$$

де **N** – кількість необхідних клонів;

P – вірогідність того, що клонотека містить необхідну послідовність ДНК;

f – частка генома, представлена в кожному клоні (розраховується як відношення середнього розміру вставки до розміру генома).

Клонотеки, одержані з використанням бактеріальних клітин, зберігають за температури -70°C у вигляді суспензії у 30% розчині гліцеролу, а суспензії фагових частинок – у диметилсульфоксиді. Це запобігає руйнуванню клітин бактерій і фагів під час заморожування і відтавання.

Клонотеки кДНК

Комплементарна ДНК (кДНК) – це ДНК, синтезована на основі мРНК за участі ферменту зворотної транскриптази.

кДНК, на відміну від геномної ДНК, не містить інтронів. Ця відмінність має практичне значення. Клони кДНК використовуються при одержанні інсуліну людини або інших білків в клітинах *E.coli*.

Спочатку з клітин людини виділяють мРНК. Особливістю структури молекули мРНК еукаріот є наявність послідовності з аденілових нуклеотидів (полі-(А)-хвіст). Виділити мРНК можна, якщо препарат РНК пропустити через колонку з інертною матрицею, що несе тимін. рРНК і тРНК швидко проходять через колонку, а мРНК зв'язується з нею за рахунок утворення водневих зв'язків А-Т між хвостом і лігандом. мРНК можна елюювати, використовуючи розчини низької іонної сили.

Схема синтезу кДНК наведена на рис. 1.1.

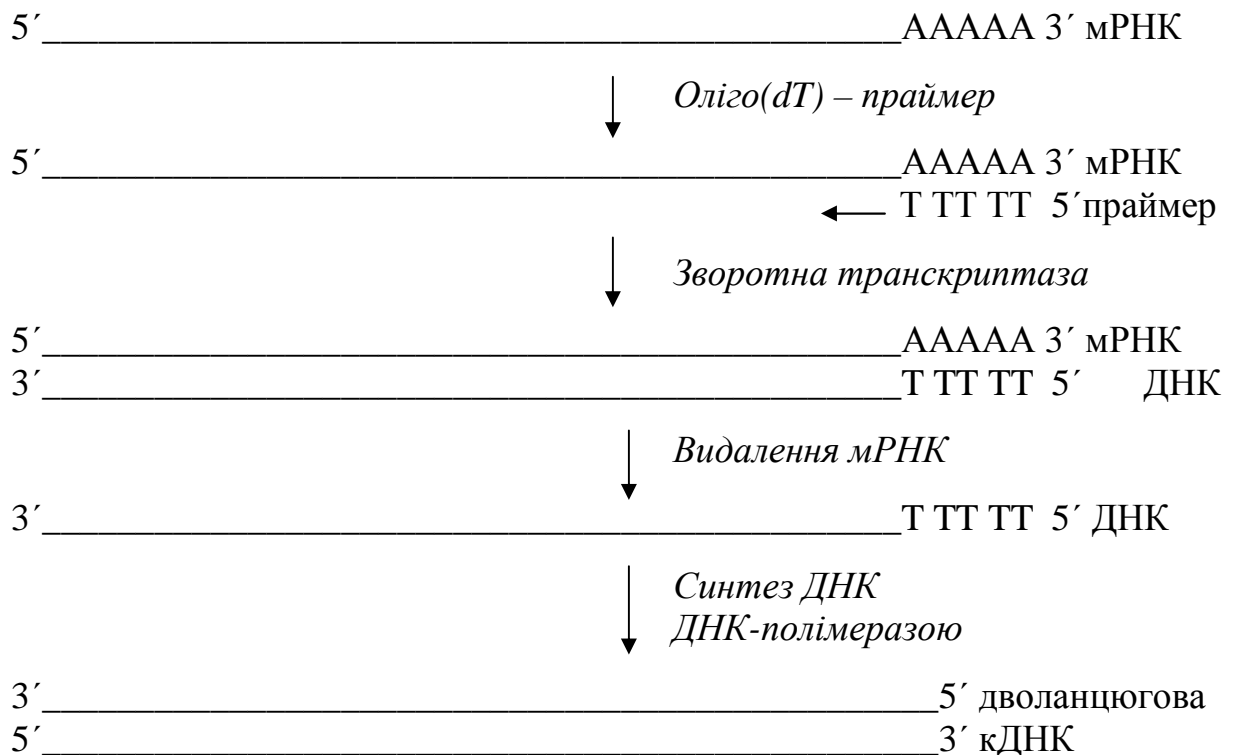


Рис. 1.1. Синтез кДНК на основі мРНК за участі зворотної транскриптази

Для клонування молекул кДНК як вектори використовують фаг λ або плазміди. Молекули кДНК не мають «липких» кінців, проте розроблено методи приєднання «липких» кінців до них.

Уведення кДНК у клітини бактерій забезпечує синтез значної кількості її копій. Клонування є одним із способів ампліфікації нуклеотидних послідовностей ДНК.

Системи експресії рекомбінантних генів

У процесі використання систем експресії рекомбінантних генів ураховують такі їх найважливіші молекулярно-біологічні особливості:

- тип промотору і термінатора транскрипції;
- міцність зв'язування мРНК з рибосомою;
- число копій клонованого гена і його локалізація (у плазміді або у хромосомі клітини-хазяїна);
- локалізація синтезованого продукту;
- ефективність трансляції в організмі хазяїна;
- стабільність продукту в клітині-хазяїні.

Як системи експресії рекомбінантних білків застосовуються клітини бактерій, дріжджів, культури еукаріотичних клітин, позаклітинні білоксинтезуючі системи, проточні системи.

Бактерії E.coli синтезують велику кількість ферментів (гідролаз), мають високоефективні механізми для фолдинга і секреції ферментів. Проте в бактеріальних клітинах відсутні системи посттрансляційних модифікацій білків, тому в них не можуть бути одержані біологічно повноцінні білки еукаріот. Відомо більш ніж 500 посттрансляційних змін білків, основними з яких є такі:

- утворення дисульфідних зв'язків;
- частковий протеоліз – видалення пептиду з N-кінця білкової молекули з утворенням активного білка;
- глікозилювання – приєднання специфічного вуглеводного залишку;
- модифікація амінокислот у складі білка (фосфорилування, ацетилювання, карбоксилювання, сульфування).

Прокаріоти не можуть здійснювати глікозилювання і модифікацію специфічних амінокислот. У зв'язку з цим для синтезу білків людини переважно використовують клітини еукаріот.

Клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* використовуються для синтезу білків людини, тварин і рослин. За допомогою метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris*, для яких джерелом Карбону є метанол, одержують понад 300 рекомбінантних білків. Уперше для синтезу білків людини і тварин метилотрофні дріжджі почали використовувати у 1984 р.

Культури клітин, що застосовуються для синтезу рекомбінантних білків:

- клітини яєчників китайських хом'ячків (лінія CHO);
- клітини мієломи мишей (лінія SP 210);
- клітини селезінки мишей (лінія MEL);
- клітини африканської зеленої мартишки (лінія COS);
- клітини комах, інфіковані бакуловірусами.

Особливістю клітин комах є здатність здійснювати посттрансляційні модифікації білків, але вони дещо відмінні від модифікацій у клітинах ссавців. Найчастіше використовуються клітинні лінії IPLB-Sf-21-AE із *Spodoptera frugiperda* і VTI-TN-5B1-4 з *Trichopsula ni*.

Порівняння бактерій, клітин дріжджів, комах, ссавців, людини, трансгенних рослин і тварин як систем експресії рекомбінантних генів подано у табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Можливості виробництва людських білків на основі технології рекомбінантної ДНК

Спосіб виробництва	Сучасний стан	Переваги	Недоліки
У бактеріях	Методи первинного виробництва	Бактерії легко вирощувати в культурі	Відсутня посттрансляційна модифікація білків
У клітинах дріжджів	Широко застосовується	Білки синтезуються у формі, ближчій до людської	Важче культивувати, ніж бактерії. Для одержання білка клітини дріжджів необхідно зруйнувати
У клітинах ссавців	Використовують гібридами	Білки синтезуються у формі, найближчій до людської	Важко вирощувати клітини у культурі; можливе забруднення вірусами або пріонами
У клітинах людини	Триває розробка	Білки синтезуються у необхідній для людини формі	Високий ризик забруднення вірусами і пріонами; необхідна генно-інженерна

			модифікація клітин, що забезпечує можливість їх культивування
У клітинах комах	Триває розробка	Висока швидкість виробництва	Триває розробка методів культивування клітин комах
У трансгенних тваринах	Продукти синтезу поки що не застосовуються у медицині	Невисока собівартість порівняно з методом культури клітин	Повільний ріст тварин; можливий негативний вплив препаратів на організм тварин; можливе забруднення вірусами або пріонами
В яйцях трансгенних курей	Ранні стадії розробки	Швидкий ріст і розвиток курей; легко одержувати рекомбінантний білок; кури захищені від дії препаратів	Триває розробка технологій одержання трансгенних яєць
У трансгенних рослинах	Деякі продукти використовуються для лікування, інші проходять розробку	Невисока собівартість; препарати нетоксичні для рослин	Можлива міграція трансгенів у дикі популяції

Клітини з порушеною проникністю зовнішніх мембран

За механізмом дії і властивостями ці клітини займають проміжне положення між системами трансляції живих клітин і позаклітинними білоксинтезуючими системами. Для одержання клітин з порушеною проникністю мембран клітини тварин вирощують у культурі й обробляють детергентом дигітоніном. Клітини з напівпроникними мембранами використовуються для дослідження процесів секреції білків.

Позаклітинні білоксинтезуючі системи використовуються для дослідження механізмів експресії клонованих генів *in vitro*, одержання рекомбінантних білків. Перевагою цих систем є доступність їх окремих компонентів для експериментальної дії. Позаклітинні білоксинтезуючі системи дозволяють вивчати вплив різних екзогенних факторів (рН, активатори, інгібітори) на їх функціонування.

Розрізняють 2 типи позаклітинних білоксинтезуючих систем:

1) прокаріотичні системи (на основі екстрактів клітин *E.coli*) містять такі компоненти: рибосоми, фактори трансляції, мРНК, тРНК, амінокислоти, ГТФ, K^+/NH_4^+ , Mg^{2+}/Ca^{2+} , буфери;

2) еукаріотичні системи одержують із ретикулоцитів кролів, зародків пшениці (тривале зберігання), соматичних клітин різного походження.

Позаклітинні системи існують короткий час (40–60 хв) і забезпечують малий вихід синтезованого білка (1 мкг / 1 мл екстракту), на 1 молекулу мРНК синтезуються 1–2 молекули поліпептиду.

Проточні системи

У 1988 р. російський учений О.С. Спирін розробив ефективну проточну білоксинтезуючу систему. Екстракти бактеріальних або еукаріотичних клітин поміщають в ячейку, оточену з обох боків напівпроникними мембранами. Розмір пор дозволяє проходити через мембрани низькомолекулярним речовинам і невеликим за розміром білкам. Вміст ячейки з компонентами для безклітинної трансляції інкубують за звичайної температури. Причому з одного боку у таку ячейку-реактор зі швидкістю 1 мл/год неперервно надходять інгредієнти, що використовуються під час біосинтезу білка (амінокислоти, АТФ, ГТФ), а з другого – із неї виходять синтезовані білкові продукти.

У проточних системах біосинтез білка може здійснюватися неперервно протягом кількох годин. Ефективність трансляції досить висока: на одну молекулу мРНК синтезуються сотні копій поліпептидних ланцюгів. Сумарний вихід рекомбінантного білка становить 200 мкг і більше на 1 мл екстракту.

За допомогою проточних білоксинтезуючих систем стало можливим здійснювати біосинтез рекомбінантних білків у препаративних кількостях *in vitro*. Така система дозволяє синтезувати поліпептиди, що підлягають швидкій внутрішньоклітинній деградації протеїназами, або білки з цитотоксичною активністю. У проточних системах можна одержувати препаративні кількості функціонально активного інтерлейкіна-6 людини.

Полімеразна ланцюгова реакція як метод ампліфікації ДНК

Процес утворення додаткових копій нуклеотидних послідовностей ДНК називають **ампліфікацією**.

Ампліфікацію ДНК здійснюють шляхом клонування або за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР є ефективним методом одержання *in vitro* великої кількості копій специфічних нуклеотидних послідовностей.

У 1985 р. К.Б. Мюлліс опублікував і запатентував метод ПЛР, а через 7 років одержав Нобелівську премію з хімії.

Найважливіші характеристики методу ПЛР:

- специфічність реакції;
- точність синтезу ДНК;
- ефективність.

Для проведення ПЛР необхідні такі компоненти:

- 2 синтетичних праймери довжиною 15 – 30 п. н.;
- ДНК-матриця довжиною від 100 до 35000 п. н.;
- термостабільна ДНК-полімераза Таq;
- 4 дезоксирибоуклеотиди: dATФ, dГТФ, dЦТФ, dТТФ.

ПЛР – це циклічний процес. Кожен цикл має такі етапи:

- 1) денатурація ДНК ($t\ 95^{\circ}\text{C}$);
- 2) ренатурація – приєднання праймерів до ДНК-матриці ($t\ 55^{\circ}\text{C}$);
- 3) синтез ДНК – Таq-полімераза добудовує комплементарні ланцюги ДНК ($t\ 72 - 75^{\circ}\text{C}$).

Схема процесу ПЛР зображена на рис. 1.2.

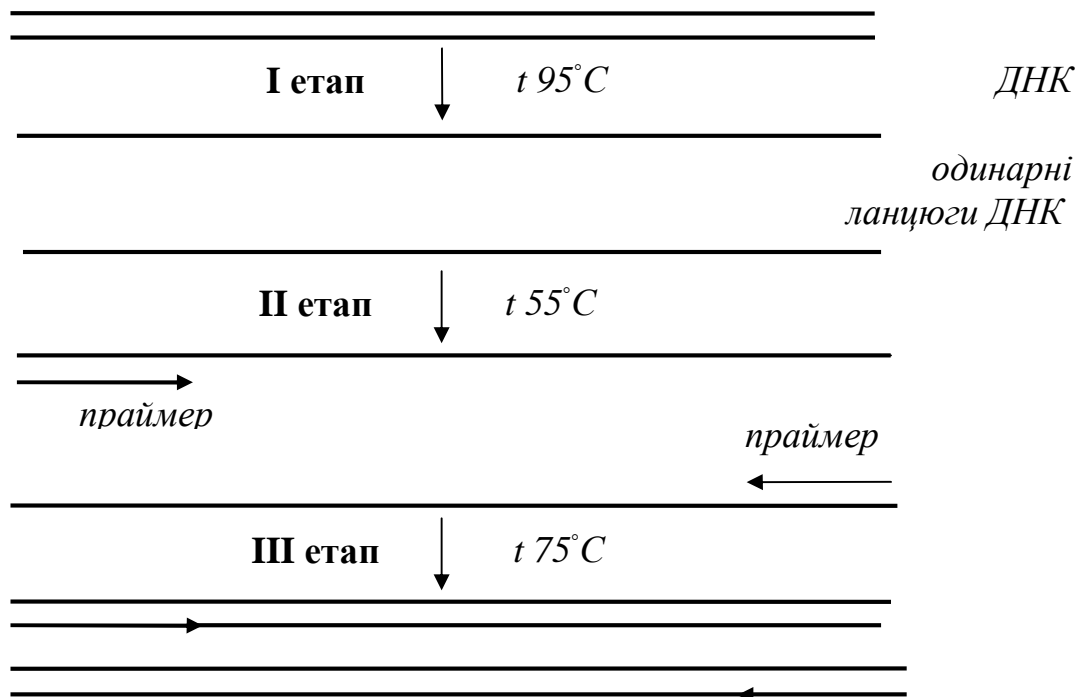


Рис. 1.2. Схема процесу ПЛР

Першому циклу ПЛР передуює інкубація суміші за $t\ 92 - 96^{\circ}\text{C}$ протягом 0,5 – 10 хв, що супроводжується інактивацією домішок білків. Під час короткочасного нагрівання (протягом 1 – 2 хв) відбувається плавлення ДНК, ланцюги ДНК відокремлюються один від одного. Під час охолодження до

температури 37 – 65°C праймери з'єднуються з комплементарними ділянками ДНК, Таq-полімераза синтезує нові ланцюги ДНК. Для здійснення синтезу ДНК температуру підвищують до 72°C. Після завершення стадії синтезу ДНК цикл ПЛР повторюють в автоматичному режимі. Кожний цикл ПЛР триває 3 – 5 хв, повторюється 30 раундів. Після завершення кожного циклу кількість ДНК подвоюється, досягаючи кількох мкг у реакційній суміші об'ємом 25 – 50 мкл. Стандартний об'єм проби, в якій здійснюється ПЛР, становить 20 – 100 мкл. Під час ПЛР кількість ДНК збільшується, поки не досягне 10^{12} , а потім різко зменшується внаслідок вичерпання субстратів реакції і праймерів. Після завершення останнього циклу ПЛР проби витримують 5 – 10 хв за температури 72°C.

У ПЛР використовують Таq-полімеразу, що стійка до дії високих температур. Цей фермент був виділений із термофільних бактерій *Thermus aquaticus*, які мешкають у гарячих джерелах. Термостабільна Таq-полімераза проявляє активність за температури 95°C і вище.

Л.І. Патрушев одним із перших дослідників у Росії одержав високопродуктивний бактеріальний штам-продуцент термостабільної Таq-полімерази і розробив ефективні методи її очищення (із 100 г біомаси бактерій одержують 2 млн одиниць активності високоочищеного ферменту).

Метод ПЛР дозволяє збільшувати кількість фрагментів ДНК у мільйон разів. За допомогою ПЛР можна ампліфікувати *in vitro* сегменти ДНК довжиною від 0,1 до 5–7 тис. п. н. і більше. Із геномної ДНК 1 – 2 соматичних клітин можна отримати 10^2 – 10^5 копій ДНК. Таким чином, ПЛР – це альтернативний метод молекулярного клонування коротких фрагментів ДНК.

Сфери застосування ПЛР:

- діагностика інфекційних захворювань (виявлення патогенних мікроорганізмів у біологічному матеріалі);
- отримання великої кількості специфічних фрагментів ДНК (ампліфікація);
- синтез генів;
- секвенування ДНК;
- виявлення в генах спонтанних мутацій, що призводять до спадкових захворювань.

Цей метод важливий для судової медицини і діагностики генетичних аномалій плода *in utero*. Для виявлення генних дефектів здійснюють рестрикційний аналіз: ДНК розрізається ферментами рестрикції, одержані

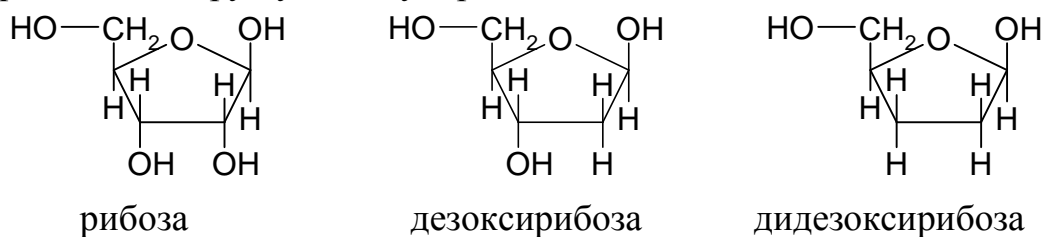
фрагменти розділяються за допомогою гель-електрофорезу, електрофоретичні полоси утворюють певну картину. Якщо є мутації, картина полос змінюватиметься.

У 1992 р. Т. Сано вперше розробив метод імуноПЛР – найбільш чутливий метод виявлення білків та інших антигенів. Чутливість цього методу у 1000 разів перевищує чутливість імуноферментних методів аналізу. Як зонди для виявлення антигенів використовують кон'югати фрагментів ДНК з антитілами. Якщо в біологічному зразку присутній антиген, він з'єднується з антитілом, сигнал передається на ДНК і здійснюється ПЛР. Отже, синтез ДНК свідчить про наявність антигенів.

Методи секвенування ДНК

Процес визначення нуклеотидної послідовності фрагмента ДНК називають **секвенуванням**.

Найпоширенішим методом секвенування є дидезоксинуклеотидний. Назва методу походить від терміна «дидезоксинуклеотид». Дидезоксинуклеотид – дезоксинуклеотид, позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп у молекулі рибози.



Відомо, що синтез ДНК відбувається за рахунок приєднання нуклеозидтрифосфату до 3'-ОН-групи нуклеотида. Приєднання дидезоксинуклеотида зупиняє процес нарощення полінуклеотидного ланцюга, оскільки дидезоксинуклеотид не містить 3'-ОН-групи.

Для секвенування в різних пробірках одночасно проводять 4 реакції синтезу ДНК на матриці, послідовність нуклеотидів якої визначають. Кожна реакція здійснюється у присутності одного із 4-х дидезоксинуклеотидів. Інкубація призначеної для секвенування одноланцюгової ДНК із праймером, ДНК-полімеразою I, dATФ, dГТФ, dЦТФ, dТТФ забезпечує копіювання фрагмента ДНК. Один із трифосфатів повинен бути радіоактивним, синтезовані ДНК є міченими. В кожній з пробірок синтезується унікальний набір олігонуклеотидів.

Для розділення молекул ДНК використовують електрофорез: молекули ДНК рухаються в електричному полі вздовж пластини поліакриламідного гелю зі швидкістю, залежною від довжини ланцюга – чим коротший ланцюг ДНК, тим швидше він рухається. Кожне приєднання нуклеотида змінює рухливість ланцюга. Ланцюгам з різною рухливістю відповідають полоси, які ідентифікують за допомогою радіоавтографії.

За допомогою спеціальних приладів (секвенаторів) процес секвенування ДНК здійснюють автоматично.

Секвенування довгих нуклеотидних послідовностей

За допомогою праймера і дидезоксиметоду секвенують перші 250 – 300 нуклеотидів. За результатами секвенування синтезують другий праймер і визначають послідовність наступних 250–300 нуклеотидів. Цей метод називається «праймер-опосередкованою прогулянкою» або «блукаючою затравкою». Метод дозволяє секвенувати дуже довгі фрагменти ДНК.

Новий метод секвенування ДНК

Професор О. Аксиментьев і його колеги розробили пристрій, що здатний записувати послідовності нуклеотидів у міру проходження молекули ДНК через нанопору у кремнієвому мікрочипі. В електричному полі молекула ДНК здатна проходити через пори діаметром 2 нм. Під час руху молекули ДНК через нанопори її електричне поле індукує специфічні електростатичні потенціали, що можуть бути зафіксовані і розшифровані.

Цей метод дозволяє вивчати механічні властивості ДНК і здійснювати швидко і точно секвенування геномів. Як відомо, секвенування генома людини має високу собівартість. Вартість секвенування генома людини з використанням методу Аксиментьева становить 1000 доларів.

Проект «Геном людини»

Найвидатнішим досягненням сучасної біологічної науки є розшифрування генома людини. З цією метою була створена спеціальна Організація з розшифрування людського генома (HUGO), головою проекту був обраний Дж. Уотсон.

Робота над реалізацією програми «Геном людини» офіційно розпочалася 1 жовтня 1990 р. у США під керівництвом Міністерства енергетики і державних інститутів здоров'я США. Проекти програми

фінансувалися урядами Великобританії, Франції, Канади, Німеччини та Японії. У квітні 2003 р. проект «Геном людини» був завершений.

«Геном людини» – широкомасштабна дослідницька програма, метою якої є повне секвенування генома людини. Різні напрями програми включають створення генетичних і фізичних карт усіх хромосом людини; секвенування геномів різних модельних організмів; створення комп'ютерних технологій для обробки й аналізу даних щодо секвенування ДНК; інформування громадськості з проблем, що пов'язані з одержанням і використанням даних щодо генетики людини, вивчення етичних, правових і соціальних аспектів генетичних досліджень.

У межах підпрограми «нові технології» був повністю секвенований геном бактерії *E.coli*, дріжджів *S.cerevisiae*, нематоди *Caenorhabditis elegans*, плодової мушки *Drosophila melanogaster*, миші *Mus musculus*.

Над реалізацією проекту «Геном людини» працювали вчені з багатьох країн світу. У березні 1986 р. у каліфорнійському місті Санта-Фе відбулася перша конференція, присвячена дослідженню генома людини. Наприкінці 1989 р. було секвеновано понад 30 млн нуклеотидів. За 1 рік розшифровували приблизно 1 млн нуклеотидів. Під час здійснення проекту досягли суттєвих успіхів щодо оптимізації технології секвенування ДНК:

- з використанням автоматичних флуоресцентних секвенаторів швидкість секвенування збільшилась з 10 000 пар основ за добу у 1990 р. до 50 000 у 1996 р.;

- вартість секвенування пари основ знизилась з 5 доларів США у 1990 р. до 0,3 доларів у 1996 р.

На сьогодні відомо, що геном людини містить 3,5 млрд нуклеотидів (25 – 30 тис. генів). Кількість нуклеотидів у складі людського генома можна порівняти з кількістю друкованих літер. На сторінці одного тому Великої Радянської Енциклопедії розміщується 10 тисяч знаків. Кожен том містить приблизно 700 сторінок, а отже, 10 млн знаків. 3 млрд нуклеотидів – це 300 томів!

Створено генетичні і фізичні карти генома людини. Генетична карта вказує на розташування певних локусів уздовж хромосоми. Фізична карта – це повна нуклеотидна послідовність хромосоми, тобто набір упорядкованих клонів ДНК.

Інформація про послідовності нуклеотидів ДНК людини розміщується в інформаційних базах наукових організацій (Locus link – інформаційна база NCBI, Gene Cards – база Weizmann Institute of Science).

Створений державний сайт США з вивчення генома людини: <http://www.nhgri.nih.gov/index.html>.

У майбутньому розвиток генної інженерії дозволить покращити генотип людини, ліквідувати генетичні причини хвороб.

Нові напрями генних досліджень: геноміка, гenna психологія

Геноміка, на відміну від генетики і молекулярної біології, що вивчають окремі гени, одночасно розглядає всі гени організму як єдину динамічну систему, компоненти якої взаємопов'язані і взаємодіють один з одним.

Функціональна геноміка досліджує та ідентифікує функції генів, а також функціональні взаємодії між генами в нормі і за патологічних станів організму.

Геноміка спрямована не лише на теоретичні дослідження, а й на практичне застосування досягнень генної інженерії.

Етногеноміка – новий напрям геноміки, що досліджує особливості функціонування генома людей різної національності.

Як відомо, традиційне харчування певного народу залежить від його способу життя і природних умов існування. Наприклад, китайці і корінне населення Півночі не вживають молоко і молочні продукти. Установлено, що у цих народів досить часто зустрічається порушення обміну речовин – гіполактазія – недостатня кількість в організмі ферменту лактази, що гідролізує молочний цукор (лактозу). У Китаї лише 2–5% дорослого населення вживає молоко, у Росії – 30%, у Данії та Голландії – 90%.

Спадкове захворювання фенілкетонурія в Ірландії та Англії зустрічається у 2,5 рази частіше, ніж у Росії та Україні. Як відомо, причиною хвороби є недостатня кількість в організмі ферменту фенілаланінгідроксилази. У крові хворих на фенілкетонурію накопичується токсична речовина – фенілпіруват. Наслідком фенілкетонурії є розумова відсталість.

У Росії один із 2 – 3 тисяч людей не може засвоювати злаки – захворювання целиакія. В Ірландії на це захворювання страждає 1 із

100 жителів. Хліб тут почали вирощувати набагато пізніше, ніж в інших країнах Європи.

Стійкими до дії алкоголю є фіни і росіяни, а жителі Південно-Східної Азії можуть отруїтися навіть невеликими дозами алкоголю. Це пов'язано з наявністю в азіатів мутації, що сприяє швидкому накопиченню оцтового альдегіду у крові. У росіян накопичення ацетальдегіду у крові у 10 разів нижче, ніж у жителів Азії. У цілому звичку до спиртного гени визначають на 40 – 60%.

Свої особливості є у народів, які займаються мисливством. У народів-мисливців дальтонізм та інші порушення зору зустрічаються рідко (1%), а у народів Європи – у 5 – 7%. Таким чином, кожний народ має певні особливості функціонування генома.

Генна психологія (психогенетика)

Психогенетика виникла приблизно 40 років тому у США внаслідок інтеграції досягнень фізики, математики, генетики і психоаналізу.

У 1992 р. американські вчені довели, що, впливаючи на підсвідомість людини, можна здійснити корекцію її генетичного коду. Це відкриття було відзначене Нобелівською премією.

Як відомо, існує три способи зміни генома: хімічна, фізична (опромінення) і психологічна дія. Після впливу на підсвідомість людини в її геномі спостерігалися зміни, які передаються спадково. Були навіть зафіксовані випадки виліковування раку на пізній стадії. Уважають, що 97% захворювань людини мають психосоматичний характер. Спеціалісти-психогенетики можуть з математичною точністю розрахувати закони, що керують життям конкретної людини, пояснити, чому певні події відбувалися в її житті, прогнозувати майбутнє і, якщо треба, здійснити корекцію генетичного коду.

Генна інженерія рослин

Розвиток методів генної інженерії і секвенування геномів дає нову базу знань, необхідних для розв'язання споконвічних проблем людства – забезпечення харчуванням, здоров'я та збереження довкілля.

Найістотнішими досягненнями біотехнології рослин на початку XXI ст. є такі:

- 1) розробка методів генетичної трансформації рослин;
- 2) секвенування геномів рослин;

3) прогрес у розумінні біохімічних процесів, що лежать в основі функціонування рослин.

Біотехнологія дає можливість покращувати якісні та кількісні показники сільськогосподарських культур, які захищені природним шляхом від хвороб і шкідників. Розроблена техніка оздоровлення рослин від накопичених інфекцій, що особливо важливо для тих рослин, які розмножуються переважно вегетативним шляхом (картопля). Досліджується можливість керування процесом азотфіксації, у тому числі можливість уведення генів азотфіксації в геном рослин. Ведуться дослідження щодо поліпшення амінокислотного складу рослинних білків. Створюються нові регулятори росту рослин, бактеріальні добрива.

За допомогою генної інженерії можна вводити чужорідні гени в рослинні клітини в культурі з подальшою регенерацією цілих фертильних рослин. Трансгенні рослини володіють новими властивостями:

- стійкість до комах-шкідників;
- стійкість до вірусних інфекцій, грибів і патогенних бактерій;
- стійкість до гербіцидів;
- стійкість до сольового стресу;
- подовжені терміни дозрівання плодів;
- підвищена харчова цінність насіння;
- зміна забарвлення квітів та ін.

Створено сорти бавовнику, томатів, тютюну, рису, що стійкі до комах-шкідників, вірусних і грибкових захворювань, до пошкоджень під час зберігання. Трансгенні рослини з новими властивостями пройшли успішні випробування в лабораторних, а деякі і в польових умовах. Абсолютним лідером з вирощування генетично модифікованих організмів у сільському господарстві є США. У США 90% сої, 75% кукурудзи і 50% бобів є генетично модифікованими, у світі в цілому трансгенними є 50% сої і 20% бавовнику. США, Європа, Китай, Японія – це лідери біотехнології рослин.

Генетично модифіковані рослини використовуються не лише для виробництва продуктів харчування, а й для очищення довкілля від хімічних забруднень, для виробництва фармацевтичних білків (вакцин) та інших сполук. Крім того, генетична трансформація рослин дозволяє вивчати дію генів у процесі розвитку рослини.

Вектори для трансформації рослинних клітин

Залежно від способу доставки трансгенів у клітини рослин розрізняють два типи векторних систем:

1) пряме введення трансгена в клітини або протопласти, позбавлені клітинної стінки (електропорація, бомбардування, Ca^{2+} -залежна трансформація у присутності етиленгліколю);

2) вектори на основі Ті-плазмід ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, що здійснює трансформацію рослинних клітин у природних умовах.

Agrobacterium tumefaciens – це фітопатоген, що спричиняє утворення пухлини (корончатого гала), яка порушує нормальний ріст рослини (рис. 1.3). Ця бактерія вражає дводольні рослини, зокрема виноград, фруктові дерева, троянди. Бактерію *Agrobacterium* називають природним генним інженером через її здатність переносити в клітини рослин частину власних генів. Вірулентні штами агробактерій містять Ті-плазмиди, розмір яких становить 200–250 тис. п. н. ДНК у складі Ті-плазмід називають Т-ДНК (transferred DNA), вона інтегрується в геном рослинної клітини.

Під час ураження рослини в ній починає синтезуватися специфічна речовина (ацетосирингон), що активує гени вірулентності (*vir*-гени), локалізовані в Ті-плазмідах агробактерій. Продукти *vir*-генів необхідні для транспорту й інтеграції Т-ДНК у геном рослинної клітини.

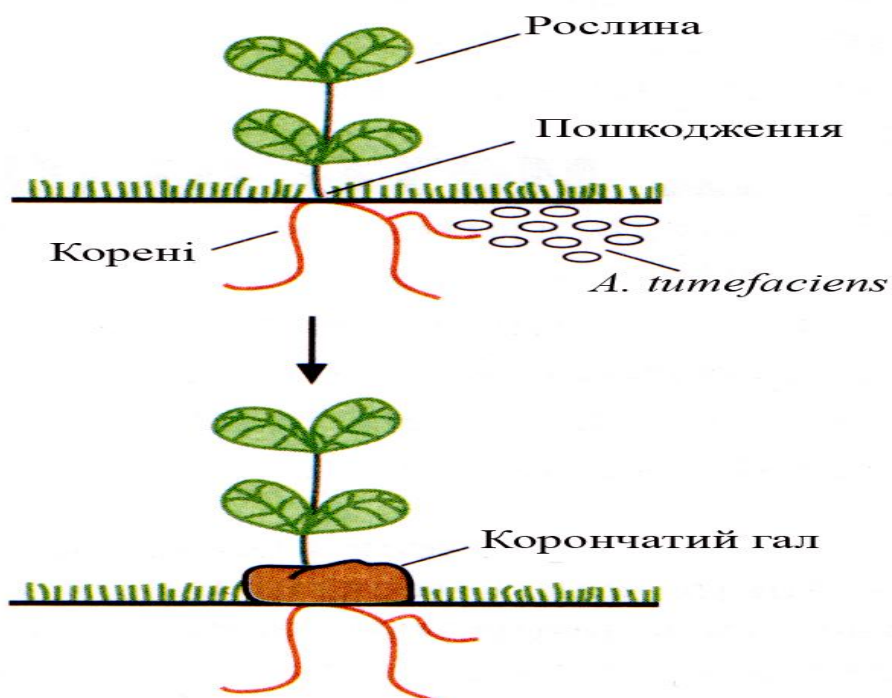
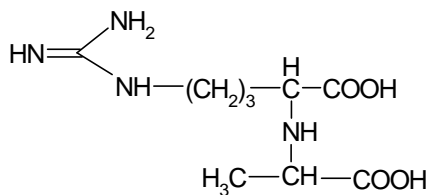
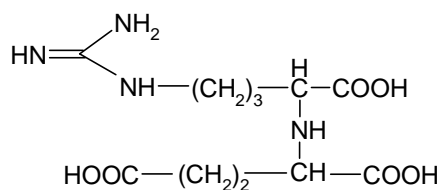


Рис. 1.3. Ураження рослин *Agrobacterium tumefaciens*

T-ДНК містить гени, більшість яких активується тільки після вбудовування у геном рослини. Ці гени кодують ферменти синтезу фітогормонів – ауксинів і цитокінінів, що спричиняють збільшення розмірів рослинних клітин та їх проліферацію. Надлишок фітогормонів зумовлює появу пухлини. Крім генів фітогормонів, T-ДНК містить гени, що кодують опіни. Опіни – це продукти конденсації аміно- і кетокислот. Наприклад, під час конденсації аргініну і ПВК утворюється октопін, аргініна і α -кетоглутарата – нопалін.



Октопін



Нопалін

Опіни є джерелом Карбону і Нітрогену для агробактерій. Таким чином, у процесі еволюції сформувався механізм трансформації рослинної клітини в «біологічну фабрику», що виробляє опіни для потреб бактерій *Agrobacterium tumefaciens*.

На основі Ti-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* створено вектори для трансформації рослинних клітин. Для введення генів у рослини використовують ділянку T-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*. Із T-ДНК видаляють гени фітогормонів і гени метаболізму опінів і вбудовують у неї ген, який необхідно транспортувати в ядро клітини-реципієнта.

За допомогою Ti-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* в Інституті фізіології і біохімії рослин Сибірського відділення РАН була виведена трансгенна осика. Деревя з уведеними генами *ugt* і *asb* у 5 – 10 разів швидше ростуть, ніж звичайні.

Крім Ti-плазмід, для доставки генів у клітини рослин використовують метод бомбардування мікрочастинками, на поверхні яких адсорбована ДНК. Золоті або вольфрамові частинки діаметром 0,4 – 1,2 мкм зі швидкістю 300 – 600 м/с пробивають клітинну стінку і мембрани рослинних клітин, транспортуючи ДНК в ядро. Метод бомбардування дозволяє трансформувати однодольні і хвойні рослини, для яких неможливо застосовувати Ti-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*.

Більш безпечними для довкілля є рослини, в яких трансгени містяться у хлоропластах, оскільки при цьому зменшується ризик поширення трансгенів серед близьких видів. Розроблено методи

вбудовування генів у хлоропластну або мітохондріальну ДНК, необхідний білок синтезується у цих органелах.

У хлоропластах рослин міститься 1 – 10% від сумарної кількості ДНК. Для генома хлоропластів (пластома) характерний високий рівень поліплоїдії (10^3 – 10^5 копій на клітину). Окрема клітина із трансформованими хлоропластами містить тисячі копій трансгена, що дозволяє одержати високий рівень експресії рекомбінантних білків (до 25% від сумарної кількості білка). Вектори для трансформації хлоропластів є кільцевими молекулами ДНК. Вони дозволяють вводити у пластом фрагменти ДНК довжиною більше 50 тис. п. н. (20 – 30 генів). Уведення векторів у хлоропласти здійснюють бомбардуванням або трансформацією у присутності поліетиленгліколю.

Порівняльна характеристика різних методів трансформації рослинних клітин наведена у табл. 1.3.

Таблиця 1.3

Методи введення ДНК у клітини рослин

Метод	Характеристика
Використання Ті-плазмід	Високоєфективна система, але не може бути застосована для всіх видів рослин
Бомбардування мікрочастинками	Простий і дешевий метод, використовується для багатьох рослин і тканин
Використання векторів на основі вірусів	Неефективний метод введення ДНК у рослинні клітини
Мікроін'єкції	Обмежене застосування, оскільки ін'єкція забезпечує введення генів лише в одну клітину
Пряме введення генів у протопласти рослин	Використовується для введення генів у протопласти, з яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини
Електропорація	Використовується для введення генів лише у протопласти
Злиття ліпосом	Використовується для введення генів у протопласти, з яких можуть бути регенеровані життєздатні рослини

Трансгенні рослини

Рослини, стійкі до комах-шкідників

Для створення таких рослин використовують експресію генів токсинів у самих рослинах. Трансгенні рослини стійкі до шкідників переважно за рахунок інсектицидних токсинів, що походять із бактерій *Bacillus thuringiensis*. Одна із форм гена протоксина була введена в такі рослини: томати, тютюн, картоплю, рис, кукурудзу, баклажан, яблуню,

люцерну, горіх, тополю, ялину, бавовник, журавлину. Трансгенні рослини томатів і картоплі стали стійкими до колорадського жука, а рослини бавовнику – до бавовникової совки. Але жоден із типів протокисна *Bacillus thuringiensis* не може бути ефективним відносно всіх видів комах.

Також ефективним механізмом захисту рослин від комах-шкідників є введення генів рослинних білків – інгібіторів амілаз і протеїназ. Уведення гена інгібітора α -амілази захищає трансгенні рослини (зернові, бобові) від зерновки *Callosobruchus maculatus* і довгоносика *C. chinensis*. Уведення гена інгібітора II протеїнази в рослини рису захищає їх від рожевого стеблового точильника *Sesamia inferens* – основного шкідника рису. Одночасне використання токсину *Bacillus thuringiensis* та інгібітора серинової протеїнази підвищує ефективність захисту рослин від шкідників.

Альтернативний метод виведення рослин, стійких до комах-шкідників, полягає у використанні бактеріального гена холестеролоксидази. Цей фермент синтезується різними бактеріями, він каталізує окиснення 3-гідроксистероїдів з утворенням кетостероїдів і H_2O_2 . Ген холестеролоксидази був виділений із штаму *Streptomyces* і введений у протопласти клітин тютюну. Установлено, що фермент проявляє інсектицидну активність проти личинок довгоносика бавовнику *Anthonomus grandis grandis*. Перспективним є використання цього гена для захисту від комах-шкідників рослин бавовнику.

Застосування генної інженерії дозволить скоротити використання хімічних інсектицидів на 40 – 60%.

Рослини, стійкі до вірусів

Віруси суттєво знижують урожайність рослин. Природний імунітет до вірусних інфекцій обумовлений різними причинами: блокуванням проникнення вірусу в рослини, попередженням його поширення, пригніченням симптомів вірусної інфекції. Трансгенні рослини повинні бути стійкими більш, ніж до одного вірусу.

Селекціонери намагалися перенести природні гени стійкості до вірусів від однієї лінії рослин до іншої. У геном рослин вводили вірусні гени, що кодують білки оболонки вірусів. Якщо рослина містить ген білка вірусної оболонки, то здатність вірусу проникати в рослину і поширюватися в ній значно знижується. За допомогою цього підходу одержують трансгенні рослини з високим рівнем стійкості до вірусів. Виявлено, що ген білка оболонки одного вірусу може забезпечувати

стійкість до інших вірусів. Найефективнішою стратегією захисту рослин від вірусів є введення в рослини кількох генів, що детермінують синтез білків вірусної оболонки.

Рослини, стійкі до фітопатогенних грибів і бактерій

Як правило, у відповідь на проникнення грибів чи бактерій рослини синтезують групу специфічних PR-білків (pathogenesis-related proteins): β -1,3-глюканаза, хітиназа, інгібітори протеїназ, що діють на патогени. Одержані трансгенні рослини рису і тютюну, що синтезують у значній кількості хітиназу – фермент, що гідролізує β -1,4-з'язки в молекулі N-ацетил-D-глюкозаміна – основного компонента клітинної стінки грибів.

Підраховано, що збитки в результаті ураження картоплі патогенною ґрунтовою бактерією *Erwinia carotovora* становлять близько 100 млн доларів за рік. Були виведені трансгенні рослини картоплі, що містять ген лізоциму бактеріофага T4. Ці рослини виявилися стійкими до *Erwinia carotovora*. Оскільки лізоцим руйнує різні види бактерії (грам+ і грам-), цей підхід може використовуватися для захисту рослин від багатьох бактеріальних патогенів.

Рослини, стійкі до гербіцидів

На виробництво більше 100 хімічних гербіцидів у світі щороку витрачається понад 10 млрд доларів, проте втрати врожаю через велику кількість бур'янів перевищують 10%. Деякі гербіциди мають однакову дію як на бур'яни, так і на сільськогосподарські культури. Гербіциди можуть накопичуватися в навколишньому середовищі.

У процесі створення стійких до гербіцидів трансгенних рослин необхідно:

- забезпечити інактивацію гербіциду в рослині під час метаболізму;
- зменшити здатність білка-мішені зв'язуватися із гербіцидом;
- забезпечити синтез білка-мішені у надлишковій кількості.

Деякі приклади генетично обумовленої стійкості рослин до дії гербіцидів наведені у табл. 1.4.

Таблиця 1.4

Генетично обумовлена стійкість рослин до дії гербіцидів

Гербіциди	Спосіб набування стійкості
Триазини	Модифікація гена <i>psbA</i> , що кодує білок D-1, на який діє гербіцид
Сульфонілуреази	Уведення в геном рослин (тополя, рис, рапс, льон) генів, що кодують стійкі форми ацетолактатсинтетази
Імідазолінони	Відбір клітинних ліній, що синтезують стійкі форми ацетолактатсинтетази
Арилоксифеноксипропіонати, циклогександіони	Модифікація ферменту ацетил-КоА-карбоксилази, на який діють гербіциди; руйнування гербіцидів
Далапон	Уведення в рослини тютюну гена дегалогенази <i>Pseudomonas putida</i> , що забезпечує детоксикацію
Ціанамід	Уведення в рослини тютюну гена ціанамідгідратази із гриба <i>Murothecium verrucaria</i> . Ціанамідгідратаза перетворює ціанамід на сечовину
Бромксиніл	Уведення в рослини (тютюн, бавовник) гена нітрилази, що забезпечує руйнування гербіциду
Феноксикарбонові кислоти	Уведення в рослини (тютюн, бавовник) гена діоксигенази з <i>Alcaligenes</i> , що забезпечує руйнування гербіциду

Рослини, стійкі до сольового стресу

В умовах посухи і засолення ґрунтів рослини синтезують низькомолекулярні речовини – осмопротектори, що сприяють поглинанню і затримці води, запобігають руйнуванню макромолекул у клітинах рослин за дії високих концентрацій солей. Осмопротекторами є вуглеводи, спирти, солі амонію, пролін, бетаїн. Бетаїн відіграє основну роль під час захисту рослин від сольового стресу. Бетаїн синтезується із холіну. Деякі сільськогосподарські культури (картопля, рис, томати) не здатні накопичувати бетаїн. Уведення в рослини гена бетаїну *E.coli* підвищує їх стійкість до високих концентрацій солей (300 мМ) на 80%.

Рослини з подовженими термінами дозрівання плодів

Передчасне дозрівання – це основна проблема під час транспортування плодів. У процесі дозрівання плодів у рослинах активуються специфічні гени, що кодують ферменти целюлазу і полігалактуразу. Якщо блокувати експресію цих генів, дозрівання затримається.

Регулятор росту рослин етилен ініціює експресію багатьох генів, що відповідають за дозрівання плодів. Етилен синтезується із S-аденозилметіоніна. Обробка рослин хімічними препаратами, що блокують синтез етилену, затримує дозрівання плодів. Створено трансгенні рослини, в яких плоди мали тривалий термін зберігання за рахунок пригнічення синтезу етилену.

Німецькі вчені з Кельнського інституту рослинництва створили помідор з генами американської плоскої риби (камбали), що відповідають за терморегуляцію. Цей помідор можна зберігати за температури 12°C у нестиглому вигляді протягом кількох місяців (у теплі дозріває за кілька годин).

Зміна забарвлення квітів

Зміна забарвлення квітів відіграє надзвичайно важливу роль у галузі квітникарства. Понад 70% від обсягу індустрії квітникарства становлять троянди, гвоздики, тюльпани, хризантеми. За допомогою методів генної інженерії створюються нові сорти квітів із незвичайним забарвленням. Це досягається завдяки маніпуляціям із генами ферментів біосинтезу пігментів антоціанів. Вихідною речовиною для синтезу антоціанів є фенілаланін.

У перспективі за рахунок маніпуляцій із генами білків, що визначають запах, можливе створення рослин з будь-яким ароматом.

Зміна харчової цінності рослин

Завдяки методам генної інженерії стало можливим підвищення харчової цінності рослин за рахунок зміни складу білків та ліпідів. Були створені сорти рису і кукурудзи з підвищеним вмістом білків та амінокислот. Особливо цінними є сорти рослин, що містять значну кількість незамінних амінокислот. Створено трансгенні сорти сої, в яких вміст незамінної амінокислоти лізину у 5 разів вищий, ніж у звичайних рослин.

75% від загальної кількості масляних культур становлять соя, пальма, рапс, соняшник. Створено трансгенні сорти рапсу, що синтезують ліпіди зі зміненим жирнокислотним складом. Особливо цінними є жири з високим вмістом поліненасичених вищих жирних кислот, оскільки вони не синтезуються в організмі людини.

Синтез вітаміну А в «золотому» рисі – продукт спільних наукових розробок дослідницьких груп Інго Потрикуса (Швейцарія) і Пітера Бейера

(Німеччина). Рис містить 2 гени нарциса і 1 ген бактерій, зернівки мають золотисто-жовтий колір.

За допомогою генної інженерії можна покращувати смак плодів рослин. З плодів африканської рослини *Dioscorephyllum cumminsii* Diels був виділений білок монеллін, що у 100 000 разів солодший за сахарозу. Монеллін – це дволанцюговий димер. А-ланцюг містить 45 амінокислотних залишків, В-ланцюг – 50. Для створення трансгенних рослин, здатних синтезувати монеллін, необхідно клонувати обидва гени. Для розв'язання цієї проблеми ген, що кодує А- і В-ланцюги, був синтезований хімічним шляхом. Створено трансгенні томати і салат, які синтезують монеллін. Синтетичний ген монелліна вводили в рослини за допомогою Ті-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*.

Рослини як біореактори

Використання рослин для синтезу корисних речовин має низку переваг порівняно з використанням мікроорганізмів:

- 1) у рослин процесинг і фолдинг білків відбувається аналогічно до тварин;
- 2) трансформація рослин має стабільний характер, чужорідна ДНК вбудовується в рослинний геном;
- 3) вирощування рослин не потребує великих витрат і не лімітується можливостями процесів ферментації;
- 4) продукти синтезу трансгенних рослин безпечні у застосуванні (немає ризику забруднення препарату білка вірусами чи пріонами);
- 5) можна створити умови, за яких чужорідні білки будуть синтезуватися у насінні, де їх цілісність не порушується тривалий час.

В ідеалі рослина – це продуцент біопрепарату, вона має бути неїстівною і не здатною виживати у природних екосистемах, якщо її насіння рознесеться вітром або тваринами. Трансгенні рослини повинні вирощуватися в регіонах, де відсутні їх близькоспоріднені види.

Створено експериментальні установки для одержання за участі рослин ферментів, моноклональних антитіл, функціональних фрагментів антитіл, а також полімерів.

Відомо, що бактерії *Alcaligenes eutrophus* синтезують полімер полі-β-гідроксибутират. Особливістю цього полімеру є його здатність до біодеградації. В бактеріях полі-β-гідроксибутират синтезується з ацетил-КоА за участі трьох ферментів. Гени цих ферментів були вбудовані

в ДНК хлоропластів рослини *Arabidopsis thaliana* у складі векторів на основі Ті-плазмід. У листках трансгенних рослин, що місять усі три бактеріальні гени, синтезується більш ніж 1 мг полі- β -гидроксибутирату на 1 г сирої тканини листка.

Створено технології виробництва фармацевтичних і діагностичних препаратів за участі рослин. За допомогою трансгенних рослин кукурудзи одержують моноклональні антитіла проти респіраторно-синцитіального вірусу, ревматоїдного артрити і лімфоми. Створено трансгенні банани, що містять інактивовані форми вірусу холери, гепатиту В, діареї. У Московському інституті картоплярства виведена картопля, що синтезує людський інтерферон крові.

Хлоропласти рослин краще здійснюють синтез людських білків, ніж мікроорганізми чи рослини з генами, вбудованими в їхні ядра. Тютюн найбільш придатний для продукування білків людини. Тривають розробки технології одержання людського соматотропіну у хлоропластах тютюну.

Важливим завданням біотехнології є попередження забруднення харчових і кормових рослин біопрепаратами, а також мінімізація їх впливу на навколишнє середовище.

Бактерії, що стимулюють ріст рослин

Більшість ґрунтових мікроорганізмів стимулюють ріст рослин за такими механізмами:

- фіксація атмосферного азоту;
- утворення легкозасвоюваних хелатованих форм Феруму і Фосфору, їх поглинання з ґрунту і транспортування у рослини;
- синтез речовин, що пригнічують ріст фітопатогенів;
- синтез фітогормонів;
- синтез мікробних інсектицидів;

Бактерії, що стимулюють ріст рослин, можуть використовувати один або кілька таких механізмів.

Молекулярні механізми фіксації азоту

Цінною властивістю бактерій є діазотрофність – здатність до фіксації атмосферного азоту. За допомогою азотфіксуючих бактерій щорічно $17,5 \cdot 10^7$ т молекулярного азоту атмосфери перетворюється в органічні сполуки. Усі мікроорганізми, що здійснюють азотфіксацію, є прокаріотами. Жоден еукаріот не здатний зв'язувати атмосферний азот. До азотфіксуючих

бактерій належать: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Azospirillum*, *Azotobacter* і ціанобактерії. З допомогою методів генної інженерії створено бульбочкові бактерії з підвищеною здатністю до фіксації атмосферного азоту.

Фіксацію атмосферного азоту у бактерій здійснює фермент нітрогеназа. Молекулярні основи фіксації азоту були досліджені на прикладі бактерії *Klebsiella pneumoniae*, що мешкає у ґрунті, воді, кишечнику людини. *Klebsiella pneumoniae* може слугувати модельною системою для вивчення нітрогенази бактерій *Rhizobium* і *Bradyrhizobium*.

Нітрогеназна азотфіксуюча система є складним мультиферментним комплексом. Усі відомі нітрогенази містять два компоненти. Компонент I – це комплекс із двох α -субодиниць (50 кДа) і двох β -субодиниць (60 кДа), 24 молекул Феруму, 2 молекул Молібдену і залізомолібденового кофактора (FeMoCo). Компонент II складається із двох α -субодиниць (32 кДа) і невідомого числа молекул Феруму. Для фіксації азоту необхідні обидва компоненти нітрогенази, комплекс йонів Mg^{2+} й АТФ та джерело відновних еквівалентів. Схематично процес фіксації азоту можна описати таким рівнянням:



Гени азотфіксації позначають як *nif*-гени, вони кодують приблизно 20 різних білків (табл. 1.5), тому створення з допомогою методів генної інженерії рослин, здатних самостійно фіксувати азот, є практично неможливим.

Бульбочкові бактерії в симбіозі з бобовими рослинами відновлюють азот до аміаку, який може використовуватися для синтезу глютаміну, глютамінової кислоти і білка.

Нітрогеназа каталізує утворення газоподібного водню. Деякі штами *Rhizobium* синтезують фермент гідрогеназу, який каталізує перетворення *in vivo* H_2 у H^+ , що збільшує ефективність фіксації азоту. За допомогою генної інженерії можна підвищити азотфіксуючу здатність бактерій *Rhizobium* шляхом введення генів ферментів гідрогеназ. Гідрогеназна система може застосовуватися для таких процесів:

- підвищення ефективності фіксації азоту;
- перетворення і запасання сонячної енергії;
- регенерації кофакторів у промислових ферментативних процесах;
- синтезу специфічних хімічних сполук;

– видалення тритію із води, яка використовувалася для охолодження реакторів атомних електростанцій.

Таблиця 1.5

Гени *Klebsiella pneumoniae*, що беруть участь у фіксації азоту

nif-Ген	Білок (функція)
D	α-Субодиниця компонента I нітрогенази
K	β-Субодиниця компонента I нітрогенази
H	Компонент II нітрогенази
F	Флаводоксин
J	Піруват: флаводоксин оксидоредуктаза
Q, B, N, E, V	Синтез FeMoCo
M	Процесинг редуктази нітрогенази
A	Активатор
L	Репресор
S	Процесинг компонента I
W, Z, T, Y, U, X	Невизначені функції

Бактеріальні добрива на основі бульбочкових бактерій

Бактеріальні добрива збагачують ризосферу рослин корисними мікроорганізмами, що забезпечує покращання структури ґрунту, накопичення у ньому поживних речовин, мінералізацію органічних сполук і, як наслідок, підвищення родючості ґрунту і врожайності рослин. Мікроорганізми бактеріальних добрив забезпечують рослини не тільки мінеральними речовинами, а й фізіологічно активними сполуками: фітогормонами, вітамінами.

У сільському господарстві найчастіше застосовують бактерії двох родів: *Rhizobium* і *Bradyrhizobium*. У результаті симбіозу з бобовими рослинами бактерії одержують органічні речовини, а рослини – NH_4^+ . Кожен вид бульбочкових бактерій специфічний відносно невеликої кількості видів рослин.

Уперше культура бульбочкових бактерій була одержана у 1911 р. на бактеріально-агрономічній станції у Москві. На основі бульбочкових бактерій розроблено такі бактеріальні добрива: нітрагін, ризоторфін, азобактерин, фосфобактерин, екстрасол. В 1 г нітрагіну міститься приблизно 9 млрд бактерій. Обробка насіння рослин нітрагіном підвищує врожайність на 15–25%. Для виробництва азобактерину використовують бактерії *Azotobacter chroococcum*. *Azotobacter* фіксує атмосферний азот, продукує вітаміни (B₅, B₃, B₆, біотин), стимулятори росту рослин (гетероауксин, гіберелін), фунгіцидні речовини, що пригнічують ріст небажаних мікроскопічних грибів. Фосфобактерин створений на основі бактерій *Bacillus*

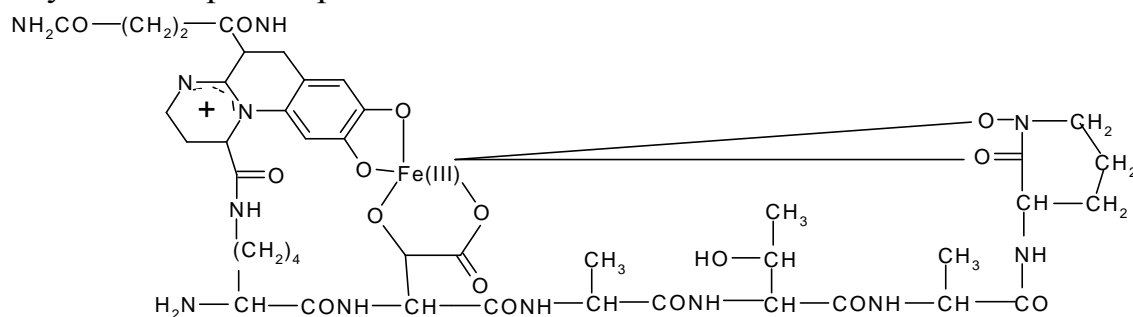
megaterium var. phosphaticum, які перетворюють складні фосфорорганічні сполуки (нуклеїнові кислоти, нуклеопроїди) і важкозасвоювані мінеральні фосфати в доступну для рослин форму. 1 г препарату фосфобактерину містить близько 8 млрд бактерій. Мікроорганізмами обробляють насіння і рослини перед висаджуванням у ґрунт.

Мікробіологічний синтез сидерофорів

Сидерофори – це речовини, що хелатують залізо. Як відомо, Ферум присутній у ґрунті переважно у складі сполук Fe^{3+} , що нерозчинні у воді. Ґрунтові мікроорганізми синтезують і секретують залізов'язуючі сполуки з молекулярною масою 400 – 1000 Да.

Сидерофори ефективно зв'язують Fe^{3+} і забезпечують надходження Феруму до клітин мікроорганізмів, які, у свою чергу, постачають його у рослини.

Вільноживучі бактерії *Azospirillum* здатні стимулювати ріст рослин за рахунок синтезу і секреції органічних кислот, які розчиняють і зв'язують мінеральні речовини.



Сидерофор

Синтез речовин, що пригнічують ріст фітопатогенів

Фітопатогени можуть зменшити врожай сільськогосподарських культур на 25 – 100%. Деякі мікроорганізми синтезують сполуки, що пригнічують ріст фітопатогенів. Так, наприклад, бактерії роду *Pseudomonas* синтезують антибіотики: агроцин 84, агроцин 434, гербіколін, феназини, піролнітрил, піолутеорин.

Деякі бактерії мають протигрибкову дію, оскільки синтезують ферменти (хітиназа, β -1,3-глюканаза), що руйнують клітинну стінку грибів. В одному експерименті вдалося знизити частоту захворювання рослин фітопатогенними грибами *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Rythium ultimum* за допомогою штаму *Pseudomonas cepacia*, що синтезує фермент β -1,3-глюканазу.

Ген хітинази, виділений з бактерії *Serratia marcescens*, був перенесений у штам *Pseudomonas fluorescens*. Одержаний штам мікроорганізмів секретував хітиназу й ефективно пригнічував розмноження фітопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*.

Синтез фітогормонів

Бактерії можуть стимулювати ріст рослин через зміну їх гормонального балансу. Бактерії синтезують фітогормони, що стимулюють ріст рослин, прискорюють поділ їх клітин і диференціювання. Основними представниками фітогормонів є ауксини і цитокініни.

Назва «ауксини» об'єднує ряд речовин – регуляторів росту. Найважливішими представниками ауксинів є індолілоцтова, індолілпропіонова, 2,4-дихлорфеноксоцтова кислоти.

Ауксини були відкриті на початку Другої світової війни. Спочатку ауксини отримували із верхівки колеоптилю – чохла, що захищає перший молодий листок. За 10 днів 8 лаборанток німецького біохіміка Кегля переробили 100 тисяч проростків кукурудзи й одержали ауксин у кількості, достатній для встановлення його кислотної природи. Щоб одержати 250 мг ауксину таким способом, необхідно безперервно працювати 400 років. Доступним джерелом ауксину є людська сеча. За добу з організму людини виводиться 1 – 2 мг ауксину.

Ефективними продуцентами ауксинів є мікроорганізми – дріжджі, гриби і бактерії. Ауксини прискорюють ріст рослин, стимулюють формування їх кореневої системи.

Деякі мікроорганізми (гриб *Gibberolla fujukuroi*) синтезують терпеноїди – гібереліни. Гібереліни стимулюють не лише ріст, а й цвітіння рослин. Їх застосовують для прискорення проростання ячменю під час виготовлення солоду, для підвищення врожайності винограду. Пізніше були відкриті сполуки, що стимулюють поділ клітин, – цитокініни. Цитокініни є похідними 6-амінопурину. У присутності ауксинів вони індукують поділ клітин, стимулюють процеси синтезу РНК і білків.

Фітогормони характеризуються високою ефективністю дії, вони справляють свій вплив у дуже низьких концентраціях. Наприклад, 1 г гетероауксину достатньо для стимулювання росту 10^{13} рослин. Якщо висадити таку кількість рослин у ґрунт (із розрахунку 1 рослина на 1 см^2), то площа поля становитиме 900 км^2 . Для приготування розчину, що містить 1 г гетероауксину, необхідно використати 200 млрд л води.

Синтез мікробних інсектицидів

Найвідоміший хімічний інсектицид ДДТ (дихлордифенілтрихлоретан) був синтезований у 70-х роках XIX ст. З 30-х років XX ст. ДДТ застосовують для боротьби з комахами-шкідниками. Як і більшість хлорорганічних сполук, ДДТ має паралізуючу дію на нервову систему і м'язову тканину комах. Синтезовано і широко використовують й інші хлорорганічні сполуки: дильдрин, альдрин, хлордан, ліндан, токсифен. Інший клас хімічних інсектицидів – фосфорорганічні сполуки (малатион, паратион, диазинон). Вони інгібують фермент ацетилхолінестеразу, що гідролізує нейромедіатор ацетилхолін. Фосфорорганічні інсектициди порушують функціонування нейронів у комах.

Хімічні інсектициди шкідливо впливають на людину і тварин. Хлорорганічні сполуки, зокрема ДДТ, зберігаються в екосистемах тривалий час – від 15 до 20 років. З часом комахи-шкідники виробляють стійкість до багатьох хімічних інсектицидів, тому ці сполуки стали використовувати у вищих концентраціях. Хімічні інсектициди не мають вибіркової дії, тому разом із шкідниками знищують корисних комах. Хімічні інсектициди акумулюються в жировій тканині багатьох організмів. Так, унаслідок отруєння хімічними інсектицидами в Північній Америці були винищені такі види птахів: сапсани, бурі пелікани, білоголові орлани. З урахуванням цього здійснюється інтенсивний пошук альтернативних способів контролю чисельності комах-шкідників.

Мікробні інсектициди, на відміну від хімічних, не справляють шкідливого впливу на навколишнє середовище. Інсектициди, що синтезують мікроорганізми, високоспецифічні, діють лише на певні види шкідливих комах. Мікробні інсектициди підлягають швидкій біодеградації, у комах не виробляється стійкість до біоінсектицидів. Проте широке використання цих сполук обмежується високою вартістю їх одержання. Цю проблему можна подолати за допомогою генної інженерії. Для одержання мікробних інсектицидів використовують віруси, гриби, найпростіші, бактерії.

У вітчизняному біотехнологічному виробництві виділяють 3 групи інсектицидних препаратів:

- 1) бактеріальні препарати на основі *Bacillus thuringiensis* (ентобактерин-3, екзотоксин, інсектин, токсобактерин);
- 2) грибні препарати (боверин);
- 3) препарати на основі вірусів ядерного поліедра (вірин).

Бактеріальні ентомопатогенні препарати застосовуються найчастіше. Вони характеризуються такими особливостями дії:

- висока вірулентність щодо комах-шкідників;
- безпечність для довкілля;
- висока швидкість дії на шкідників.

Найбільш вивчені ентомопатогенні бактерії *Bacillus thuringiensis*. Потрапляючи в організм комах, вони продукують токсини:

- α -екзотоксин (або фосфоліпаза С) індукує розпад фосфоліпідів у тканинах комах;
- β -екзотоксин інгібує процес транскрипції (синтез РНК);
- γ -екзотоксин – малодосліджений фермент;
- δ -ендотоксин – 8-гранний кристал, який під час потрапляння у кишечник комах розпадається на молекули протоксина, що пошкоджує середній відділ кишечника.

Протоксин *Bacillus thuringiensis* спричиняє загибель комахи вже через 15 хв дії. Токсини *Bacillus thuringiensis* швидко руйнуються. Бактерії *Bacillus thuringiensis* антагоністичні до 130 видів комах.

Бактеріальні ентомопатогенні препарати застосовують шляхом розпилювання водної емульсії (на 1 га овочевих культур використовують 1 – 3 кг препарату, для садових культур – 3 – 5 кг). 1 т мікробного препарату достатньо, щоб знищити шкідників на 300 га лісу, бурякових чи бавовникових полів.

Клоновані гени різних токсинів *Bacillus thuringiensis*, які локалізовані у плазмідах. Один з таких генів був уведений у фотосинтезуючі ціанобактерії *Synechocystis* і *Synechococcus*. Цей підхід виявився ефективним для доставки токсинів *Bacillus thuringiensis* в організм комах-мішені. Однак інсектициди *Bacillus thuringiensis* під час нанесення на листки і стебла не діють на комах, що пошкоджують корені рослин. Ген токсину *B. thuringiensis* увели в штам одного з видів бактерій, що мешкають у ризосфері – шарі ґрунту поблизу коренів. Такі рекомбінантні бактерії секретують інсектицид прямо в ризосферу і захищають корені рослин від комах-шкідників. Також ген токсину *B. thuringiensis* був вбудований у хромосому ДНК штаму *Pseudomonas fluorescens*, що утворює колонії на коренях кукурудзи.

Грибні ентомопатогенні препарати спричиняють у комах мікози. Особливості дії мікроскопічних грибів:

- ураження комах відбувається через кутикулу;
- комахи інфікуються у фазі розвитку лялечки та імаго;
- висока швидкість росту і репродуктивна здатність грибів (у вигляді спор можуть довго зберігатися, не втрачаючи ентомопатогенної дії);
- висока специфічність – вірулентність залежить від штаму гриба.

Дія грибного препарату на комаху розпочинається після потрапляння спор у порожнину її тіла через шкірні покриви. В організмі комах спора проростає в гіфу, потім розростається міцелій, який заповнює все тіло комах, продукуються токсини. Ріст гриба триває доти, поки всі тканини комах, насамперед м'язова, не будуть зруйновані.

У промисловому виробництві грибних інсектицидів найчастіше використовуються штами трьох родів: *Beaveria*, *Metarrhizium*, *Entomophthora*. На основі гриба *Beauveria bassiana* був створений препарат боверин (1 г препарату містить 1,5 – 6 млрд конідіоспор).

Вірусні ентомопатогенні препарати володіють найбільшою специфічністю відносно комах, тому вони безпечні для людини, флори і фауни. Ці препарати діють лише на один вид комах. Віруси стійкі до несприятливих умов середовища, вони можуть зберігати життєздатність протягом багатьох років. Інфікування вірусами відбувається під час живлення комах. Віріони через стінку кишечника проникають у клітини, де здійснюється їх реплікація.

Для боротьби з комахами-шкідниками використовують бакуловіруси – паличкоподібні віруси з дволанцюговим ДНК-геномом. Стійкість до бакуловірусів розвивається дуже рідко, оскільки бакуловіруси протягом тисячоліть еволюціонували разом зі своїми комахами-хазяїнами. Унаслідок дії токсинів бакуловірусів комахи можуть загинути у період від кількох днів до тижнів. Щоб прискорити цей процес, були зроблені спроби підвищити вірулентність бакуловірусів шляхом уведення чужорідних генів, експресія яких призводить до загибелі комах. В один із штамів бакуловірусу був уведений ген нейротоксину скорпіона *Androctonus australis* Nestor. Цей токсин блокує транспорт іонів Na^+ у нейронах комах, що призводить до паралічу і смерті. Уведення гена вдвічі підвищило вірулентність бакуловірусів. Рекомбінантний бакуловірус не тільки прискорював загибель комах, а й знижував їх здатність пошкоджувати рослини. Основною перешкодою для широкомасштабного застосування бакуловірусів є висока вартість їх препаратів.

Ураховуючи шкідливий вплив хімічних інсектицидів на довкілля, мікробіологічні інсектициди є найперспективнішими для застосування у сільському господарстві.

Генна інженерія тварин. Технологія одержання трансгенних тварин

У 1973 р. з'явився термін «трансгенез», що означав перенесення генів з одного організму до іншого, у тому числі еволюційно віддаленого. Трансгенез дозволяє покращувати генотип існуючих порід домашньої худоби і виводити породи з новими ознаками. Актуальним є створення домашніх тварин зі спадковою стійкістю до бактеріальних і вірусних інфекцій, паразитарних інвазій.

Рудольф Яниш вивів перші трансгенні тварини у 1974 р. у Кембриджі (США) у результаті ін'єкції в ембріон миші ДНК вірусу мавпи SV 40.

У 1980 р. американський учений Гордон для створення трансгенних тварин запропонував використовувати мікроін'єкцію ДНК у пронуклеус зиготи. Цим підходом започатковано поширення технології створення трансгенних тварин. У 1985 р. у США за допомогою мікроін'єкцій ДНК у пронуклеус зиготи одержано перші трансгенні сільськогосподарські тварини: кролі, вівці, свині. У Росії перші трансгенні тварини з'явилися у 1982 р.

На сьогодні, крім методу мікроін'єкцій, застосовуються інші методи одержання трансгенних тварин: інфікування клітин рекомбінантними вірусами, електропорація, бомбардування клітин золотими або вольфрамовими частинками з нанесеними на їх поверхню рекомбінантними ДНК.

Генетична модифікація тварин за допомогою технології рекомбінантної ДНК ґрунтується на введенні клонованого гена в геном клітини, з якої могли б утворитися клітини зародкової лінії. За рахунок схрещення трансгенних нащадків можна одержувати гомозиготні лінії трансгенних тварин.

Технологія одержання трансгенних тварин включає такі етапи:

- уведення клонованого гена в ядро заплідненої яйцеклітини;
- імплантація яйцеклітини в матку реципієнтної тварини;
- відбір потомства, що містить клонований ген у всіх клітинах;
- схрещення тварин, що несуть клонований ген, й одержання нової генетичної лінії.

Альтернативний підхід полягає у виділенні ембріональних стовбурових клітин і трансфекції їх клонованим геном. Клітини, що містять ген-мішень, відбирають і культивують, а потім уводять в ембріони на ранніх стадіях розвитку. Ембріональні стовбурові клітини можуть дати початок клітинам будь-якого типу, у тому числі клітинам зародкової лінії. Для трансформації ембріональних стовбурових клітин використовують штучні хромосоми на основі дріжджів. Таким способом були одержані миші, що синтезують людські антитіла.

На моделі трансгенних лабораторних тварин досліджуються функції різних генів, регуляція їх експресії, фенотипний прояв генів, мутагенез тощо. Трансгенних тварин з пошкодженням певного гена можна використовувати як модель для вивчення захворювань людини на молекулярному рівні. Наприклад, «нокаут» (спрямоване пошкодження) гена родопсину у мишат інактивує палички сітківки, що імітує захворювання людини – пігментний ретиніт. За допомогою таких тварин можна вивчати процес дегенерації сітківки, а також терапевтичний ефект лікарських препаратів. Створено понад 250 ліній мишей з «нокаутуваними» генами, що використовуються як моделі для вивчення різних захворювань людини.

Деякі трансгенні тварини (корови, вівці і кози) можуть використовуватися як своєрідні «біологічні фабрики» для одержання продуктів клонуваних генів, що секретуються в молоко. В 1 л молока таких тварин міститься від десятків міліграмів до кількох грамів біологічно активних білків людини. З молоком трансгенних тварин можна отримувати лікарські препарати, а також ферменти. Наприклад, трансгенні кози є продуцентами α_1 -антитрипсину, антитромбіну III. У Росії створено трансгенні вівці, що синтезують ферменти хімозин і ренін. Вміст хімозину в молоці трансгенних тварин становить 300 мг/л. Хімозин і ренін використовуються для виготовлення сиру. Від 20 трансгенних корів за 1 рік можна одержати приблизно 100 кг рекомбінантного білка C, який застосовують для профілактики тромбоутворення. Однієї трансгенної корови достатньо, щоб задовольнити щорічну потребу у факторі згортання крові IX, який уводять хворим на гемофілію. Але створення трансгенних корів потребує багато часу: щоб виростити статевозрілу тварину із заплідненої яйцеклітини, необхідно приблизно 2 роки.

Етапи одержання трансгенних корів:

- збір ооцитів;
- дозрівання ооцитів *in vitro*;
- запліднення ооцитів *in vitro*;
- центрифугування запліднених яйцеклітин (для візуалізації чоловічого пронуклеуса, концентрування жовтка);
- мікроін'єкція ДНК у чоловічий пронуклеус;
- розвиток ембріонів *in vitro* до стадії бластоцисти;
- імплантація ембріонів реципієнтним самкам;
- скринінг ДНК нащадків на наявність трансгена.

У тестових експериментах із 2470 ооцитів було одержано двоє трансгенних телят. Це свідчить про низьку ефективність методу. На сьогодні триває вдосконалення методики трансгенезу.

Сучасні методи перенесення генів недостатньо ефективні: для одержання однієї трансгенної тварини необхідно здійснити мікроін'єкції ДНК у 40 зигот миші, 90 зигот кози, 100 зигот свині, 110 зигот вівці, 1600 зигот корови. Із 1000 імплантованих запліднених яйцеклітин розвивається від 30 до 50 трансгенних тварин. Механізми інтеграції екзогенної ДНК і формування автономних репліконів під час трансгенезу невідомі. Вбудовування трансгенів у кожної трансгенної тварини здійснюється у різні ділянки хромосом, причому може відбуватися вбудовування однієї або кількох копій трансгена.

Трансгенні риби

Одержані трансгенні види коропа, зубатки, форелі, лосося. Трансгени вводять методом мікроін'єкції ДНК. Після мікроін'єкції 35 – 80% ембріонів виживають, з них трансгенними є 10 – 70%. Шляхом схрещування трансгенних риб створюють трансгенні лінії.

Перші дослідження в цій галузі були спрямовані на вивчення впливу трансгена соматотропіну на швидкість росту риб. Дослідники компанії Agua Bounty Technologies вивели трансгенних атлантичних лососів, що містять ген гормону росту із чавичі – чинукського лосося. Одержано трансгенні атлантичні лососі були більші за розмірами і швидше росли, ніж контрольні нетрансформовані особини. Через рік трансгенні риби були у 11 разів більші за нетрансгенних.

Переваги і недоліки використання трансгенних рослин і тварин у сільському господарстві

Використання досягнень генної інженерії у сільському господарстві є завданням агробіотехнології. Найрозвиненіший розділ агробіотехнології – це використання досягнень клітинної біології, що включає застосування культури клітин, тканин та органів рослин і тварин. На практиці ці методи дають змогу розв'язати проблеми швидкого розмноження цінних генотипів рослин, очищення їх від патогенних вірусів, одержання соматичних гібридів, штучного запліднення тварин, ембріопересадки, отримання моноклональних антитіл, біологічно активних речовин.

Ще одна важлива сфера застосування сучасної біотехнології – це використання молекулярно-генетичних маркерів у селекції, а також для розмноження рослин і тварин, збереження їх генофондів. За допомогою маркерів здійснюється ідентифікація і локалізація на хромосомах цінних генів або локусів важливих ознак, створення карти хромосом, контролюється якість насіння, складаються молекулярно-генетичні каталоги сортів і ліній.

Одержання трансгенних рослин дає змогу створити нове покоління ГМ-сортів, стійких до агресивних патогенів і шкідників, вірусів, віроїдів, мікоплазм, абіотичних стресів (низькі та високі температури, засолення або закиснення ґрунтів, посуха, перезволоження), гербіцидів. Використання біологічних засобів захисту рослин, стимуляторів росту тварин і рослин, мікробних добрив дозволяє знизити дози хімічних засобів захисту рослин і мінеральних добрив, підвищити якість продукції, створити екологічно чисті технології. Генно-інженерні вакцини, сироватки, моноклональні антитіла використовуються для профілактики, діагностики і терапії основних хвороб сільськогосподарських тварин.

Переваги і недоліки застосування біотехнології в агропромисловому виробництві наведено у табл. 1.6.

Таблиця 1.6

Переваги і недоліки застосування біотехнології в сільському господарстві

Технологія	Переваги	Недоліки
Трансгени (в цілому)	Можливість покращання сільськогосподарських рослин і тварин	Надходження ГМ-продуктів у харчовий раціон людини. Можливе зменшення біорізноманіття внаслідок появи нових патогенів
Стійкість до гербіцидів	Підвищення врожаю, зменшення застосування гербіцидів, що не підлягають біодеградації	Можлива поява стійких до гербіцидів нових супербур'янів унаслідок ауткросинга
Стійкість до комах-шкідників	Підвищення врожаю, зменшення застосування інсектицидів, що не підлягають біодеградації	Ауткросинг може призвести до появи Bt-стійких комах. Негативний вплив на популяції метеликів
Підвищення харчової цінності рослин	Покращання біологічної цінності продуктів для населення країн, що розвиваються	Може мати слабкий ефект, бути рекламним трюком
Підвищення загальної стійкості	Можливість займатися сільським господарством у регіонах з несприятливими кліматичними умовами	Поява суперстійких рослин, що можуть витіснити інші
Стійкість до заморозків	Збільшення продуктивності сільського господарства	Можливі зміни клімату
Нові джерела продукції (лауринова кислота із ГМ-рапсу)	Зменшення затрат на виробництво деяких рослинних продуктів	Можливі економічні збитки у країнах, де застосовуються традиційні методи виробництва
Трансгенні тварини	Підвищення продуктивності виробництва продуктів тваринного походження	Під час потрапляння трансгенних тварин або риби із ферм у дику природу вони можуть витіснити природні популяції

Можливість переміщувати гени між різними таксономічними групами – це одна з реальних переваг біотехнологічного підходу в селекції. Традиційні методи селекції потребують багато часу і зусиль. Генно-інженерні методи дозволяють прискорити одержання нових рослин з новими властивостями.

Біотехнологія дозволяє виводити нові культури сільськогосподарських рослин за 2 – 3 роки, селекція – за 10 років і більше. Проте реалізація біотехнологічного підходу залежить від точного розуміння молекулярних основ явища. Наприклад, необхідно перенести властивість стійкості до холоду в сільськогосподарську культуру. Як правило, організм-донор є диким видом з низькою врожайністю та іншими непривабливими агрономічними характеристиками. Селекція може тривати десятки років. Клонування генів, відповідальних за морозостійкість, і внесення їх у

відповідну рослину відбувається без перенесення небажаних властивостей від рослини-донора. Джерелом генів стійкості до холоду можуть бути бактерії або клітини тварин. Продукти селекції рослин значно менш агресивні, ніж вихідні або дикі рослини. Експерименти, проведені у Великобританії, засвідчили, що генетично модифіковані рослини порівняно з їх дикими родичами не мають ніяких переваг щодо виживання у природних умовах. Це підтверджує низьку ймовірність виживання ГМ-рослин, стійких до дії гербіцидів і комах-шкідників, у природних умовах або можливість їхнього перетворення на супербур'яни.

Найзапекліші дискусії ведуться з приводу використання в агропромисловому виробництві генетично модифікованих організмів (ГМО).

Найпоширеніші генетично модифіковані культури – це соя, кукурудза, рапс, бавовник. Основна кількість трансгенів культивується у США, Канаді, Аргентині. В Австрії, Франції, Греції, Великобританії прийнятий мораторій на ввезення ГМ-продуктів.

З 2003 р. у країнах Європейського союзу введено обов'язкове позначення на етикетках товарів інформації про присутність ГМ-продуктів. За європейськими нормами максимально допустимий вміст ГМ-організмів у продуктах – 0,9%. Близько 2/3 продовольчих товарів США містять ГМ-інгредієнти. Точна і достовірна інформація відносно безпеки біотехнологічних продуктів повинна бути доступна всьому населенню. Відповідно до рекомендацій ВООЗ оцінюється потенційна токсичність, канцерогенність та алергенні властивості генетично модифікованих організмів.

Необхідна об'єктивна оцінка можливих негативних наслідків для людини і довкілля застосування генетично модифікованих організмів. При цьому особливу увагу необхідно звертати на те, що агросфера є штучно створеною людиною системою з пригніченими механізмами природної стійкості, і тому варто дуже обережно оцінювати наслідки поширення у ній нових організмів.

На сьогодні генна інженерія технічно недосконала, оскільки не здатна управляти процесом вбудовування нового гена. Знання про ДНК неповні, вивчені функції лише 3% ДНК. Неможливо передбачити місце вбудовування й ефекти нового гена. Важко визначити довготривалі наслідки генних маніпуляцій.

У 1998 р. англійський учений Арпад Пустаї на основі проведених експериментів уперше заявив, що вживання піддослідними щурами

генетично модифікованої картоплі спричинило серйозні пошкодження їх внутрішніх органів та імунної системи. У тварин виникли деякі серйозні зміни органів травлення, печінки, щитовидної залози, селезінки, зменшився об'єм мозку. Це повідомлення викликало різні реакції. Інститут, в якому працював А. Пустаї, заявив, що результати його досліджень є необ'єктивними. Однак незалежна комісія з 20 учених різних країн підтвердила правильність висновків А. Пустаї. Безпечність генетично модифікованих продуктів підлягає суттєвій переоцінці.

У травні 1999 р. Джон Луза заявив, що пилок генетично модифікованої пшениці, який містить невелику частку пестицидів, здатний знищувати личинок метелика данаїди. У листопаді 1999 р. була проведена спеціальна наукова конференція з обговорення результатів А. Пустаї і Дж. Лузи, однак єдина точка зору не була прийнята. Деякі вчені вважають, що лабораторні дослідження не можуть відтворити умови живої природи. Наявність подібних суперечностей свідчить про те, що виведення генетично модифікованих рослин і тварин становить загрозу, обумовлену непередбачуваністю їх розвитку і поведінки у природних умовах.

Розрізняють екологічні, медичні та соціально-економічні ризики (негативні наслідки) застосування трансгенних рослин і тварин.

Екологічні ризики

- Поява супершкідників, стійких до дії природних токсинів (на бавовникових полях був виявлений шкідник, що стійкий до дії Bt-токсину).
- Порушення природного балансу (доведено, що ГМ тютюн чи технічний рис, що використовуються для виробництва пластику і лікарських препаратів, смертельно небезпечні для гризунів, які мешкають на полях).
- Вихід трансгенів з-під контролю, поява супербур'янів, стійких до дії пестицидів і гербіцидів, шкідників.

Відомі випадки перенесення генів стійкості до гербіцидів від генетично модифікованого рапсу до дикої гірчиці. Ризику перенесення генів із трансгенних рослин до диких видів або бур'янів можна уникнути, дотримуючись правильної агротехнології.

Медичні ризики

- Підвищена алергійна небезпека генетично модифікованих продуктів. Зазвичай тестування ГМ-продуктів на алергіках не входить до програми досліджень нових продуктів.

– Потенційна токсичність і загроза для здоров'я людини. Не існують надійні методи перевірки безпеки генно-інженерних продуктів. У 1989 р. японська хімічна компанія Showa Denko випустила на американський ринок новий ГМ-варіант харчової добавки L-триптофан. У результаті 37 людей загинуло, а понад 5000 стали інвалідами з потенційно смертельним діагнозом – синдром еозинфільної міалгії – невиліковне захворювання крові. Відомо, що на прояви токсичної дії білка можна чекати більш ніж 30 років. Для з'ясування безпеки ГМ-продуктів проводять лише трирічні випробовування.

– Стійкість до дії антибіотиків. Для того щоб зрозуміти, чи вбудувався необхідний ген у ланцюг ДНК, спеціалісти-генетики мітять його маркерним геном стійкості до антибіотиків. Але видалити маркерний ген неможливо. Таким чином, уживання в їжу ГМ-продуктів нейтралізує дію антибіотиків, що приймаються як ліки.

– Можлива поява нових небезпечних вірусів. Вбудовані в геном гени вірусів можуть з'єднуватися з генами інфекційних вірусів. Нові віруси можуть бути більш агресивними і менш видоспецифічними (віруси рослин можуть стати шкідливими для комах, тварин, людини).

Соціально-економічні ризики

Більшість соціальних та економічних загроз генної інженерії стосується продовольчої безпеки. Вивчення економічного ефекту використання генних технологій, а саме рівня врожайності трансгенних рослин має неоднозначні результати. У деяких випадках урожайність ГМ-культур була значно нижчою, ніж традиційних. Учені дійшли висновку про те, що ефективність нових культур залежить від багатьох чинників: поширення бур'янів і комах-шкідників, погодних умов, типу ґрунтів та ін.

Трансгенні рослини не можуть утворювати насіння, тому щороку необхідні витрати на придбання ГМ-насіння у біотехнологічних компаній. У випадку широкого застосування трансгенних рослин усього 10 компаній можуть контролювати 85% світового агрохімічного ринку. При цьому споживачі не будуть мати свободу вибору у придбанні продуктів.

Контрольні запитання

1. Які методи використовуються у генній інженерії?
2. Охарактеризуйте етапи виділення генів.

3. Поясніть, яким чином здійснюють хімічний синтез і конструювання генів.

4. Що таке вектори? Який тип векторів найчастіше використовується у генній інженерії?

5. Опишіть способи введення рекомбінантних плазмід у бактерію *E.coli*.

6. Що таке клонотека генів? Яким чином можна розрахувати розмір клонотеки генів?

7. Порівняйте будову мРНК і кДНК. Поясніть, як можна одержати кДНК на основі мРНК.

8. Чому в генній інженерії використовують різноманітні системи експресії рекомбінантних генів?

9. Що таке дидезоксинуклеотиди? Як за їх допомогою визначають нуклеотидну послідовність ДНК?

10. Що таке ампліфікація? Поясніть роль ПЛР в ампліфікації фрагментів ДНК.

11. Які вектори використовуються для трансформації рослинних клітин?

12. Чому під час створення трансгенних рослин перспективнішим є введення трансгенів у ДНК хлоропластів, а не ядра?

13. Поясніть молекулярні механізми фіксації атмосферного азоту. Чи є можливим створення трансгенних рослин, здатних фіксувати атмосферний азот?

14. Поясніть роль мікроорганізмів у синтезі фітогормонів, сидерофорів.

15. Поясніть роль мікроорганізмів у синтезі інсектицидів. Які переваги мають біологічні інсектициди перед хімічними?

16. Поясніть, як за допомогою методів генної інженерії створюють трансгенні рослини з такими властивостями:

- стійкість до комах-шкідників;
- стійкість до вірусів;
- стійкість до фітопатогенних грибів і бактерій;
- стійкість до гербіцидів;
- стійкість до сольового стресу.

17. Опишіть основні етапи технології одержання трансгенних тварин.

18. Проаналізуйте переваги і недоліки використання трансгенних рослин і тварин у сільському господарстві.

19. Які наслідки може мати неконтрольоване поширення трансгенних організмів у дикій природі?

20. Яке практичне значення мають нові напрями генних досліджень – геноміка та генна психологія?

РОЗДІЛ 2. БІЛКОВА ІНЖЕНЕРІЯ

Білкова інженерія – це напрям молекулярної біології, що досліджує можливості одержання білків з новими властивостями.

Білкову інженерію також називають генною інженерією білків.

У багатьох промислових процесах використовуються ферменти – біологічні каталізатори білкової природи. Відомо, що ферменти прискорюють хімічні реакції до 10^{17} разів. Ферменти використовуються у процесах хімічного синтезу, як біосенсори, лікарські засоби, для одержання харчових продуктів, детергентів і синтетичних миючих засобів. Застосування ферментів у промисловості обмежується їх низькою активністю і термостабільністю в умовах *in vitro*. Це потребує пошуку ефективніших біокаталізаторів, у тому числі створення штучно змінених ферментів методами білкової інженерії.

Раціональний дизайн і направлена еволюція білкових молекул

Раціональний дизайн і направлена еволюція білкових молекул є основними напрямками досліджень у білковій інженерії.

Раціональний дизайн білкових молекул полягає у створенні на основі теоретичних уявлень нових білків, що володіють заданими властивостями. Такий підхід потребує глибоких знань про будову і функціонування створених білкових молекул. Раціональний дизайн базується на використанні законів формування просторової структури білків і механізмів ферментативного каталізу. Конструювання білкової молекули *de novo* полягає в одержанні нової амінокислотної послідовності, що не зустрічається у природі. Також завданням раціонального дизайну є здійснення структурних перебудов молекул відомих білків з метою зміни їх властивостей і біологічної активності.

Направлена еволюція білкових молекул полягає у створенні клонотек нуклеотидних й амінокислотних послідовностей та подальшому відборі ланцюгів із необхідними властивостями.

Мутації та мутагенез, їх застосування в білковій інженерії

Мутації – це спадкові зміни структури генома.

Процес виникнення мутацій називають **мутагенезом**.

Залежно від факторів, що спричиняють мутації, їх поділяють на спонтанні та індуковані. Спонтанні мутації виникають довільно протягом життя організму у звичайних умовах навколишнього середовища.

Індуковані мутації виникають унаслідок впливу на організм мутагенних факторів, насамперед опромінення і хімічних мутагенів.

Залежно від молекулярних процесів, що лежать в основі виникнення мутацій, їх класифікують на генні, хромосомні та геномні.

За **геномних мутацій** відбувається зміна кількості хромосом, кратна геному. Наприклад, якщо число хромосом у диплоїдному геномі позначити як $2n$, то в результаті геномної мутації відбувається утворення поліплоїдних організмів, геном яких містить $4n$, $6n$ хромосом тощо.

Геномну мутацію також називають поліплоїдизацією. Залежно від походження хромосом у поліплоїдах розрізняють аллоплоїдію та аутоплоїдію.

В результаті аллоплоїдії відбувається об'єднання різних геномів (гібридизація). Для аутоплоїдії характерно збільшення числа хромосом одного генома, кратне $2n$.

За **хромосомних мутацій** відбувається зміна кількості (анеуплоїдія) або структури окремих хромосом (хромосомні аберації).

Розрізняють такі типи хромосомних аберацій:

- делеції – втрата частини генетичного матеріалу;
- дуплікації – подвоєння частини генетичного матеріалу;
- інверсії – зміна орієнтації сегментів хромосом;
- транслокації – перенесення частини генетичного матеріалу з однієї хромосоми на іншу.

Найчастіше виникають **генні мутації**, за яких відбуваються структурні зміни в межах одного гена. Унаслідок генних мутацій виникають заміни, делеції, вставки одного чи кількох нуклеотидів або транслокації, дуплікації та інверсії різних частин гена.

Мутації, унаслідок яких змінюється лише один нуклеотид, називають **точковими**. Точкові мутації поділяються на два класи:

- 1) транзиції – заміна пурину на пурин або піримідину на піримідин;
- 2) трансверсії – заміна пурину на піримідин і навпаки.

Розрізняють 3 генетичних наслідки точкових мутацій:

- збереження смислового кодона (синонімічна заміна нуклеотиду);
- зміна смислового кодона, що призводить до заміни амінокислоти в певному положенні поліпептидного ланцюга (міссенс-мутація);
- утворення несмислового кодона, що зумовлює передчасну термінацію (нонсенс-мутація).

Білкова інженерія дозволяє створювати і досліджувати білки, що не існують у природі і володіють новими біохімічними властивостями. Найпоширенішим підходом до одержання нових і зміни існуючих природних білків є їх біосинтез *in vivo* або *in vitro*. Спочатку створюють ген досліджуваного білка, а потім клонують у векторі і здійснюють експресію гена.

Для індукування мутацій у клонованих генах з метою одержання мутантних білків використовують дві групи методів:

- 1) випадковий мутагенез (уведення багатьох мутацій, їх положення не контролюється);
- 2) направлений або сайт-специфічний мутагенез (мутації вводять у точно визначені ділянки ДНК).

Випадковий мутагенез здійснюється шляхом інкубації нуклеїнових кислот з хімічними мутагенами. Випадковий мутагенез широко застосовується під час здійснення направленої еволюції білкових молекул.

Направлений мутагенез дозволяє змінювати окремі амінокислотні залишки у молекулах білків. Він найчастіше використовується під час здійснення раціонального дизайну білкових молекул.

Унаслідок мутацій змінюється амінокислотна послідовність синтезованого білка. Змінюючи специфічні сайти білкової молекули, можна підвищити термостабільність білка, змінити його чутливість до рН, специфічність, алостеричну регуляцію, потребу у кофакторі та інші властивості.

Сучасні досягнення білкової інженерії. Зміна властивостей ферментів

Використання хімічних методів для направленої зміни властивостей ферментів розпочалося у 1966 р. з праць Л. Полгара і М. Бендера, а також К. Ніїта і Д. Кошланда, які в активному центрі субтилізна залишок серину замінили на цистеїн (хімічний мутагенез на рівні білкової молекули).

У 80-х роках ХХ ст. Е. Кайзер приєднав флавіновий кофермент до папаїну, що супроводжувалося перетворенням протеїнази в оксидоредуктазу.

З метою підвищення стабілізації молекул ферментів здійснюють заміну одних амінокислот на інші. Наприклад, термостабільність тріозофосфатізомерази вдалося підвищити шляхом заміни амінокислот у двох положеннях. Досить часто замінюють аспарагін і глутамін на інші амінокислоти. Це пов'язано з тим, що за високих температур залишки

аспарагіну і глутаміну підлягають дезамінуванню з утворенням аміаку, аспарагінової і глутамінової кислот, що призводить до втрати конформації поліпептидного ланцюга й активності ферментів.

Як відомо, тривалість напівжиття білків-ферментів становить від кількох хвилин до кількох годин. Така варіабельність пов'язана із відмінностями в кількості дисульфідних зв'язків у білковій молекулі і наявністю або відсутністю на N-кінці молекули певних амінокислот. Наприклад, якщо до N-кінця молекули ферменту β -галактозидази приєднати різні амінокислоти, то тривалість існування модифікованого білка *in vitro* може змінитися від 2 хв до 20 год. (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Період напівжиття β -галактозидаз, що містять на N-кінці різні амінокислоти

Приєднані амінокислоти	Період напівжиття
Метіонін, серин, аланін	> 20 год.
Треонін, валін, гліцин	> 0 год.
Ізолейцин, глутамінова кислота	> 30 хв
Тирозин, глутамін	\approx 10 хв
Пролін	\approx 7 хв
Фенілаланін, лейцин, аспарагінова кислота, лізин	\approx 3 хв
Аргінін	\approx 2 хв

Амінокислоти, що подовжують тривалість життя білків, можна вбудовувати у білки генно-інженерними методами. Введення в білки додаткових амінокислотних залишків приводить до їх стабілізації. Наприклад, уведення кількох амінокислотних залишків у поліпептидний ланцюг протеїнази *Bacillus stearothermophilus* приводить до підвищення активності ферменту у 340 разів за температури 100°C.

На сьогодні ковалентні і нековалентні хімічні модифікації білків є поширеним підходом до зміни їх властивостей.

Існують три сучасних підходи до покращання властивостей ферментів.

1. Хімічні модифікації.

Хімічні модифікації – це група методів стабілізації ферментів і зміни їх субстратної специфічності шляхом уведення невеликих функціональних груп. Ковалентна модифікація ферментів багатфункціональними реагентами використовується для введення в білки нових функціональних груп, підвищення їх розчинності в органічних розчинниках і зміни інших біохімічних властивостей. Використовуючи модифікацію ферментів поліетиленгліколем, можна збільшити їх тривалість напівжиття і знизити антигенність. Хімічні модифікації дозволяють підвищувати стабільність й

активність ферментів, змінювати їх специфічність. Недоліком цих методів є неможливість здійснення контролю за повнотою проходження реакцій.

2. Стабілізація ферментів для функціонування в органічних розчинниках.

Властивості ферментів як біокатализаторів не залежать від природи органічних розчинників, оскільки в органічному середовищі структура активного центру не змінюється. В органічних розчинниках ферменти зберігають свої основні характеристики, а у водних розчинах – ні. Для використання ферментів в органічному середовищі необхідно їх кристалізувати.

Використання органічних розчинників замість води як середовища для проведення хімічних реакцій на основі біокаталізу має низку переваг: підвищення розчинності гідрофобних субстратів, зміщення рівноваги хімічної реакції в напрямку утворення продуктів реакції.

3. Молекулярний імпринтинг – це штучне створення гібридних білків із фрагментів природних білків різного походження.

Сучасні методи генної і білкової інженерії дозволяють вводити в поліпептидні ланцюги елементи вторинної структури інших білків, вбудовувати нові функціональні домени, а також об'єднувати цілі білкові молекули в одному поліпептидному ланцюгу.

Метою конструювання гібридних білків є покращання властивостей вихідних молекул для продуктивнішого їх використання, створення білків і ферментів з новими властивостями. Дослідження в галузі гібридних білків спрямовані на зміну кінетичних параметрів ферментів, їх субстратної специфічності, оптимуму рН, термостабільності, а також створення біфункціональних і багатофункціональних білкових молекул.

Створення гібридних білків є різновидом раціонального редизайну білкових молекул. Наприкінці 80-х років ХХ ст. створено біфункціональні ферменти, які у складі одного поліпептидного ланцюга об'єднують різні ферменти: β -галактозидазу і галактозодегідрогеназу, малатдегідрогеназу і цитратсинтазу. Встановлено, що сумарна активність таких систем у 2 – 3 рази вища, ніж активність сумішей окремих ферментів. Створюються нові гібридні мультиферментні комплекси.

Абзими – каталітичні антитіла

У 1986 р. Р.А. Лернер і П.Г. Шульцц установили, що молекули антитіл можуть володіти каталітичною активністю. В організмі людини виявили абзими, поява яких асоційована з деякими поширеними

захворюваннями. Було з'ясовано, що важкі форми гемофілії можуть виникати внаслідок утворення автоімунних каталітичних антитіл, які розщеплюють фактор VIII (білковий фактор згортання крові). За гепатиту В виявили антитіла, що володіють РНКазною активністю (каталізують розщеплення РНК).

Виник новий напрям білкової інженерії зі штучного конструювання ферментів на основі поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів. Абзими, одержані з допомогою методів білкової інженерії, можуть здійснювати реакції, які не каталізуються природними ферментами. Це використовується для вибіркової активації попередників токсичних сполук під час хіміотерапії онкологічних захворювань.

Створено абзими, що здатні гідролізувати токсичні фосфорорганічні сполуки. Ця можливість застосування абзимів для проведення реакцій, які супроводжуються утворенням високореакційноздатних проміжних сполук: карбокатионів, 1,3-диполей, триплетних бірадикалів. Установлено, що абзими можуть здійснювати синтез амідів, каталізувати реакції стереоспецифічної циклізації. Такі приклади вказують на значний потенціал абзимів як штучних біокаталізаторів хімічних реакцій.

Контрольні запитання

1. Порівняйте властивості ферментів і хімічних каталізаторів. Які властивості ферментів обмежують їх застосування у промисловості?
2. Які особливості будови ферментів визначають тривалість їх існування? За допомогою яких методів можна змінити тривалість напівжиття ферментів?
3. Які властивості ферментів можна змінити за допомогою направлено мутагенезу?
4. Як впливає заміна аспарагіну на інший амінокислотний залишок на стабільність білка?
5. Яким чином можна змінити потребу ферменту у кофакторах?
6. Які властивості ферментів можна змінити за рахунок їх хімічних модифікацій?
7. Що таке молекулярний імпринтинг?
8. Які переваги має використання органічних розчинників замість води для проведення реакцій ферментативного каталізу?
9. Порівняйте ефективність каталізу за участі мультиферментних систем та індивідуальних ферментів.
10. Що таке абзими? Яке їх практичне значення?

РОЗДІЛ 3. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

Клітинна інженерія – це напрям біології, спрямований на одержання нової генетичної інформації за допомогою гібридизації і реконструкції клітин, що є в культурі.

Культури еукаріотичних клітин застосовують для синтезу природних хімічних сполук, вирощування вірусної біомаси, яку застосовують для виробництва вакцин і діагностики вірусних захворювань. Культури рослинних клітин використовують для мікроклонального розмноження цінних рідкісних рослин або створення нових сортів сільськогосподарських культур.

Розрізняють такі типи клітинних культур:

- первинні культури, які практично можна одержати з будь-якого органа, але через 2–3 тижні вони гинуть;
- диплоїдні культури одержують, як правило, з ембріональних тканин, в яких тривалий час зберігаються вихідні біологічні властивості (клітини зазнають приблизно 50 поділів);
- клітинні (перещеплені) лінії, які можуть існувати поза організмом десятки років.

Культивування клітин. Клітинні лінії

Однією з основних властивостей культури клітин є обмежена тривалість життя. Після 50 – 100 поділів клітини культури гинуть. Чим молодший вік організму, з якого одержані клітини для культивування в культурі, тим більшу кількість разів вони здатні ділитися, перш ніж загинуть. Наприклад, клітини плода здатні ділитися в культурі 50 разів, клітини новонародженого – 30 разів. Іноді в культурі виявляються мутантні клітини, які можуть ділитися необмежену кількість разів. Такі клітини можуть утворити клітинну лінію.

Клітинна лінія – це клітини, які можна культивувати поза організмом протягом невизначено тривалого часу. Багато з клітинних ліній походять з пухлин. З 1951 р. культивується в культурі лінія анеуплоїдних (60 – 70 хромосом) пухлинних клітин, відомих під назвою HeLa. Ці клітини одержано з пухлинної тканини матки померлої від раку негритянки Ганрієти Лак (США). Тепер ця клітинна лінія в умовах лабораторій за показниками росту перевершує інші клітинні лінії, добуті пізніше від хворих на рак людей білої раси. Найпоширеніші клітинні лінії наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Найпоширеніші клітинні лінії

Клітинна лінія	Тип клітин і організм, з якого добуто клітинну лінію
3T3	Фібробласт миші
BHK 21	Фібробласт сирійського хом'ячка
Hela	Епітеліальна клітина людини
L 6	Міобласт пацюка
PC 12	Хромафінова клітина пацюка
SP 2	Плазматична клітина миші
PTK 1	Епітеліальна клітина пацюка кенгурового

Більшість клітинних ліній культивують на твердій поверхні, хоча деякі (BHK 21, Hela, SP 2) можуть рости в суспензії. Клітини, які прикріплені до субстрату, здебільшого ущільнені і мають витягнуту веретеноподібну форму. Клітини, що ростуть у суспензії, як правило, мають сферичну форму.

Для культивування клітин використовують пластикові або скляні ємності, поверхня яких підготовлена для прикріплювання клітин. З метою забезпечення стерильності використовують стерильний посуд разового використання. Після висівання на поживне середовище культури клітин культивують за температури 37°C, pH = 6,8 – 7,5 у середовищі, що містить 5% CO₂ і 95% повітря. Зміна pH на 0,2 – 0,4 призводить до загибелі клітин.

Для підтримання функціонально активного стану культури клітин застосовують стандартні поживні середовища, основними компонентами яких є мінеральні солі, амінокислоти, вітаміни, антибіотики.

Таблиця 3.2

Склад середовища Ігла

Компонент середовища	Концентрація		Компонент середовища	Концентрація	
	мг/л	ммоль/л		мг/л	ммоль/л
<i>Солі (збалансований сольовий розчин Ерла)</i>					
NaCl	6800	10,0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	0,5
KCl	400	5,0	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	150	1,0
CaCl ₂	200	1,0	NaHCO ₃	2000	20,0
<i>Амінокислоти</i>					
Аргінін-HCl	21	0,1	Метіонін	7,5	0,05
Гліцин	292	2,0	Фенілаланін	18	0,1
Цистеїн	12	0,05	Триптофан	4	0,02
Гістидин-HCl	9,5	0,05	Тирозин	18	0,1
Ізолейцин	26	0,2	Треонін	24	0,2
Лізин-HCl	36	0,2	Валін	24	0,2
<i>Вітаміни</i>					
Біотин	1	10 ⁻⁵	Нікотинамід	1	10 ⁻⁵

Холінхлорид	1	10^{-3}	Пантотенат кальцію	1	10^{-3}
Фолієва кислота	1	10^{-3}	Рибофлавін	0,1	10^{-4}
Інозит	2	$2 \cdot 10^{-5}$	Тіамін	1	10^{-5}
<i>Добавки</i>					
Компонент	Концентрація (%)		Компонент	Концентрація (%)	
Стрептоміцин	0,005		Пеніцилін	0,005	
Феноловий червоний	0,0005		Сироватка (діалізована)	5	
Глюкоза	5				

У 1955 р. Г. Ігл для культивування клітин запропонував використовувати багатоконпонентну суміш, відому як середовище Ігла (табл. 3.2). Відомі модифікації складу поживного середовища Ігла, запропоновані іншими дослідниками.

Для стимулювання клітинного поділу у середовище культивування додають мітогени. Серед мітогенів розрізняють групу речовин, відомих під назвою фактори росту. Ці речовини є білками, вони мають властивості, подібні до гормонів. Ідентифіковані фактори росту нервів (ФРН), епідермісу (ФРЕ), фібробластів (ФРФ). Мітогенну дію мають також лектини. Основним джерелом лектинів є бобові, що містять 1,5–3% лектинів від загальної кількості білків.

Клітинну масу для культивування отримують, обробляючи відповідну тканину протеолітичними ферментами (трипсин, колагеназа) і сполуками, які зв'язують іони Ca^{2+} (ЕДТА). Потім тканину піддають м'якому механічному руйнуванню. Для ізолювання окремих клітин суспензію фракціонують. Більші клітини від менших відділяють методом седиментації або центрифугування. Розроблено сучасні методи ідентифікації клітин, що мають дуже високу продуктивність – 5 тис. клітин за 1 секунду. Виділені клітини переносять на поживне середовище для культивування. Поодинокі еукаріотичні клітини швидко гинуть. З урахуванням цього відібрані для культивування клітини наносять на шар клітин, які після опромінення втратили здатність до поділу, але ще на певний час зберегли метаболізм.

Для зберігання культури клітин використовують рідкий азот. Щоб запобігти пошкодженню клітин під час заморожування, до культури додають гліцерол. Перевагою клітинних ліній є те, що після розморожування вони зберігають здатність до розмноження протягом тривалого часу.

Клітинна інженерія рослин. Історія методу культури клітин рослин

Виділяють кілька періодів в історії методу культури клітин.

1834 – 1900 рр. – створення і розробка клітинної теорії. Найперші праці з ізолювання культур рослинних клітин належать Блоцишевському (1876), Брауну і Моррісу (1892), Бонне і Саксу (1893). У цих дослідженнях із насіння виділяли зародки і вирощували їх у штучних умовах.

1900 – 1922 рр. – формування ідеї культури тканин. У 1902 р. Г. Габерланд описав метод культивування окремих рослинних клітин. Основи експериментальної ембріології рослин були закладені Моссартом (1902). У 1921 р. Мольяр культивував сегменти кореня редьки, а Котте розробив поживне середовище для культивування меристеми коренів (1922).

1922 – 1934 рр. – пошук методів тривалого культивування тканин. Уайт і Готре встановили, що ізольовані тканини можуть рости в культурі необмежений час, якщо їх вчасно пересаджувати на свіже поживне середовище.

1934 – 1960 рр. – розробка техніки культури рослинних тканин і дослідження видів, що можуть вирощуватися *in vitro*. Уперше сприятливі умови для поділу окремих рослинних клітин у культурі вдалося створити у 1954 р. Мьюіру, Хільденбранту і Райкеру. Цей метод полягає у використанні калусної тканини для культивування окремих клітин. Ізольовану клітину поміщають на фільтр, який розміщують на калусну тканину, з якої була виділена клітина. Контакт ізольованих клітин з калусною тканиною стимулює їх ріст і поділ у культурі. Коли з однієї клітини утворюється тканина розміром 0,5–1 мм, її переносять на поживне середовище.

До 1960 р. було описано понад 140 видів рослин, клітини яких можна вирощувати в культурі. Розроблено поживні середовища для культивування клітин, вивчений вплив макро- і мікроелементів, вітамінів і стимуляторів росту на ріст клітин у культурі (Хеллер, Ніч, Скуг, Стевард, Бутенко).

1960 – 1975 рр. – розроблений метод одержання протопластів. Е. Коккінг одержав протопласти із тканин коренів і плодів томатів шляхом обробки їх сумішшю пектолітичних і целюлолітичних ферментів. У цей період розроблено методи одержання безвірусних рослин із меристематичних тканин.

З 1976 р. розроблено методи злиття протопластів і селекції гібридних клітин, культивування гаплоїдних клітин й одержання нових сортів

сільськогосподарських рослин. Створено системи іммобілізованих клітин для одержання різних хімічних сполук та їх біотрансформації. Одержано трансгенні рослини.

Основні напрями клітинної інженерії рослин

Виділяють 3 напрями створення нових технологій на основі культивування клітин і тканин рослин:

- 1) одержання промисловим шляхом цінних біологічно активних речовин рослинного походження (токсини, регулятори росту, алкалоїди, стероїди, терпеноїди);
- 2) використання тканинних і клітинних культур для швидкого мікроклонального розмноження й оздоровлення рослин;
- 3) технології, пов'язані з генетичними маніпуляціями на тканинах, клітинах, ізольованих протопластах.

Лінії рослинних клітин є продуцентами корисних речовин. Вони здатні накопичувати цінні продукти в кілька разів більше, ніж самі рослини. Так, мутантні клітинні лінії раувольфії зміїної містять у 10 разів більше цінного для медицини алкалоїду аймаліну, ніж рослини. Створено штам клітин рути пахучої, який містить у 220 разів більше алкалоїду рутакридона, ніж дика рослина. Культивування рослинних клітин використовується у промислових масштабах для одержання фізіологічно активних сполук. Налагоджене виробництво біомаси женьшеню для потреб косметичної і медичної промисловості. Інший напрям клітинної інженерії – це мікроклональне розмноження рослин на основі культури тканин. За допомогою цього методу з однієї клітини одержують від 10 тисяч до 1 млн рослин за рік. Методи клітинної інженерії дозволяють скоротити процес селекції з 10 – 12 до 3 – 4 років.

Перспективним способом виведення нових сортів є метод злиття клітин, що дозволяє отримувати гібриди, долаючи міжвидову несумісність. З допомогою методу злиття клітин отримано гібриди різних видів рослин: картоплі, томатів і тютюну; тютюну і картоплі; рапсу і турнепсу; тютюну і беладонни. На основі гібридів культурних і диких видів створюють нові сорти сільськогосподарських рослин.

Культури клітин вищих рослин

Окремі клітини культивують для одержання клонів, вивчення їх генетичної і фізіологічної мінливості або стабільності. Культивування

окремих клітин дозволяє вивчати умови, що стимулюють поділ клітин, ізольованих від впливу інших клітин тканини.

Вирощування ізольованих клітин складається з двох етапів:

- 1) ізолювання непошкодженої клітини (обробка тканин ферментами);
- 2) створення умов, сприятливих для росту окремих клітин.

Рослинні клітини, на відміну від тваринних, менш вимогливі до умов культивування. Перевагою рослинних клітин є їх тотипотентність – з однієї клітини може бути регенована ціла рослина. Культура рослинних клітин дозволяє одержувати численні популяції за короткий термін.

Розрізняють 2 типи рослинних клітин, що культивуються: нормальні (калусна тканина) і пухлинні, що ростуть і діляться на поживному середовищі без додавання фітогормонів.

Основним типом рослинних клітин, що вирощуються в культурі, є каллус. Калусна тканина утворюється шляхом проліферації дедиференційованих клітин органів рослини. У природі калусна тканина виникає під час травмування рослин, вона захищає місце пошкодження і накопичує поживні речовини для регенерації. Для одержання калусних тканин фрагменти тканин різних органів рослин поміщають на штучне середовище, що містить ауксини в концентрації 0,5 – 10 мг/л. Процесу утворення каллуса передують дедиференціювання – втрата спеціалізації тканин експланта – тканина втрачає специфічну структуру, повертається до стану клітин, що діляться. Під час дедиференціювання змінюється активність генів, зникають тканино специфічні білки. Щоб запобігти зниженню здатності до поділу і росту, первинний каллус переносять на свіже поживне середовище через 28 – 30 днів.

Регенерація рослин з каллуса здійснюється двома шляхами:

- диференціація пагонів і коренів за рахунок зміни співвідношення фітогормонів (цитокінінів та ауксинів);
- утворення ембріодів.

Згідно з концепцією Скуга і Мурасіге утворення стебла, кореня і недиференційований ріст каллуса можна стимулювати, змінюючи концентрацію ауксинів і цитокінінів. Наприклад, за збалансованого співвідношення ауксинів і цитокінінів у тютюну спостерігається індукція утворення каллуса; за надлишку цитокінінів утворюються стеблові бруньки, а за надлишку ауксинів формуються корені.

У культурі клітина зазнає послідовних змін: втрата специфічності, ембріональний ріст, вторинна диференціація каллуса. Загальна закономірність для культивованих клітин – зростання цитогенетичної варіабельності у процесі культивування. У процесі культивування утворюються багатоядерні клітини, спостерігається поліплоїдизація в результаті порушення мітозу. Виникають зміни і на хромосомному рівні: транслокації, делеції. Для селекції генетична мінливість клітин каллуса має певний інтерес. У США із клітин каллуса одержано поліплоїдні форми тютюну.

Клітинна селекція

Клітини в культурі *in vitro* відрізняються за морфологією, біохімічними властивостями, фізіологічним станом, генетично. Це явище дістало назву аноклональної варіабельності. Генетична природа і механізм виникнення самоклональної варіабельності малодосліджені. Гетерогенність культури клітин зумовлена генетичною і модифікаційною мінливістю. Мутації відбуваються на генному, хромосомному і геномному рівнях. Клітини різного рівня плоідності відрізняються за швидкістю поділу і росту, при цьому один із типів клітин стає домінуючим, здійснюється клітинна селекція. Модифікаційні зміни клітин у культурі мають адаптивний характер, забезпечують фізіологічну адаптацію. Спонтанне утворення різних варіантних форм клітин у культурі можна використовувати для покращання існуючих сортів сільськогосподарських культур. Практичне значення має створення форм рослин, стійких до несприятливої дії чинників зовнішнього середовища: низькі температури, засолення ґрунтів, забруднення довкілля токсичними речовинами, дія шкідників. Застосування клітинних технологій значно прискорює процес селекції.

Для прискорення селекції в культурі клітин використовують хімічні і фізичні мутагени. Найчастіше для підвищення частоти мутацій у соматичних клітинах використовують такі мутагени: нітрозогуанідин, нітрозометилсечовина, метилметансульфонат. Рідше застосовують опромінення ультрафіолетом, γ -квантами, ^{60}Co і нейтронами. Як селективні агенти використовуються антибіотики, інгібітори синтезу нуклеїнових кислот, аналоги пуринових і піримідинових азотистих основ, фітотоксини, аналоги амінокислот, речовини, що зумовлюють водний і сольовий стреси.

Як об'єкти у клітинній селекції в умовах *in vitro* можна використовувати каллусні культури та ізольовані протопласти, культури соматичних або андрогенних ембріоїдів, культури ізольованих зародків, органідні експланти (сегменти листків, стебел).

Переваги методу клітинної селекції *in vitro* порівняно із селекцією на рівні цілих рослин:

- мутантні ознаки на рівні окремих клітин проявляються досить швидко;
- можна одержувати нові типи мутацій, у тому числі біохімічного характеру;
- економія площі: у чашці Петрі діаметром 10 см можна культивувати $10^7 - 10^8$ клітин, а для такої ж кількості рослин необхідно понад 1000 га землі;
- економія часу і праці під час одержання бажаної ознаки.

Здійснення селекції на клітинному рівні дозволяє створювати нові форми рослин у 2 – 4 рази швидше порівняно із традиційними способами селекції. Наприклад, процес створення нових сортів з використанням клітинної селекції триває у середньому 3 – 4 роки, а під час селекції на рівні рослин – 10 – 12 років. Основною вимогою для успішного застосування клітинної селекції є ефективна система регенерації рослин.

Культури гаплоїдних клітин

Культури гаплоїдних клітин широко застосовуються у селекції. З гаплоїдних клітин одержують гаплоїдні рослини, що мають набір хромосом, характерний для гамет. Гомозиготні рослини використовуються для дослідження взаємодії генів, вивчення генетичної мінливості, кількісного генетичного аналізу. У таких рослин проявляються всі мутації, оскільки рецесивні мутації не маскуються домінантними алелями. Гомозиготні рослини позбавлені летальних або сублетальних мутацій.

За рахунок поліплоїдизації за дії колхіцину з гаплоїдів можна одержати гомозиготні диплоїди, які забезпечують прояв ознаки протягом багатьох поколінь. Гомозиготні лінії використовуються в селекції на гетерозис.

Гаплоїди одержують двома способами:

- 1) культивування *in vitro*: із незапліднених статевих клітин з редукованим набором хромосом можна регенерувати цілі рослини. Одержані при цьому гаплоїди стерильні;
- 2) віддалена гібридизація (в зиготі гібрида хромосоми одного з видів елімінують).

Гаплоїди вищих рослин одержують переважно із клітин спорогенної тканини пиляків (гаметофіт). Уперше гаплоїдні рослини одержано у 1964 р. індійськими вченими С. Гуха і С. Махешварі під час культивування пиляків дурману. Відтоді одержано більш ніж 200 видів гаплоїдних рослин, у тому числі пшениці, ячменю, жита, рису, картоплі. До 1984 р. у Китаї з клітин пиляків вирощено 40 видів рослин, у тому числі виведено короткостеблові і високоврожайні сорти рису.

За віддаленої гібридизації деяких видів встановлено явище селективної елімінації хромосом на ранній стадії розвитку гібридного зародка. Так, у процесі схрещення диплоїдних ячменів *Hordeum vulgare* (культурний) і *Hordeum bulbosum* (дикий) відбувається випадання хромосоми дикого виду й утворюється гаплоїд з набором хромосом культурного виду. За допомогою цього методу створено сорти ячменю Істок та Одеський-115.

Протопласти рослинних клітин як об'єкт біологічного конструювання

Протопласт – це клітина, позбавлена клітинної стінки. Він оточений цитоплазматичною мембраною, зберігає всі властивості рослинної клітини.

Уперше протопласти виділив Дж. Клеркер у 1892 р. механічним способом, а саме шляхом розрізання клітинної стінки. У 1952 р. Салтон уперше застосував ензиматичний метод руйнування клітинної стінки – за допомогою ферменту лізоциму зруйнував клітинну стінку бактерій. У 1960 р. Е. Коккінг за допомогою гідролітичних ферментів гриба *Myrothecium verrucaria*, що розщеплюють компоненти клітинної стінки, вперше одержав протопласти вищих рослин.

У сучасних дослідженнях для видалення клітинної стінки використовують ферменти трьох типів: целюлази, геміцелюлази і пектинази. Комбінація і співвідношення ферментів специфічні для кожного типу клітин. Порівняно з механічним методом видалення клітинної стінки ензиматичний має низку переваг: висока продуктивність (з 1 г тканини або клітин виділяють до 10 млн протопластів), швидкість, клітини не пошкоджуються.

Протопласти є унікальною моделлю для вивчення фізіологічних процесів у рослин. Ізольовані протопласти застосовуються для таких цілей:

- вивчення хімії і структури клітинної стінки, механізмів її репарації після руйнування;
- вивчення властивостей плазмалеми в нормі і за дії гормонів, фітотоксинів, інгібіторів;
- вивчення трансмембранних переміщень;
- вивчення взаємодії протопластів у популяції;
- уведення чужорідних органел або генів у рослинну клітину;
- вивчення взаємодії ядра і цитоплазми в гібридній клітині;
- одержання соматичних гібридів.

За допомогою протопластів можна одержувати гібриди клітин, долаючи несумісність віддалених видів і родів рослин. За рахунок злиття протопластів двох різних видів рослин одержують гетерокаріон, з якого утворюється соматичний гібрид. Уперше міжвидовий гібрид одержаний під час гібридизації протопластів двох сортів тютюну – *Nicotiana glauca* (24 хромосоми) і *Nicotiana langsdorfii* (18 хромосом) у 1972 р. Карлсоном. Гібридизація протопластів культурної і дикої картоплі (*Solanum tuberosum* і *Solanum chacoense*) дозволила одержати гібрид, стійкий до вірусних захворювань. Одержано життєздатні внутрішньовидові, міжвидові, міжродові гібриди. У 1977 р. Као і Веттер створили гібрид сої і тютюну. У 1978 р. Г. Мельхерс одержав гібрид картоплі і томатів, але він був стерильний. Японський учений Х. Кісака у 1997 р. створив міжродовий гібрид ячменю і рису.

За рахунок злиття протопластів одержано гібриди рослинних і тваринних клітин. Так, Едвард Коккінг отримав гетерокаріон, утворений з клітини амфібії і протопласта моркви. Також удалося отримати гібридні клітини тютюну і дрозофіли. Проте одержані гібридні клітини були не здатні до поділу. Протопласти також використовуються як реципієнти клітинних органел. Клітинні органели можна трансплантувати за допомогою ліпосом або шляхом мікроін'єкцій. У 1973 р. І. Потрікуч і Ф. Хоффман трансплантували ізольовані ядра петунії у протопласти тютюну. Крім ядер, трансплантують мітохондрії і хлоропласти. Трансплантування хлоропластів може сприяти активації фотосинтезу і підвищенню продуктивності рослин, трансплантування мітохондрій – активації тканинного дихання.

Мікроклональне розмноження рослин

Мікроклональне розмноження є новим методом вегетативного розмноження рослин. Цей метод дозволяє з окремих клітин одержати цілу рослину. **Мікроклональне розмноження** – одержання *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру.

Термін «клон» був запропонований у 1903 р. Уєбстером (з гр. *klon* – «пагін, придатний для розмноження рослин»).

Піонером мікроклонального розмноження є французький учений Жан Морель – у 50-х роках ХХ ст. він одержав перші рослини – регенеранти орхідей. У СРСР під керівництвом Р.Г. Бутенко були вивчені умови мікророзмноження картоплі, цукрового буряка, гвоздики, гербери. Перші праці з культури тканин деревних рослин опубліковано в середині 20-х років ХХ ст. У цей час Готре встановив, що камбіальні тканини деяких рослин здатні до утворення каллуса *in vitro*. У 60-х роках ХХ ст. Матес одержав перші рослини-регенеранти осики, доведені до ґрунтової культури. Понад 200 видів деревних рослин із 40 родин були розмножені *in vitro*.

Ефективність мікроклонального розмноження рослин залежить від фізіологічних особливостей рослин та умов їх культивування: температура (18 – 26°C), освітлення, вологість повітря (65 – 70%). Вихідні материнські рослини повинні бути здорові (не пошкоджені грибами, вірусами, бактеріями) і перебувати у стані інтенсивного росту. Як експлант краще використовувати молоді, малодиференційовані тканини, що містять меристему (молоді листки, бруньки). Експланти попередньо обробляють фунгіцидами й антибіотиками проти грибної і бактеріальної інфекції.

Етапи мікроклонального розмноження:

- відбір рослини-донора, ізолювання експлантів й одержання стерильної культури клітин;
- власне мікророзмноження – одержання максимальної кількості меристемних клонів;
- укорінення розмножених пагонів з подальшою їх адаптацією до умов ґрунту;
- вирощування рослин в умовах теплиці і підготовка їх до висадки у відкритий ґрунт.

Для культивування тканин на кожному етапі застосовують поживне середовище певного складу. Склад поживного середовища добирають для кожного виду рослин. На першому етапі до складу поживного середовища

вводять антибіотики в концентрації 100 – 200 мг/л для одержання стерильної культури, а також стимулятори росту (ауксини, цитокиніни), антиоксиданти (аскорбінова кислота – 1 мг/л, глутатіон – 4 – 5 мг/л) та інші біологічно активні речовини. Тривалість першого етапу становить 1 – 2 місяці.

На другому етапі основну роль під час вибору оптимальних умов культивування експлантів відіграє співвідношення в поживному середовищі цитокинінів та ауксинів.

На третьому етапі у складі поживного середовища зменшують у 2 – 4 рази концентрацію мінеральних солей, знижують вміст вуглеводів до 0,5 – 1%, виключають цитокиніни, залишають ауксини. Як відомо, ауксини стимулюють формування коренів.

На четвертому етапі рослини вирощують у теплиці, готуючи до висаджування у ґрунт. Найсприятливіший час для пересадки рослин-регенерантів у субстрат – весна і початок літа (висаджують рослини із 2 – 3 листками і сформованою кореневою системою). Як субстрат використовують торф, пісок (3:1), дерновий ґрунт, перліт. Субстрат стерилізують за температури 85 – 90°C протягом 1 – 2 год. Через 20 – 30 днів після висаджування у ґрунт рослини підживлюють мінеральними добривами. Процес адаптації рослин до умов ґрунту є найдорожчою і найбільш трудомною операцією.

Порівняно з традиційними способами розмноження метод мікроклонального розмноження має такі переваги:

- одержання генетично однорідного матеріалу;
- оздоровлення рослин, звільнення їх від вірусів за рахунок використання меристемної культури;
- високий коефіцієнт розмноження: 10^5 – 10^6 – для трав'яних і квіткових рослин, 10^4 – 10^5 – для кущів, 10^4 – для хвойних;
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які важко розмножуються вегетативно (деревні породи);
- можливість проведення робіт протягом року;
- тисячі рослин можуть рости на невеликій лабораторній площі (на 1 м² лабораторної площі можна за короткий термін виростити 100 тис. рослин-клонів);

- можливість автоматизації процесу вирощування.

Найбільш економічно вигідно розмножувати в культурі тканин селекційні сорти квітів: орхідей, агав, бегоній, хризантем, цикламенів, драцени, іриса, лілій, нарциса, флокса. За рік з однієї рослини гербери можна одержати до 1 млн рослин-клонів. Новою сферою застосування клонування у стерильному середовищі стало розмноження порід кущів, плодових культур, ананаса.

Штучні асоціації культури клітин вищих рослин і мікроорганізмів

Експериментальні клітинні системи, до складу яких входять рослинні клітини і мікроорганізми, називають **асоціаціями**.

Асоціації можуть бути:

- внутрішньоклітинні (мікроорганізми вводять в ізольовані протопласти вищих рослин);
- міжклітинні (спільно культивують клітини рослин і мікроорганізми).

Створення асоціацій рослинних клітин з мікроорганізмами має важливе теоретичне і практичне значення. Теоретичне значення полягає в експериментальній перевірці гіпотези теорії симбіотичного походження еукаріотичних клітин; реконструкції окремих стадій еволюційного процесу; моделюванні природних симбіотичних відносин рослин і мікроорганізмів, що відіграють важливу роль у процесі фіксації атмосферного азоту.

З прикладною метою експериментальні клітинні асоціації використовують для підвищення продуктивності синтезу рослинними клітинами корисних речовин, а також для одержання рослин з новими властивостями. Так, досліджується можливість створення рослин, що здатні до фіксації атмосферного азоту, за рахунок уведення азотфіксуючих мікроорганізмів. Проведено експерименти з уведення бактерій і дріжджів в ізольовані протопласти.

Розроблено такі способи введення мікроорганізмів у протопласти рослинних клітин: ендоцитоз, інтеграція мембран протопласта і мікроорганізму, уведення мікроорганізмів у складі ліпосом. Однак життєздатні системи на основі ізольованих протопластів не одержано, необхідні подальші дослідження.

Культури тваринних клітин. Історія методу

Широке застосування культури клітин людини і тварин розпочалося з праць, в яких була продемонстрована можливість вирощування вірусів в клітинній культурі (1949 р.). З цією метою використано клітини нирок людського ембріона, нирок дорослих мавп, ембріонів курчат. Застосування методу клітинних культур дозволило одержати віруси в необхідній кількості. Це сприяло розвитку методів діагностики вірусних захворювань й отриманню необхідних вакцин.

Можна виділити такі етапи в історії методу культури тваринних клітин:

1) наприкінці XIX ст. – на початку XX ст. було встановлено, що клітини тканин тварин можна виділити з організму і створити умови для їх росту і відтворення *in vitro*;

2) встановлена можливість вирощування і розмноження вірусів у тваринних клітинах;

3) обґрунтована можливість одержання в клітинах тварин вірусного матеріалу для виготовлення вакцин; можливість вбудовування генів у клітини; можливість вирощування в культурі з однієї клітини цілої популяції.

Основні дати історії методу культури тваринних клітин

1885 р. – Ру встановив можливість збереження живих тканин поза організмом, у своїх дослідженнях він показав, що оболонка ембріона курчат може зберігатися у теплому фізіологічному розчині.

1897 р. – Леб підтримував у життєздатному стані клітини крові і сполучної тканини у пробірках із сироваткою і плазмою крові.

1898 р. – Льюнгрен показав можливість підтримки в життєздатному стані експлантатів шкіри людини, при цьому зберігалася їх здатність до реімплантації.

1904 – 1907 рр. – Гаррісон здійснив дослідження, в яких експериментально довів можливість вирощування ізольованих клітин *in vitro*; учений виростив нейробласти жаби в лімфатичній рідині і встановив, що швидкість росту нервових клітин становить 20 мкм за 25 хв.

1911 р. – зоологи Каррель і Барроуз культивували тканини і клітини ссавців.

1928 р. – для спостереження за культурою клітин Канті розробив метод кінофотомікрофотографії.

1948 р. – Ерл уперше одержав клони клітин у культурі.

1952 р. – Джей виділив клітинну лінію карциноми шийки матки.

1961 р. – Хейфлік і Мурхед виділили лінію диплоїдних клітин людини і показали, що її період існування в культурі становить приблизно 50 подвоєнь популяції.

Надалі успіхи в розробці культури тваринних клітин і тканин зумовлено створенням і вдосконаленням синтетичних поживних середовищ.

У технології культивування клітин тварин і людини використовуються такі методики:

- методики одержання клітин, що не містять бактерій і грибів;
- методики розробки середовищ, в яких відбувається ріст ізольованих клітин;
- методики спостереження за клітинами в динаміці їх розвитку;
- методики безперервного культивування клітин *in vitro*.

Установлено, що диплоїдні клітини людини генетично стабільні, вільні від латентних й онкогенних вірусів. Тому лінії диплоїдних клітин людини дозволяють використовувати для одержання цінних речовин. Але новітні дослідження засвідчили, що клітини містять потенційно небезпечні онкогени, які можуть індукувати утворення пухлин.

Гібриди соматичних клітин

За допомогою гібридних клітин досліджують механізми перетворення нормальної клітини у пухлинну, закономірності взаємодії вірусів з клітинами тварин і людини, регуляцію клітинного поділу.

У 1960 р. Ж. Барський зробив першу спробу гібридизації соматичних клітин. У звичайних умовах утворення гібридних клітин відбувається дуже рідко, тому була розроблена техніка гібридизації соматичних клітин з використанням інактивованих вірусів парагрипу на зразок Сендай, що здатні «склеювати» і зливати клітини між собою. Отримано міжвидові гібридні клітини: людини і миші, курки і людини, москіта і людини. Крім того, виявилось можливим гібридизувати клітини з різних тканин: лімфоцити і фібробласти, нормальні та пухлинні клітини.

Метод гібридизації соматичних клітин людини і тварин застосовують для отримання моноклональних антитіл (див. розділ «Медична біотехнологія»). Продуцентами моноклональних антитіл є гібридами, отримані шляхом злиття лімфоцитів людини з клітинами мієломи мишей.

Клонування тварин

Клонування – це сукупність процедур, що використовуються для одержання клонів – генетично однорідних організмів, що є точними копіями одного предка.

Клонування багатоклітинних організмів здійснюється шляхом пересадки ядер соматичних клітин у позбавлену ядра запліднену яйцеклітину. Використовуючи цей метод, Дж. Гердон у 1977 р. клонував жаб. У 1981 р. Л. Шетлз одержав 3 клоновані ембріони людини, але зупинив їх розвиток. Пізніше (у 1987р.) здійснено розділення клітин ембріона людини і клонування людського ембріона до стадії 32 клітин; одержані ембріони були знищені.

Експерименти з клонування людини заборонені. Рада Європи прийняла конвенцію про заборону клонування людини, яку підписали 19 держав. У грудні 2004 р. в Україні був прийнятий закон про заборону репродуктивного клонування людини. Клонування органів людини дозволено в Бельгії і Нідерландах.

У 1997 р. була клонована вівця Доллі, у 1998 р. – теличка, у 2004 р. – дрозодфіла. Клонування тварин здійснюють шляхом перенесення ядер соматичних клітин. Із заплідненої яйцеклітини видаляють ядро, замінюють його ядром соматичної клітини, після імплантації ембріона в матку розвивається організм, ідентичний донору соматичної клітини. Донор яйцеклітини і донор соматичних клітин не повинні бути одним індивідом.

На рис. 3.1 наведена схема клонування вівці Доллі. За допомогою мікропіпетки з яйцеклітини видаляють ядро. Епітеліальні клітини молочної залози культивують та індукують їх перехід у фазу G_0 (фазу спокою). Здійснюють злиття клітин, після чого імплантують їх у матку «сурогатної» матері, де й відбувається подальший розвиток ембріона.

На прикладі Доллі вперше була доведена плуріпотентність ядра диференційованої дорослої клітини.

Варто зазначити, що клітинна трансформація має певні недоліки. Тварини, одержані методом клонування з використанням технології перенесення ядер соматичних клітин, мають високий процент викиднів на пізніх термінах вагітності і народження потомства з уродженими дефектами.

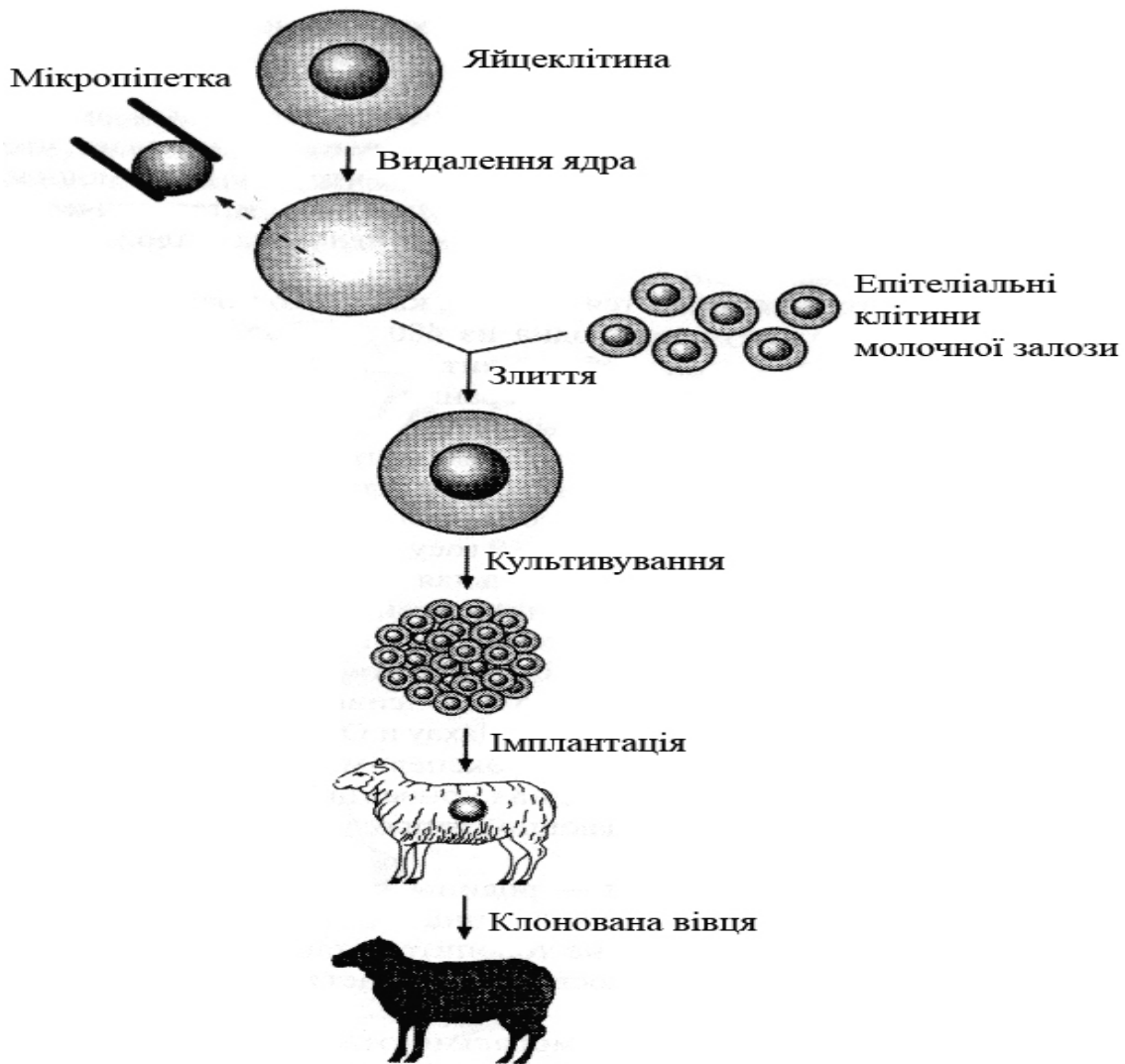


Рис. 3.1. Схема клонування вівці Доллі

Деякі вчені висловлюють сумніви щодо чистоти експерименту з клонування вівці Доллі. Уважають, що докази походження Доллі не на 100% генетично достовірні. Виконавці експерименту не змогли довести, що Доллі і її мати мають однакову генетику, тому неможливо встановити, чи дійсно Доллі є клоном дорослої тварини. Клітини епітелію молочної залози, що використовувалися для створення Доллі, були взяті від вівці, що померла за 3 роки до народження Доллі. Клітини зберігалися в рідкому азоті для інших цілей. В експерименті з клонування вівці було проведено злиття 277 яйцеклітин з клітинами молочної залози, з 29 одержаних ембріонів лише один розвинувся до життєздатного організму. Однак не є винятком, що насправді донорське ядро було взяте з недиференційованої ембріональної клітини, що була присутня в епітелії молочної залози організму-донора. Успішне повторення експерименту могло б розвіяти всі сумніви.

Стовбурові клітини. Історія досліджень

Стовбутова клітина – це недиференційована клітина, що здатна до перетворення у спеціалізовані клітини організму.

У результаті поділу стовбурових клітин відбувається заміщення зруйнованих чи пошкоджених клітин багатоклітинного організму.

Унікальною властивістю стовбурових клітин є плюрипотентність – здатність перетворюватися на будь-який із типів клітин. За різними даними в організмі людини налічується від 200 до 350 типів клітин.

В організмі дорослої людини стовбурові клітини містяться в основному в кістковому мозку і в невеликих кількостях у всіх органах і тканинах. Вони можуть перетворюватися на кісткові, м'язові, нервові клітини, клітини міокарда і печінки. Стовбурові клітини одержують із тканин дорослого організму (кісткового мозку), пуповини, тканин плода.

У багатьох лабораторіях світу ведуться пошуки ідеального джерела стовбурових клітин, з яких можна було б отримувати клітини різних тканин для репарації хворих і пошкоджених органів людини. Стовбурові клітини широко використовуються у трансплантології, імунології і геронтології.

Основні дати історії досліджень стовбурових клітин

1908 р. – російський учений Олександр Максимов сформував концепцію стовбурової клітини для кровотворної тканини.

1953 р. – медичні дослідження довели, що трансплантація кісткового мозку може врятувати тварин, які отримали смертельну дозу радіації.

1963 р. – було встановлено, що кров новонароджених містить фактори, які пригнічують канцерогенез. Дорослій жінці, хворій на рак (саркому), була імплантована пуповинна кров від 17 дітей, при цьому спостерігалось тимчасове покращання стану хворої.

1969 р. – Е.Д. Томас здійснив першу трансплантацію кісткового мозку хворому на лейкемію.

1970 р. – Лерой Стівенс уперше застосував термін «ембріональні стовбурові клітини».

1970 р. – зроблена перша спроба вилікувати лейкемію шляхом трансплантації пуповинної крові, взятої від 8 різних дітей, 16-річний хворий одужав.

70-ті роки – перша аутологічна трансплантація кісткового мозку хворому на лімфому; радянські вчені Олександр Якович Фриденштейн і

Йосиф Львович Чертков заклали основи науки про стовбурові клітини кісткового мозку.

80-ті роки – перша трансплантація стовбурових клітин, отриманих з периферичної крові.

1981 р. – американський учений Мартін Еванс уперше виділив ембріональну стовбурову клітину із зародка миші.

1984 р. – Національний закон про трансплантацію США легалізує використання донорських органів для трансплантації (але не крові і тканин).

1988 р. – Еліан Глюкман у клініці Святого Людвіга в Парижі зробили першу операцію з трансплантації пуповинної крові дитині з анемією Фанконі; до 2003 р. у світі було здійснено понад 1000 таких трансплантацій.

1990 р. – Е.Д. Томас (здійснив трансплантацію кісткового мозку) та Дж. Мюррей (уперше здійснив трансплантацію нирки) отримали Нобелівську премію.

90-ті роки – зроблені спроби щодо отримання ліній ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) людини в кількох лабораторіях США, Великобританії, Канади, Індії, Австралії, Сінгапура, Японії.

1998 р. – американські вчені Джеймс Томсон і Джон Беккер виділили людські ембріональні стовбурові клітини й отримали перші лінії цих клітин. Опубліковані у 1999 р. у журналі «Science» результати експериментів були визнані третім найважливішим відкриттям біології у ХХ ст. (після відкриття структури ДНК і розшифрування генома людини).

1998 р. – пересадка нейральних стовбурових клітин людині після інсульту.

2001 р. – Філіп Менаш здійснив пересадку аутологічних скелетних міобластів хворому з інфарктом міокарда.

2007 р. – одержано стовбурові клітини макаки-резус, а потім і людини, що дозволило здійснювати терапевтичне клонування стовбурових клітин.

На сьогодні у США зосереджена найбільша кількість ліній стовбурових клітин. Із 130 існуючих у світі ліній стовбурових клітин 70 є власністю компаній або університетів США.

Ембріональні стовбурові клітини

Мільярди клітин організму людини походять з однієї клітини – зиготи, що утворюється в результаті злиття чоловічих і жіночих гамет. Ця єдина клітина містить не лише інформацію про організм, а й схему його послідовного розвитку (рис. 3.2).

Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) мають одну єдину функцію – передача генетичного матеріалу наступним поколінням.

Генетики використовують ЕСК для дослідження процесів органогенезу. Використання ЕСК є єдиною експериментальною можливістю вивчення аномалій органогенезу людини. Крім того, ЕСК використовують як сировину для отримання соматичних клітин людини.

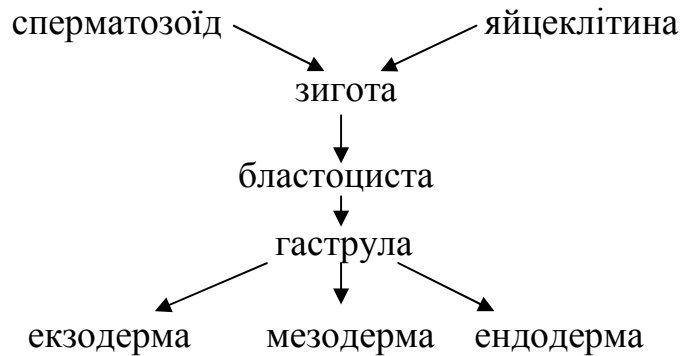


Рис. 3.2. Схема розвитку організму

Основним джерелом сировини для отримання лабораторних соматичних клітин є клони ЕСК, виділені з ембріона людини на стадії бластоцисти. Бластоциста складається із зовнішнього шару клітин і внутрішньої порожнини, заповненої рідиною і стовбуровими клітинами. Стовбурові клітини отримують із внутрішньої маси, руйнуючи бластоцисту. У складі бластоцисти міститься приблизно 150 клітин, з яких лише 30 є стовбуровими. Під час розвитку ембріона стовбурові клітини зникають після 7-го дня вагітності.

Другим джерелом ЕСК є статеві клітини. ЕСК одержують з яйцеклітин, запліднених *in vitro* (штучне запліднення). ЕСК легко культивувати, оскільки вони здатні до необмеженого поділу. Деякі ЕСК людини можуть ділитися 300 – 400 разів, а ЕСК мишей можуть існувати в культурі протягом кількох десятків років.

Актуальним є пошук речовин, що визначають напрям диференціації ЕСК. Американські вчені провели такий експеримент: розмножили культуру ЕСК людини в поживному середовищі, що містило 2 білки, які визначають напрям диференціації цих клітин. Завдяки наявності цих білків – факторів росту – більш ніж 80% стовбурових клітин перетворилися на кардіоміоцити (спеціалізовані клітини серцевого м'яза). Дотепер вихід кардіоміоцитів не перевищував 1%. Отримані кардіоміоцити

трансплантували в серце щурів, у яких 4 дні тому був штучно викликаний інфаркт міокарда. Попередньо до цих клітин додали речовини, що полегшують інтеграцію нової тканини і захищають її від передчасного руйнування. Це привело до 100% приживання трансплантата, покращило роботу міокарда хворих тварин. Під час пересадження післяінфарктним щурам тільки кардіоміоцитів без захисних добавок ступінь приживання не перевищував 18%. Дослідники планують замінювати кардіоміоцитами ділянки міокарда, омертвілі після інфаркту.

Проведено дослідження з одержання з ЕСК клітин острівців Лангерганса, що секретують інсулін. Ці клітини, трансплантовані в підшлункову залозу імунодефіцитних мишей, захищали тварин від різкого зростання вмісту глюкози у крові. Вчені покладають великі надії на технологію одержання клітин підшлункової залози з ЕСК, які в культурі утворюють 250 поколінь за рік (нове покоління за 1,5 дня). Ці дослідження відкривають нові перспективи у лікуванні цукрового діабету.

Дослідження, проведені на мишах, підтвердили, що введення ЕСК послаблює прояви симптомів таких захворювань, як цукровий діабет, хвороба Паркінсона, серцево-судинні захворювання, пошкодження спинного мозку. Але існують дані про те, що ЕСК можуть бути джерелом деяких типів раку *in vivo*.

Стромальні та гематопоетичні стовбурові клітини

Уперше стовбурові клітини виявили у кістковому мозку. Кістковий мозок є органом кровотворення. У кістковому мозку є два види стовбурових клітин: гематопоетичні і стромальні. З гематопоетичних клітин утворюються клітини крові (моноцити, лімфоцити, нейтрофіли, базофіли, еритроцити).

Кількість стромальних стовбурових клітин у кістковому мозку значно нижча, ніж гематопоетичних. Стромальні клітини кісткового мозку становлять не більш ніж 0,01% від усіх клітин кісткового мозку.

З віком кількість стромальних стовбурових клітин суттєво знижується: у новонароджених 1 стромальна клітина припадає на 10 тисяч гематопоетичних, у підлітків – на 100 тисяч, у людей віком 50 років – на 500 тисяч, а у людей старше 70 років – на 1 млн.

Стромальні стовбурові клітини довго існують, але досить рідко оновлюються. Вони, як і гематопоетичні, постійно циркулюють у

кровообігу людини. Стромальні клітини кісткового мозку разом зі спеціалізованими тканинними клітинами беруть участь у регенерації пошкоджених органів. О.Я. Фриденштейн установив, що стромальні клітини кісткового мозку *in vitro* під дією певних індукційних факторів можуть перетворюватися на хрящові (хондроцити), жирові (адипоцити) і кісткові (остеобласти) клітини. Пізніше була доведена можливість перетворення стромальних клітин на нервові клітини, гепатоцити, а також клітини, що синтезують інсулін.

Проведено численні експерименти із застосування стромальних клітин кісткового мозку для відновлення пошкоджених тканин й органів у тварин.

Італійські вчені показали, що введені стромальні клітини здатні відновити пошкоджену м'язову тканину. В експериментальних тварин (мишей) під дією опромінення пошкодили кістковий мозок і трансплантували їм спеціально мічені стромальні клітини. Через кілька днів тваринам увели препарат, що спричинив руйнування м'язів передніх лап. Через 2 тижні після ін'єкції стромальних клітин м'язова тканина передніх лап у мишей частково відновилаься. Установлено, що основна частина нових м'язових клітин утворилася з уведених стромальних.

Японські вчені отримали із стромальних клітин кісткового мозку мишей клітини міокарда. Уведення стромальних клітин у ділянку пошкодження серцевого м'яза (у ділянку інфаркту) практично повністю ліквідує явище післяінфарктної серцевої недостатності в експериментальних тварин. За даними Американського кардіологічного товариства у щурів зі штучно викликаним інфарктом міокарда 90% стромальних клітин, уведених у ділянку серця, перетворюються на клітини міокарда. Така клітинна терапія для відновлення пошкоджень серцевого м'яза після інфаркту досить перспективна, оскільки використовуються власні стовбурові стромальні клітини організму і немає реакції відторгнення, виключена можливість їх злоякісного переродження.

Під впливом певних факторів стромальні клітини можуть перетворюватися на нервові. Установлено, що через 2 тижні після додавання спеціальної сигнальної речовини в культуру стромальних клітин вони на 80% складаються з нейронів. Американські вчені провели надзвичайно важливий експеримент. Вони використали стромальні клітини для лікування інсульту. Інсульт – це досить поширене захворювання і на сьогодні невиліковне. В експериментальних мишей

штучно викликали інсульт, після чого їм вводили власні стромальні клітини у спинномозковий канал. У 100% випадків спостерігалось часткове відновлення рухової активності кінцівок тварин. Проведені експерименти відкривають нові перспективи для лікування хворих з важкими ураженнями спинного і головного мозку.

Установлено, що за дії певних білкових факторів стромальні клітини перетворюються на остеобласти. Експериментально доведено, що під час пошкодження печінки нові гепатоцити формуються з донорських стромальних клітин кісткового мозку.

Незважаючи на досягнуті успіхи у лікуванні таких захворювань, як інфаркт міокарда, інсульт, неврологічні хвороби, говорити про клінічне застосування стовбурових клітин передчасно, поки що це лабораторна практика.

Джерелом одержання стромальних стовбурових клітин є пуповинна кров та плацента. У 1988 р. Броксмейер показав, що можна отримати пуповинну кров у кількості, достатній для трансплантації гематопоетичних стовбурових клітин. Об'єм пуповинної крові може становити до 200 мл. У 1992 р. Девід Харіс уперше зберіг пуповинну кров шляхом кріоконсервації для свого сина Олександра. Кріообробка пуповинної крові не спричиняє втрати гематопоетичних стовбурових клітин. Створення банків гематопоетичних клітин пуповинної крові є новим напрямом медицини.

Стовбурові клітини, виділені з пуповинної крові, походять із мезодерми. Вони є менш імунореактивними порівняно зі спеціалізованими клітинами дорослого організму. Під час трансплантації пуповинної крові несумісність за людськими лейкоцитарними антигенами (реакція трансплантат проти хазяїна) зустрічається значно рідше, ніж під час трансплантації кісткового мозку.

Уперше трансплантація гематопоетичних клітин пуповинної крові була здійснена у 1988 р. Установлено, що родинні трансплантації успішніші (63% – позитивний результат), ніж неродинні (29% – позитивний результат). Пересадка власних гематопоетичних клітин пуповинної крові хворому реципієнту повинна давати 100% позитивний результат. Також доведено, що у дитячому та юнацькому віці трансплантації пуповинної крові успішніші, ніж у похилому.

Американський учений Сяолонг Менг установив, що джерелом стовбурових клітин у дорослому організмі людини може бути менструальна

кров. Такі стовбурові клітини є клітинами ендометрія матки, їх поділ відбувається швидше, ніж мезенхімальних клітин, виділених з пуповинної крові. Підраховано, що популяція стовбурових клітин, виділених з менструальної крові, подвоюється кожні 19,4 год. Експериментально доведено, що такі стовбурові клітини можуть диференціюватися в різні типи клітин, у тому числі клітини жирової, м'язової, кісткової і нервової тканин.

Життєздатність стовбурових клітин зменшується зі збільшенням віку організму-донора. Стовбурові клітини, одержані з дорослого організму людини, використовуються для лікування багатьох захворювань. Найчастіше трансплантацію стовбурових клітин здійснюють у таких випадках: 60% – злоякісні захворювання крові, 6% – нейробластома, 34% – незлоякісні захворювання (анемія, уроджений імунодефіцит).

Незважаючи на переваги використання стовбурових клітин порівняно з традиційними методами лікування багатьох захворювань, у більшості країн дослідження стовбурових клітин обмежені. До причин, що обмежують дослідження і використання стовбурових клітин, можна віднести такі.

По-перше, вимоги католицької церкви заборонити дослідження ЕСК. Основним джерелом ЕСК є абортівний матеріал, а також матеріал, що залишається після штучного запліднення.

По-друге, проблема створення умов й індукторів, що спрямують ЕСК на певний шлях диференціації.

По-третє, проблема імунологічної сумісності тканин й органів трансплантата і реципієнта. Існують такі шляхи її розв'язання:

- вбудувати гени майбутнього реципієнта в культуру ЕСК (на етапі вирощування органа);
- пригнічувати імунну систему реципієнта за допомогою імуносупресорів (але при цьому існує ризик інфекційних ускладнень та утворення пухлин);
- пересадка трансплантата, що не буде контактувати з імунною системою реципієнта. Наприклад, нейротрансплантація успішно застосовується при лікуванні хвороби Паркінсона (перешкодою для імунної системи є гематоенцефалічний бар'єр).

По-четверте, негативною властивістю ЕСК є активація росту пухлин у мишей з дефектною імунною системою. Таким чином, введення ЕСК пацієнту може спровокувати появу злоякісної пухлини.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні компоненти поживного середовища для культивування клітин.
2. Поясніть терміни: клітинні лінії, первинні культури, диплоїдні культури.
3. Назвіть основні напрями клітинної інженерії рослин.
4. Яка роль мутагенів у клітинній селекції?
5. Поясніть термін «самоклональна варіабельність».
6. Які переваги має клітинна селекція порівняно із селекцією рослин?
7. Яким чином одержують культури гаплоїдних клітин? Яка їх роль у селекції?
8. Що таке протопласти? Поясніть роль протопластів у створенні гібридів клітин.
9. Опишіть етапи мікроклонального розмноження рослин. Які переваги має цей метод порівняно з традиційними способами розмноження рослин?
10. Яке теоретичне і практичне значення має створення штучних асоціацій культури клітин рослин з мікроорганізмами?
11. Опишіть основні етапи клонування тварин. Які недоліки цього методу?
12. Поясніть технологію одержання моноклональних антитіл. Яке їх практичне значення?
13. Що таке стовбурові клітини? Якими властивостями вони володіють?
14. Поясніть терміни: ембріональні, стромальні, гематопоетичні стовбурові клітини. Які з цих клітин містяться у найбільшій кількості в організмі людини?
15. Проаналізуйте переваги і недоліки застосування стовбурових клітин у медицині.

РОЗДІЛ 4. МЕДИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Біотехнологія розвиває кожну сферу медицини від діагностики до лікування будь-якого захворювання. Сучасні досягнення біотехнологічної науки використовуються для розробки нових методів діагностики та створення лікарських препаратів. На сьогодні клоновано понад 400 генів різних білків людини, які можуть бути лікарськими препаратами. За даними спеціалістів, щорічний обсяг світового ринку лікарських препаратів на основі білків людини становить 150 млрд доларів і постійно зростає.

За обсягом виробництва біотехнологічних лікарських препаратів I місце у світі посідає США (63%), II – країни Західної Європи (25%), III – Японія (7%). Перелік провідних біотехнологічних компаній Європи наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Провідні біотехнологічні компанії Європи

Назва компанії	Країна	Сфера досліджень
Celltech	Великобританія	Препарати для лікування онкологічних захворювань і запальних процесів
Neurosearch	Данія	Препарати для лікування захворювань центральної нервової системи
Active Biotech	Швеція	Препарати для лікування інфекційних захворювань
Genset	Франція	Геноміка
Innogenetics	Бельгія	Терапевтичні і діагностичні препарати
Qiagen	Німеччина	Терапевтичні препарати

Ураховуючи сучасний рівень досягнень генної інженерії, можна виділити такі **напрями медичної біотехнології**:

- створення нових лікарських препаратів на основі технології рекомбінантної ДНК;
- імунобіотехнологія;
- генна діагностика;
- генна терапія.

Одержання рекомбінантних білків людини

Для створення і впровадження у практику нового лікарського препарату необхідно багато часу (10 – 12 років) і коштів (600 млн доларів). Відомо, що абсолютно безпечних ліків не існує. У США за 1 рік 100 000 людей помирає від наслідків ускладнень дії ліків. ВООЗ створила

базу даних побічних реакцій на ліки. У країнах Західної Європи, США, Японії, Китаї створено центри безпеки ліків.

Генно-інженерні методи дозволяють одержувати унікальні лікарські засоби, менш токсичні, ніж традиційні. Вчені приділяють особливу увагу розробці ефективних препаратів для лікування захворювань людей похилого віку: хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, рак, хронічна ниркова недостатність, діабет, остеопороз, серцево-судинні захворювання (інсульт, інфаркти). Більшість біотехнологічних лікарських препаратів – це білки, синтезовані на основі рекомбінантної ДНК.

Основними продуцентами рекомбінантних білків є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Приклади препаратів, одержаних з використанням технології рекомбінантної ДНК, подано у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Препарати, що одержують на основі технології рекомбінантної ДНК

Назва препарату	Дія або застосування препарату
Адренкортикотропний гормон	Лікування ревматизму
Активатори плазміногена	Розчинення тромбів
α_1 -Антитрипсин	Лікування емфіземи легень
Білки морфогенезу кісткової тканини	Стимулюють регенерацію кісток
Вакцина проти гепатиту В	Антигени, що індукують імунну відповідь при гепатиті В
Гемоглобін	Лікування анемії
Глюкоцереб्रोзидаза	Лікування хвороби Гоше
Гормон росту людини	Стимулює ріст кісток
Гранулоцитарний (G-CSF) і гранулоцитарно-моноцитарний (GM-CSF) колонієстимулюючі фактори	Трансплантація кісткового мозку
ДНКаза	Пригнічує секрецію слизу, застосовують під час лікування кістозного фіброзу
Ендорфіни, енкефаліни	Знеболювальна дія
Еритропоетин	Стимулює утворення еритроцитів
Епідермальний фактор росту (EFG)	Стимулює регенерацію пошкодженої шкіри
Інсулін	Лікування цукрового діабету
Інсуліноподібний фактор росту (IGF-1)	Стимулює ріст, лікування цукрового діабету і ниркової недостатності
Інтерлейкін-2	Стимулює імунну систему
Інтерлейкін-10	Профілактика тромбоцитопенії
Інтерферони (α , β , γ)	Лікування вірусних захворювань
Кальцитонін	Стимулює затримку кальцію в кістках
Колонієстимулюючий фактор	Сприяє росту В-лімфоцитів
Лімфотоксин	Лікування злоякісних захворювань
Моноклональні антитіла	Застосування в діагностиці, лікуванні раку,

	автоімунних захворювань
Проурокиназа	Антикоагулянт
Релаксин	Забезпечує релаксацію м'язів під час пологів
Рецептор інтерлейкіна-1	Лікування ревматоїдного артриту, астми
Соматоліберин, соматомедин С	Затримка росту
Супероксиддисмутаза	Антиоксидант
Тиреотропний гормон	Лікування раку щитовидної залози
Фактори згортання крові VII, VIII, IX	Стимулюють згортання крові, застосовуються під час лікування гемофілії
Фактор некрозу пухлин (TNF)	Лікування злоякісних захворювань
Фактор росту В-лімфоцитів, фактор активації макрофагів	Лікування імунних захворювань
Фактор росту нервів	Регенерація пошкодженої нервової тканини
Фактор росту тромбоцитів	Лікування атеросклерозу
Хоріонічний гонадотропін	Лікування жіночої безплідності

Особливу групу рекомбінантних білків становлять ферменти. Ферменти, що використовуються в клінічній діагностиці або у складі лікарських препаратів, повинні бути високоочищеними. Імобілізовані протеолітичні ферменти (хімотрипсин, трипсин, колагеназа) успішно застосовуються під час лікування гнійних захворювань легень і плеври, трофічних виразок, променевих виразок шкіри. Для лікування серцево-судинних захворювань використовують ферменти стрептокіназу та урокіназу.

Новим напрямом медицини є розробка ефективних способів доставки ферментних препаратів до тканин-мішеней. Як носії іммобілізованих ферментів використовують мікрокапсули. За такого способу введення фермент не контактує з рідинами і тканинами організму, не руйнується протеазами, не спричиняє імунної відповіді організму. Перевагою мікрокапсул є можливість їх імплантації в необхідне місце, наприклад біля пухлини (при цьому мікрокапсула переробляє метаболіти, необхідні для росту пухлинної тканини і зупиняє її ріст).

Мікрокапсули використовуються в апараті «штучна нирка». Для мікрокапсульної штучної нирки необхідна колонка для діалізу об'ємом 30 мл, яка працює у 100 разів швидше за звичайний апарат.

Інтенсивно досліджуються властивості мікрокапсул, стінка яких складається з оболонки еритроцитів. Вміст еритроцитів видаляється, а «тінь» заповнюється ферментом. Такі мікрокапсули повністю сумісні з

організмом пацієнта. Досягнуті успіхи в лікуванні аспарагін-залежних пухлин препаратами аспарагінази в оболонках еритроцитів.

Крім мікрокапсул для введення лікарських препаратів на основі ферментів використовують міцели або ліпосоми. Клітини поглинають ліпосоми шляхом фагоцитозу, при цьому ферменти надходять усередину клітин.

На початку 90-х років ХХ ст. створено лікарські препарати на основі життєздатних клітин мікроорганізмів. До 1992 р. досліджено понад 50 штамів, вивчений ефект їх біологічно активних речовин. В організм людини вводять сапрофітні мікроорганізми, що можуть жити в умовах симбіозу з нормальною мікрофлорою кишечника. Біологічно активні речовини, що синтезуються бактеріями, регулюють біохімічні процеси в організмі. Для лікування бактеріальних інфекцій кишечника, дихальних шляхів, алергій застосовують штами *Bacillus subtilis* (препарат «Бактисубтил» – для лікування діареї). Штами *E.coli* лікують кишкові захворювання.

Імунобіотехнологія. Технологія одержання моноклональних антитіл

У 1975 р. журнал «Nature» опублікував статтю Г. Келера, присвячену новому способу отримання імунних білків (моноклональних антитіл) на основі гібридних клітин – гібридом. Гібридами одержували шляхом злиття лімфоцита з клітиною пухлини кісткового мозку (міеломи). Гібридами мають властивості обох клітин: здатність до необмеженого поділу і синтез антитіл. Антитіла, синтез яких здійснюють клоновані гібридами, дістали назву моноклональних. Вони є однаковими за структурою і специфічністю імуноглобуліни.

У 1984 р. Келер, Мільштейн та Ерне за розробку технології одержання моноклональних антитіл отримали Нобелівську премію з медицини.

Виробництво моноклональних антитіл посідає одне з провідних місць у біотехнології. Раніше єдиним джерелом отримання антитіл була сироватка крові імунних тварин. Антитіла сироватки не є одним препаратом, оскільки у крові завжди в певних кількостях присутні інші антитіла.

Моноклональні антитіла володіють високою специфічністю, вони розпізнають не лише окремі молекули білків, але й заміни амінокислот в їх

складі. За допомогою моноклональних антитіл встановлено, що заміна лише однієї амінокислоти може призвести до появи онкогенного білка.

Моноклональні антитіла застосовуються для отримання препаратів біологічно активних речовин високої чистоти. Моноклональні антитіла – це інструмент імуноферментного аналізу і радіоімунологічного аналізу антигенів будь-якого походження. Біосенсори, створені на основі моноклональних антитіл, успішно застосовуються для моніторингу навколишнього середовища, біотехнологічних процесів, а також внутрішнього середовища організму людини і тварин.

Моноклональні антитіла використовують для виявлення різних сполук і діагностики інфекційних захворювань:

- *гормони* (хоріонічний гонадотропін, гормон росту, лютеїнізуючий гормон, фолікулостимулюючий гормон, тиреотропний гормон, пролактин, тироксин);
- *маркери пухлин* (канцероембріональний антиген, рецептор інтерлейкіна-2, рецептор фактору росту епідермісу);
- *цитокини* (інтерлейкіни 1-8, колонієстимулюючий фактор);
- *лікарські препарати* (теофілін, гентаміцин, циклоспорин);
- *інфекційні захворювання* (хламідіоз, герпес, краснуха, гепатит В, СНІД).

Можливі способи застосування моноклональних антитіл у медицині наведено в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Застосування моноклональних антитіл у медицині

Галузь медицини	Застосування
Аналіз	Структурні зонди для ідентифікації специфічних послідовностей на поверхні клітин
Діагностика	Набори реактивів для діагностики вагітності. Виявлення естрогенних рецепторів для діагностики деяких форм раку молочної залози
Імунодіагностика	Точне визначення кількості специфічних антигенів
Терапія	Направлений транспорт токсинів у ракові клітини, інактивація отрут, пасивна імунізація, лікування аутоімунних захворювань

Моноклональні антитіла синтезують гібридами – гібридні клітини, що утворені шляхом злиття лімфоцитів людини з клітинами мієломи мишей. Підраховано, що із 50 – 100 мишей можна отримати 1 г моноклональних антитіл. У процесі використання моноклональних антитіл як лікарських препаратів виникають побічні ефекти, пов'язані з

ініціацією запального процесу. Це обумовлює необхідність створення моноклональних антитіл людини.

Під час одержання моноклональних антитіл людини шляхом традиційної гібридомної технології виникають певні труднощі:

- хромосоми людини нестабільні в гібридних клітинах, одержаних злиттям лімфоцитів людини з клітинами мієломи миші;
- не вдалося одержати ефективні клітинні лінії мієломи людини, що змогли б замінити клітини мієломи мишей;
- імунізація людини різними антигенами не здійснюється згідно з етичними нормами.

Таким чином, для одержання моноклональних антитіл людини необхідно використати інші підходи. Так, імунні стовбурові клітини людини вводять мишам з важким імунодефіцитом (Scid-миші). У відповідь на введення антигена в організмі мишей виробляються антитіла людини.

Зроблені спроби ввести ембріонам мишей гени імуноглобулінів людини з метою створення трансгенних мишей, які у відповідь на імунізацію можуть виробляти антитіла людини. Обидва ці методи достатньо трудомісткі, тому вчені намагаються розробити генно-інженерні методи одержання антитіл людини.

ДНК-вакцини

Ефективним способом профілактики інфекційних захворювань є вакцинація. У розвинених країнах смертність від інфекційних захворювань становить 4 – 8%, а у країнах, що розвиваються, – 30 – 50%. Завдяки вакцинації значно знижується частота захворювань. Наприклад, у 1995 р. у США і Канаді частота захворювань на поліомієліт становила 200 хворих на 1 млн населення, а у 2000 р. – 1 хворий на 20 млн населення (частота захворювання знизилася у 4000 разів). Проте дотепер не розроблено вакцини проти СНІДу, туберкульозу, малярії.

Існують різні види вакцин, що містять живі, інактивовані, рекомбінантні мікроорганізми або окремі компоненти їх клітин. Для формування імунітету в організмі людини повинен бути присутній антиген, роль якого найчастіше виконують білки оболонки вірусів. За допомогою технології рекомбінантних ДНК можна одержувати антигени з використанням непатогенних мікроорганізмів.

У 1990 р. учені розпочали розробку нових вакцин, що містять молекули ДНК. У 1994 р. з'явився термін «вакцини із нуклеїнових

кислот». Принцип застосування ДНК-вакцин полягає у тому, що в організм пацієнта вводять молекулу ДНК, яка містить гени, що кодують антигени патогенного мікроорганізму. ДНК-вакцини називають також генними, генетичними, полінуклеотидними, вакцинами із нуклеїнових кислот.

Для одержання ДНК-вакцини ген, що кодує імуногенний білок, вбудовують у бактеріальні плазміди, які вводять у культуру бактеріальних клітин для одержання великої кількості копій (здійснюють клонування гена). Плазмідну ДНК виділяють із бактерій, очищують. Очищена ДНК і є вакциною. Введення ДНК-вакцини забезпечує синтез антигенів клітинами організму і формування імунітету.

Порівняно з традиційними вакцинами ДНК-вакцини мають такі переваги:

- ефективність і безпечність імунізації. ДНК-вакцини забезпечують формування як гуморального, так і клітинного імунітету (стимулюють синтез цитотоксичних Т-лімфоцитів). Традиційні вакцини активують лише гуморальний імунітет. Немає ризику інфікування;
- можливість створення комбінованих вакцин і спрощення технології їх виробництва;
- значно нижча вартість зберігання і транспортування ДНК-вакцин. ДНК-вакцини можуть витримувати низькі і високі температури, різні умови вологості.

Проте, незважаючи на істотні переваги ДНК-вакцин, варто зазначити причини обмеження їх застосування.

По-перше, ДНК-вакцини забезпечують формування імунітету тільки проти білкових антигенів. Вони не можуть замінити вакцини, дія яких ґрунтується на використанні інших антигенних молекул, наприклад полісахаридів (полісахаридні пневмококові, менінгококові вакцини).

По-друге, молекули білків після синтезу можуть підлягати модифікаціям, наприклад глікозилуванню. Ці процеси в організмах людини, тварин і мікроорганізмів відбуваються по-різному. Тому структура антигенного білка, синтезованого в організмі людини, може відрізнятись від структури білка, що синтезується мікроорганізмами.

По-третє, під час уведення ДНК-вакцин імуногенний білок може тривалий час синтезуватися в організмі.

Більшість ДНК-вакцин проходить стадію клінічних досліджень, тому вони не скоро будуть запроваджені в медичну практику.

Фітоселекційні вакцини

У 1995 р. створено перші фітоселекційні вакцини (Р. Леві).

Боб Ервін розробив фітоселекційну вакцину проти різновиду раку – лімфоми. Для створення вакцини використовували рослини тютюну, оскільки він найбільш придатний для синтезу білків людини. Як відомо, клітини лімфоми на поверхні містять численні маркери, що відрізняють їх від здорових клітин. Ген, що кодує білки лімфоми, за допомогою вірусного вектора вбудовують у рослини тютюну. Фрагменти поверхні ракових клітин відтворюються клітинами тютюну, а потім вводяться пацієнту. Клітини-кіллери, що розпізнають ці фрагменти, починають атакувати самі ракові клітини, суттєво зупиняючи або уповільнюючи розвиток пухлини.

Фрагменти злоякісних новоутворень використовують для виготовлення вакцини персонально для кожного хворого. «Персональні» вакцини можна отримати за 6 тижнів, тоді як нова вакцина проти раку створюється протягом 10 років. Вартість такого терапевтичного білка значно нижча порівняно з використанням більш традиційних систем культури клітин ссавців. Поряд з низькою вартістю і високою ефективністю продукції білка необхідно відзначити ще й цілковиту екологічну безпеку.

У дослідженнях фітоселекційних вакцин брали участь сотні американців. Результати досліджень засвідчили, що такі вакцини продовжують життя навіть тяжко хворим людям.

Генна діагностика

Відомо, що геном людини містить 3,5 млрд нуклеотидів і більш ніж 30 тис. генів. У геномі людини нуклеотидні послідовності, що кодують білки, становлять лише 1,1 – 1,4% від загальної довжини ДНК. Мутації у структурних генах призводять до серйозних порушень на рівні клітин, тканин або органів. Найчастіше в результаті мутацій змінюється активність певного ферменту, що спричиняє накопичення токсичного субстрату або дефіцит сполуки, необхідної для нормального функціонування клітини.

На сьогодні відомо близько 5000 тисяч спадкових порушень обміну речовин і лише для 500 з них виявлені молекулярні причини. Розроблено тести, що визначають генетичну схильність до спадкових захворювань, а також методи їх молекулярної діагностики. На сьогодні в Японії новонароджені проходять тест на 11 генетичних захворювань, у США – на 7, в Україні – на 2 (фенілкетонурію і гіпотиреоз).

Сучасні методи молекулярної діагностики спадкових захворювань повинні відповідати таким вимогам:

- ефективність, продуктивність, низька вартість;
- висока специфічність (позитивна реакція тільки на молекулу-мішень);
- висока чутливість (виявлення дуже малих кількостей молекул-мішеней).

В основі молекулярної діагностики спадкових захворювань лежать імунологічні підходи або методи виявлення специфічної послідовності ДНК.

Для виявлення мутацій у генах застосовують гібридизацію нуклеїнових кислот, тобто сполучення двох комплементарних фрагментів різних молекул ДНК. З метою ідентифікації специфічної послідовності ДНК використовують зонди. Зонди можуть бути:

- молекулами ДНК або РНК;
- довгими (більш ніж 100 нуклеотидів) і короткими (менш ніж 50);
- продуктами хімічного синтезу або клонованими генами.

Одержано й охарактеризовано понад 100 різних ДНК-зондів, що дозволяють виявити патогенні штами різних бактерій, вірусів і найпростіших. Розроблено зонди для діагностики бактеріальних інфекцій людини, спричинених *Legionella pneumophila* (респіраторні захворювання), *Salmonella typhi* (харчові отруєння), *Campylobacter hyointestinalis* (гастрити).

Використання методів молекулярної діагностики дозволяє виявити мінімальні концентрації ДНК патогенних мікроорганізмів у крові хворих. Так, застосування ДНК-зонда дозволяє виявити в крові хворого 1 нг ДНК збудника малярії *Plasmodium falciparum*. Таким чином, за допомогою ДНК-зондів можна виявити будь-які патогенні мікроорганізми.

Крім зондів і ДНК-мішені, важливим компонентом системи ДНК-діагностики є метод детекції гібридних молекул. У 1983 р. Коннер розробив метод діагностики серповидноклітинної анемії, заснований на використанні гібридизації нуклеїнових кислот. Молекулярною причиною серповидноклітинної анемії є заміна валіну на глутамінову кислоту у 6-му положенні β -ланцюга глобіна. Для діагностики захворювання використовують 2 олігонуклеотиди довжиною 19 п.н.: один комплементарний нормальному алелю β -глобінового гена (β^A), а другий – мутантному (β^S). ДНК здорової людини ($\beta^A\beta^A$) гібридується лише із β^A -зондом, ДНК хворого на серповидноклітинну анемію ($\beta^S\beta^S$) – тільки із

β^S -зондом, а ДНК людини гетерозиготної за даним геном ($\beta^A\beta^S$) – з обома зондами. Ця модельна система вперше продемонструвала можливість визначення генотипів за допомогою гібридизації ДНК.

У судовій медицині для ідентифікації біологічних зразків застосовують метод геномної дактилоскопії. Як зонди використовують мінісателітні ДНК людини, які не кодують білків і характеризуються великою варіабельністю. ДНК-відбиток кожної людини індивідуальний, він є набором різних за довжиною фрагментів, що відповідають мінісателітним послідовностям генома.

Застосування методів ДНК-діагностики дозволяє виявити спадкові захворювання на стадії ембріона. З'явилося повідомлення про використання генної діагностики з метою народження повноцінної дитини в сім'ї, члени якої страждають хворобою Альцгеймера. У штучних умовах запліднили яйцеклітину матері сперматозоїдами батька. Здійснили аналіз 15 зигот на наявність мутації в гені, що відповідає за хворобу Альцгеймера. У більшості випадків була виявлена смертельна комбінація генів, лише в одній зиготі все було в нормі. «Повноцінну» зиготу ввели в організм прийомної матері, народилася здорова дитина.

Одним із застосувань генної діагностики є виявлення генетичної схильності людини до різних видів діяльності, зокрема спорту. Основним генетичним маркером є ген ангіотензин-конвертуючого ферменту, який бере участь у регуляції артеріального тиску. Під дією ферменту відбувається синтез ангіотензину, що звужує судини і виконує функцію фактора росту, посилює процеси синтезу структурних білків у клітинах міокарда і спричиняє гіпертрофію серцевого м'яза. Фізична активність людини залежить від наявності в її геномі певного варіанта гена. Для цього гена характерний поліморфізм (наявність або відсутність фрагмента довжиною 287 п. н. у 16-му інтроні).

У майбутньому генна діагностика дозволить визначити весь спектр генів схильності до захворювань у кожної людини, створити «генетичний паспорт» людини.

Генна терапія

Із загальної кількості відомих захворювань людини 40% становлять генетичні хвороби. Спадковими є понад 5000 захворювань людини. Більшість із них зустрічається рідко (10^{-5}), деякі відносно часто (10^{-4}).

Деякі спадкові захворювання обумовлені мутаціями в одному гені. Для лікування моногенних захворювань застосовують генну терапію – уведення нормальних генів пацієнтам для корекції дефектних генів. Усі дослідження з генної терапії спрямовані на корекцію генетичних дефектів соматичних, а не статевих клітин. Експерименти в галузі генної терапії клітин зародкової лінії людини заборонені.

Генна терапія орієнтована насамперед на отримання генів і векторів, що забезпечують перенесення цих генів у клітини організму.

Для лікування спадкових захворювань на молекулярному рівні використовують 2 основних підходи: генна терапія *ex vivo* і генна терапія *in vivo*. Генна терапія *ex vivo* ґрунтується на трансплантації генетично модифікованих клітин, що продукують терапевтичний білок.

Генна терапія *ex vivo* складається з таких етапів (рис. 4.1):

- 1) одержання клітин хворого;
- 2) корекція генетичного дефекту за допомогою введення потрібного гена в ізольовані клітини;
- 3) відбір і культивування генетично «виправлених» клітин;
- 4) інфузія або трансплантація цих клітин пацієнту.

Використання власних клітин пацієнта (аутологічних клітин) гарантує, що після інфузії чи трансплантації не буде розвиватися імунна відповідь. Використання аутологічних клітин попереджає їх відторгнення, але обмежує сферу застосування генної терапії *ex vivo*. Так, число клітин тканини-мішені може бути недостатнім для їх виділення і культивування *in vitro*, деякі соматичні клітини неефективно поглинають ДНК, а експресія клонованого гена виявляється короткочасною. Тому розроблено системи, що захищають неаутологічні клітини від імунної відповіді. Альтернативний спосіб генної терапії *ex vivo* використовує генно-інженерну модифікацію неаутологічних клітин, оточених мембраною, що запобігає реакції відторгнення і не перешкоджає вивільненню «терапевтичного» генного продукту.

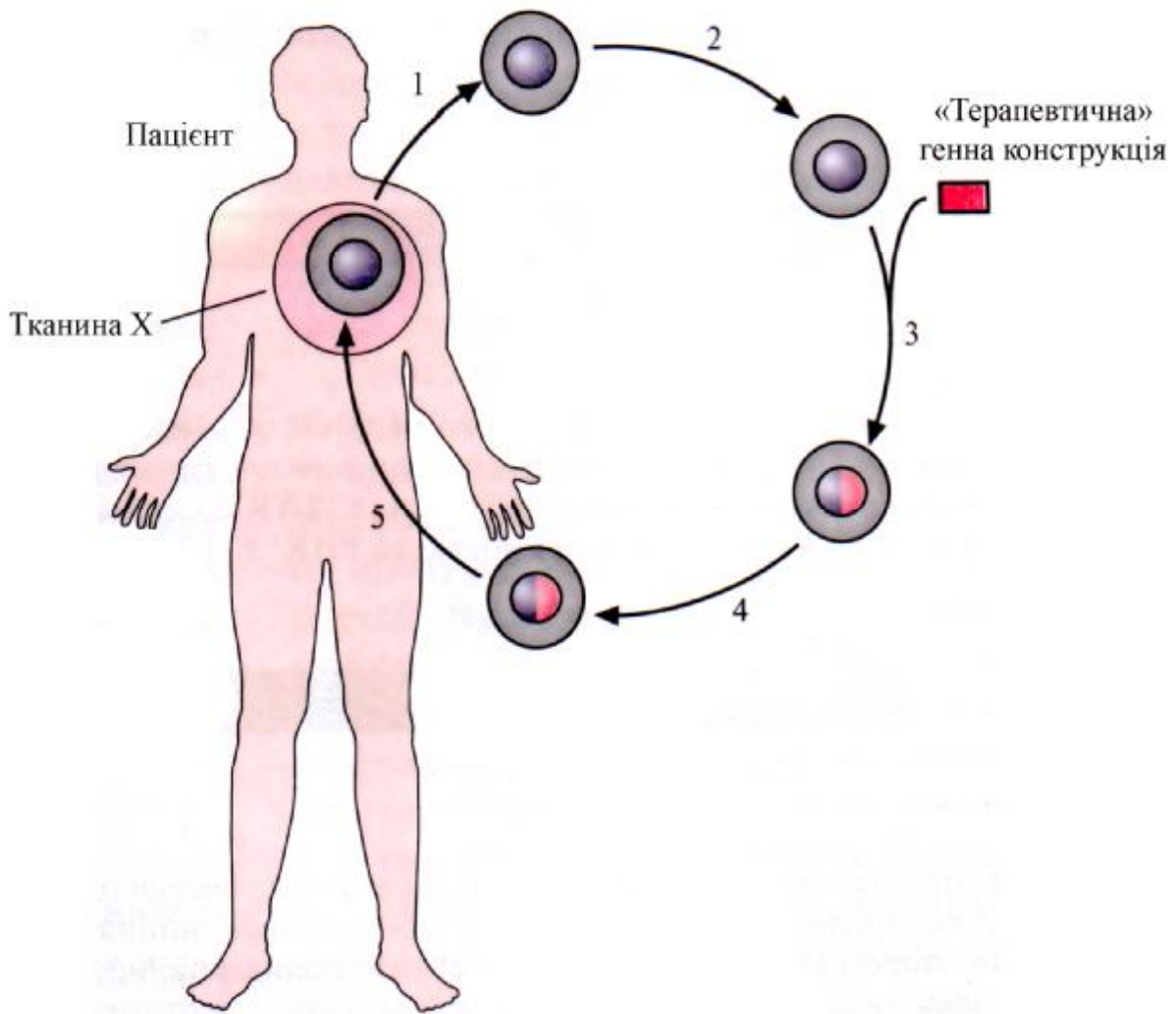


Рис. 4.1. Схема генної терапії ex vivo

Під час генної терапії in vivo «терапевтичний» ген уводять безпосередньо у клітини тканини-мішені хворого (рис. 4.2).

Розроблено різні системи доставки генів: вірусні (ретровірусні, аденовірусні, вектори на основі вірусу простого герпесу) і невірусні (ін'єкція ДНК, бомбардування тканини-мішені частинками, кон'югованими з ДНК, уведення ДНК у складі ліпосом). Оптимальна векторна система повинна забезпечувати високу ефективність поглинання «терапевтичного» гена клітинами-мішенями, мінімальність його внутрішньоклітинного руйнування під час транспорту в ядро і підтримку достатнього рівня експресії. Уважають, що оптимальним терапевтичним вектором є штучна хромосома людини.

Вивчається терапевтичний ефект різних олігонуклеотидів: модифікованих за допомогою генної інженерії рибозимів, що розщеплюють специфічні мРНК; аптамерів, що зв'язуються зі специфічними білками і блокують їх функції; олігонуклеотидів, за допомогою яких можна здійснювати корекцію заміни однієї нуклеотидної пари і мутації.

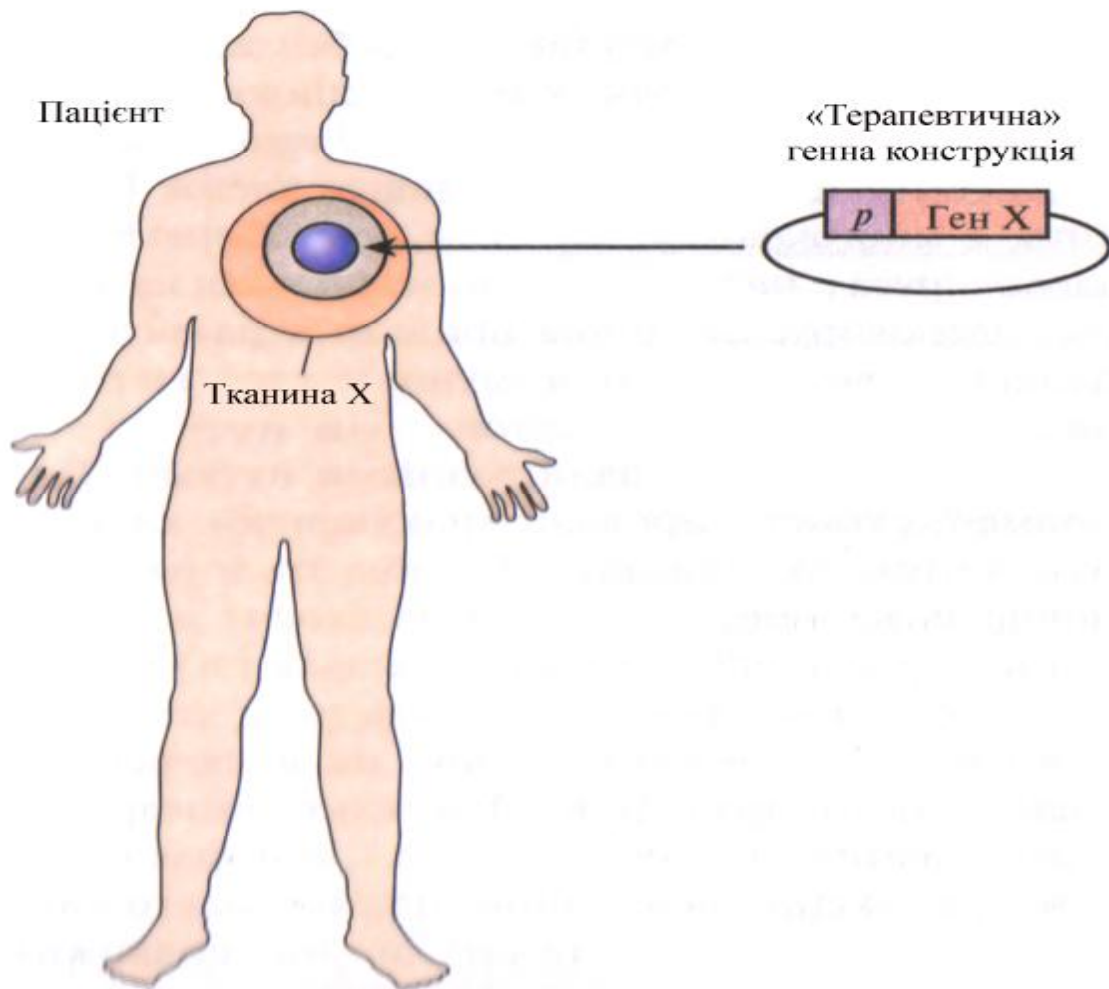


Рис. 4.2. Схема генної терапії in vivo

Уперше генна терапія була застосована у 1990 р. для лікування спадкового імунодефіциту. Група вчених США під керівництвом В. Андерсона розпочала лікування 4-річної дівчинки Ашанти Де Сільви з важкою формою імунодефіциту. Молекулярною причиною захворювання є пошкодження гена білка аденозиндезамінази (АДА). Якщо немає АДА, лейкоцити гинуть, організм стає беззахисним перед вірусами і бактеріями. Для лікування Ашанти застосували генну терапію ex vivo: з організму виділили клітини імунної системи, піддали їх генетичній модифікації і ввели дівчинці. Копії нормального гена були введені у клітини крові Ашанти за допомогою вірусного вектора. У клітинах розпочався синтез АДА, через 6 місяців вміст лейкоцитів в організмі дівчинки досягнув нормального рівня.

З 90-х років ХХ ст. сотні лабораторій світу проводять дослідження щодо використання генної інженерії для лікування захворювань (табл. 4.4).

Деякі захворювання, генна терапія яких проходить дослідження

Захворювання	Генотерапевтичний препарат	Клітини-мішені
Важкий комбінований імунодефіцит	Аденозиндезаміназа	Лімфоцити, клітини кісткового мозку
Меланома	Фактор некрозу пухлин	Клітини пухлини
Меланома, рак нирки	Інтерлейкін-2	Клітини пухлини
Гіперхолестеролемія	Рецептор ліпопротеїнів низької густини	Гепатоцити
СНІД, рак яєчників	Тимідинкіназа вірусу простого герпесу	Клітини пухлини, Т-лімфоцити
Муковісцидоз	Трансмембранний білок	Епітелій дихальних шляхів
Анемія Фанконі	Фактор анемії Фанконі групи С	Клітини головного мозку
Артрит	Антагоніст рецептора інтерлейкіна-1	Фібробласти
Гемофілія В	Фактор ІХ	Фібробласти шкіри

Триває більше 500 клінічних випробовувань різних видів генної терапії.

За допомогою генної терапії лікують міодистрофію Дюшена. Молекулярною причиною захворювання є мутація гена дистрофіну, що необхідний для скорочення м'язових волокон. Ген дистрофіну локалізований у Х-хромосомі, тому хворіють переважно чоловіки. Якщо немає дистрофіну, м'язи втрачають здатність до скорочення, настає смерть. Для моделювання захворювання в експериментальних тварин (мишей) видалили ген дистрофіну. Під час уведення нормального гена експериментальним тваринам спостерігалось відновлення функції м'язових волокон (до 25%). Установлено, що під час генної терапії міодистрофії людини необхідна модифікація більшості (до 50%) м'язових волокон.

У 2000 р. у США для лікування гемофілії була запропонована процедура введення гена одного з факторів згортання крові. Встановлено, що введення цього гена хворим на гемофілію перешкоджає виникненню крововиливів у пацієнтів. Після такого лікування пацієнти з гемофілією більше року не відчувають необхідності у додаткових ін'єкціях фактора згортання крові.

Серед неспадкових захворювань людини вчені приділяють значну увагу раку. Впроваджується кілька напрямів боротьби з хворобою:

– генетична модифікація клітин імунної системи для посилення їх протипухлинної активності і пригнічення роботи онкогенів;

– підвищення чутливості пухлинних клітин до хіміотерапевтичних препаратів.

З метою підвищення чутливості злоякісних клітин до хіміотерапії використовують ген, що кодує фермент тимідинкіназу вірусу простого герпесу. Клітини, в яких синтезується вірусна тимідинкіназа, перетворюють хімічний препарат ганцикловір у токсичний продукт, у результаті чого вони гинуть, ріст пухлини зупиняється.

Є певні успіхи генної терапії в боротьбі зі СНІДом. Учені ідентифікували ген CCR5, який забезпечує резистентність до ВІЛ. Ген CCR5 перешкоджає утворенню на поверхні Т-лімфоцитів рецепторів, з якими зв'язується ВІЛ. Також ідентифікований ген Rantes, який визначає, чи стане людина носієм ВІЛ, чи захворіє на СНІД. Незначні відмінності в гені Rantes, який відповідає за формування імунної системи, можуть підвищувати схильність до ВІЛ.

Відомо, що геном ВІЛ містить послідовність TAR, яку розпізнає вірусний регуляторний білок. Тільки після взаємодії цього білка з TAR-елементом вірус починає розмножуватися. Щоб зупинити процес розмноження ВІЛ, було запропоновано вводити штучно синтезовану TAR-послідовність в інфіковані клітини. Вбудована у клітини послідовність ДНК відіграє роль пастки: в інфікованій клітині на ній синтезуються РНК, регуляторний білок вірусу зв'язується переважно з ними, а не з РНК вірусу, у результаті чого вірус припиняє розмножуватися.

Незважаючи на значні досягнення генної терапії у лікуванні багатьох захворювань, вона не має широкого застосування в медичній практиці. Причини цього полягають у наступному:

– відторгнення чужорідних генів, спричинене імунною реакцією організму;

– перенесені гени існують у клітинах протягом короткого часу, іноді навіть не встигають напрацювати необхідну кількість лікувального продукту, у зв'язку з цим спостерігається тимчасове виліковування і тільки у частини клітин;

– невисока ефективність сучасних методів перенесення генів у клітини хворих;

– вбудовування нового генетичного матеріалу в певні ділянки ДНК людини може викликати рак. Відомі випадки, коли пацієнти з імунною недостатністю після застосування генної терапії захворіли на лейкемію.

Корекція генетичних дефектів не призведе до погіршення генофонду людської популяції. За даними популяційної генетики для суттєвого підвищення частоти шкідливого гена в результаті ефективного лікування необхідні тисячі років. Наприклад, якщо генетичне захворювання зустрічається в одного із 100 000 новонароджених, то пройдуть 2000 років після початку застосування ефективної генної терапії, перш ніж частота захворювання подвоїться. Отже, генна терапія людини вважається безпечною медичною процедурою, хоча не зовсім ефективною.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні напрями медичної біотехнології.
2. Поясніть, чому для одержання білків людини застосовують еукаріотичні, а не прокаріотичні системи експресії.
3. Що таке ДНК-вакцини? Які переваги вони мають порівняно з традиційними вакцинами?
4. Що таке фітоселекційні вакцини? Поясніть роль фітоселекційних вакцин у боротьбі з онкологічними захворюваннями.
5. Як за допомогою ДНК-зондів можна виявити зміни в гені β -глобіну і діагностувати серповидноклітинну анемію?
6. Що таке моноклональні антитіла? Наведіть приклади застосування моноклональних антитіл у медицині.
7. Порівняйте етапи генної терапії *ex vivo* та *in vivo*. Опишіть вірусні і невірусні системи доставки генів.
8. Поясніть роль генної терапії у лікуванні неспадкових захворювань людини.
9. Які причини обмеженого застосування генної терапії у медицині?
10. Чи існує ймовірність забруднення генофонду людської популяції внаслідок застосування генної терапії?

РОЗДІЛ 5. ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Біотехнологічна промисловість належить до найбільш наукоємних галузей у світі. За допомогою мікроорганізмів людина отримує широкий спектр корисних речовин: лікарські препарати, сировину для хімічної промисловості (органічні кислоти та розчинники), білки та амінокислоти, вітаміни, ферменти та ін. Мікробіологічна промисловість, на відміну від хімічної, як сировину використовує відходи сільського господарства, целюлозно-паперової та харчової промисловості.

Усі промислові виробництва, що здійснюються за участі мікроорганізмів, можна поділити на 3 типи:

1) виробництва, засновані на використанні живої чи інактивованої біомаси мікроорганізмів (виробництво пекарських, винних і кормових дріжджів, вакцин, білково-вітамінних концентратів, засобів захисту рослин, заквасок для виготовлення молочнокислих продуктів і силосування кормів, бактеріальних добрив);

2) виробництва, що спрямовані на отримання продуктів мікробного біосинтезу (антибіотики, гормони, ферменти, амінокислоти, вітаміни);

3) виробництва, засновані на одержанні продуктів бродіння або гниття (утилізація целюлози та різних відходів з метою одержання вуглеводів, біогазу, спиртів, органічних кислот, біотехнологія утилізації неприродних матеріалів).

Стадії біотехнологічного виробництва

Розрізняють такі стадії біотехнологічного виробництва:

- підготовка сировини (поживне середовище) і біологічних об'єктів – чистої культури штаму-продуцента;
- ферментація – утворення продукту;
- виділення продуктів, їх очищення;
- виготовлення товарних форм препаратів.

Підготовка сировини і біологічних об'єктів

На першій стадії біотехнологічного виробництва готують поживне середовище, основу якого утворюють джерела Карбону і Нітрогену, макро- і мікроелементи у вигляді солей. Деякі поживні речовини за дуже високих концентрацій уповільнюють ріст клітин мікроорганізмів: глюкоза пригнічує ріст за концентрації > 50 г/л, аміак – > 3 г/л, Ферум – >1,15 г/л, Магній – > 8,7 г/л, Фосфор – > 10 г/л, Цинк – > 0,038 г/л.

Важливою вимогою до приготування поживного середовища є дотримання асептики. З цією метою проводять стерилізацію обладнання та компонентів поживного середовища. Найпоширенішим типом стерилізації є термічна, що полягає у дії високих температур (120–150°C). Також застосовують радіаційну (γ -опромінення) і хімічну (дія бактерицидних сполук) стерилізацію. Деякі субстрати не потребують стерилізації: метанол, етанол, оцтова кислота концентрована.

У біотехнологічному виробництві як біологічні об'єкти використовують промислові штами мікроорганізмів. Створення промислових штамів здійснюється двома шляхами:

- 1) за рахунок уведення в мікроорганізми додаткових генів, збільшення їх кількості або активності;
- 2) за рахунок селекції мікроорганізмів-продуцентів.

Промислові штами мікроорганізмів повинні відповідати таким вимогам:

- здатність до росту на дешевому поживному середовищі;
- висока швидкість росту й утворення кінцевого продукту;
- мінімальне утворення побічних продуктів;
- стабільність продуцента відносно виробничих властивостей;
- безпечність продуцента для людини і тварин;
- стійкість до інфекцій.

Промислові штами мікроорганізмів, на відміну від диких, характеризуються високою продуктивністю. Так, продуктивність промислового штаму *Penicillium* (50 г пеніциліну на 1 л поживного середовища) у 10 000 разів перевищує продуктивність дикого штаму.

Ферментація

Центральним етапом промислового біотехнологічного виробництва є **ферментація** – сукупність операцій, що здійснюються від моменту внесення продуцента до завершення процесів росту, біосинтезу чи трансформації.

Ферментацію проводять у спеціальних ємностях – ферментерах або біореакторах. Схема будови біореактора зображена на рис. 5.1.

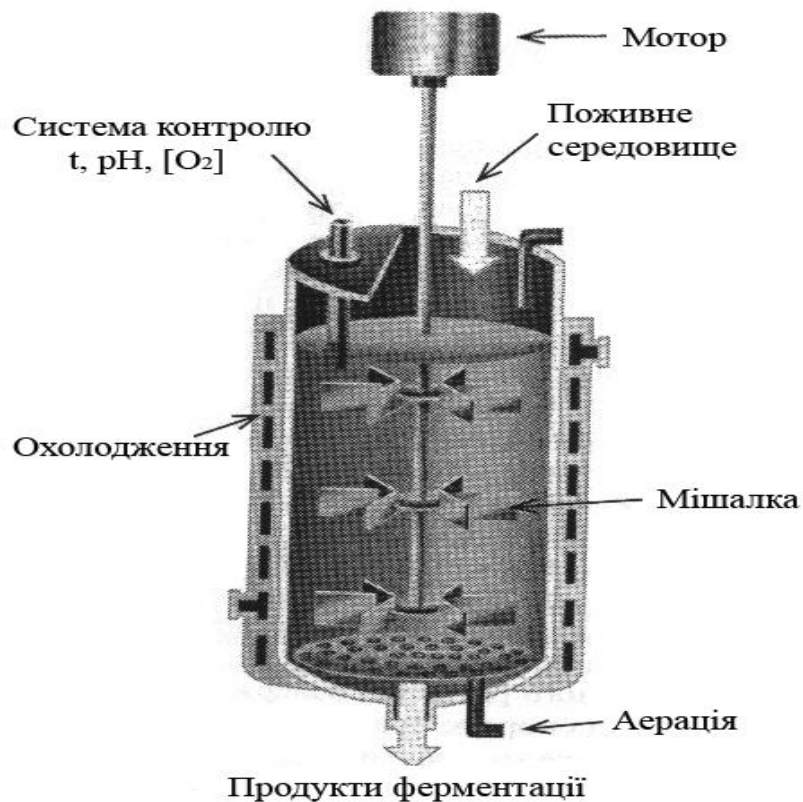


Рис. 5.1. Схема будови біореактора

У біореакторах повинні регулюватися такі параметри: оптимальна температура, рН (5,5 – 8,5), концентрація кисню, інтенсивність перемішування культури і рівномірна доставка поживних речовин. Мікроорганізми під час споживання поживних речовин виробляють тепло. Для запобігання перегріву стінки біореакторів охолоджують водою. Оптимальною температурою для культивування мікроорганізмів є 20 – 50°C. Отже, у біореакторах створюються оптимальні умови для життєдіяльності мікроорганізмів.

Конструкція кожного біореактора розрахована на одержання певного продукту. Наприклад, об'єм біореактора для одержання біомаси дріжджів становить 1500 м³ (висота циліндричного резервуару для вирощування дріжджів на нафті – 40 м, діаметр – 20 м). У пеніциліновому виробництві об'єм біореактора не перевищує 100 м³. Для науково-дослідної роботи використовують біореактори, об'єм яких не перевищує кількох літрів.

Промислова ферментація – це багастадійний процес, що включає вирощування вихідної культури (5 – 10 мл), інкубацію в колбі (200 – 1000 мл), у ферментері для висівного матеріалу (10 – 100 л), у промисловому ферментері (1000 – 100 000 л). Схема процесу ферментації наведена на рис. 5.2.

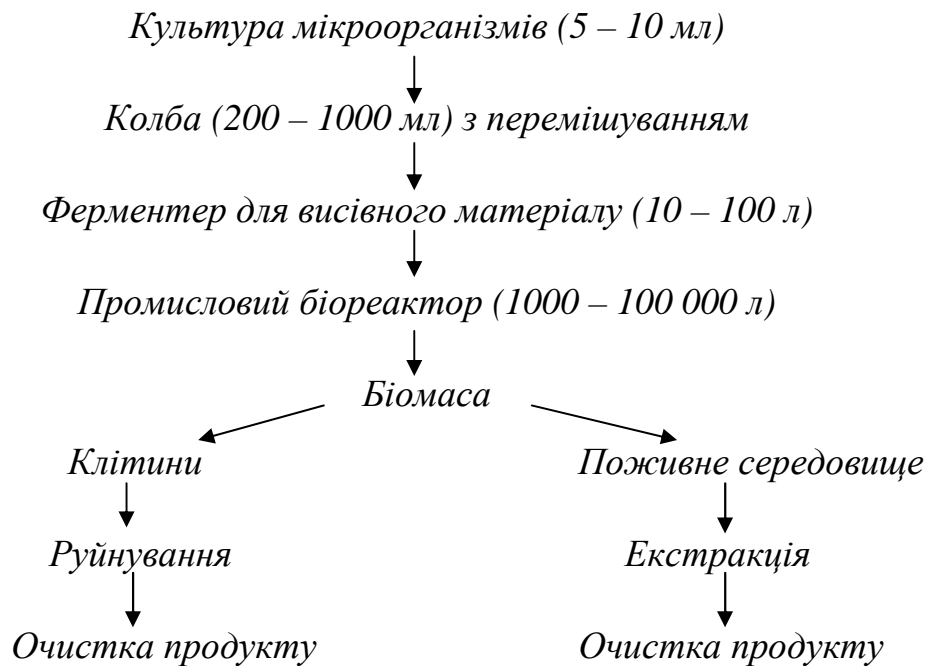


Рис. 5.2. Схема процесу ферментації

Розрізняють **3 способи ферментації**:

- періодична – мікроорганізми вирощують без додавання у процесі ферментації свіжого поживного середовища;
- періодична з додаванням субстрату – у процесі ферментації періодично додають свіже поживне середовище, при цьому вихід продукту на 25 – 100% вище порівняно з періодичною ферментацією;
- неперервна ферментація – свіже поживне середовище надходить у біореактор постійно і паралельно видаляється такий самий об’єм клітинної суспензії.

Кожна із систем ферментації має свої недоліки і переваги. Найпоширеніша – періодична, а найперспективніша й економічно вигідна – неперервна ферментація.

У процесі ферментації для забезпечення мікроорганізмів киснем через поживне середовище продувають стерильне повітря. Кисень малорозчинний у воді і за інтенсивного росту культури мікроорганізмів його запаси у поживному середовищі швидко вичерпуються. За цих умов у клітинах мікроорганізмів синтезуються протеїнази, що можуть розщеплювати білок – продукт мікробного біосинтезу. Існує два шляхи розв’язання проблеми аерації культурального середовища:

- використання штамів мікроорганізмів з дефіцитом протеолітичних ферментів;

– уведення в геном мікроорганізмів генів аеробних бактерій *Vitreoscilla*, що кодують білок (бактеріальний гемоглобін), здатний зв'язувати кисень.

Під час уведення гена *Vitreoscilla* у клітини *E.coli* спостерігається підвищення рівня синтезу клітинних і рекомбінантних білків, активація синтезу АТФ в умовах низької концентрації кисню в поживному середовищі.

Виділення й очищення продуктів

Продукт мікробного біосинтезу може бути локалізований у клітинах мікроорганізмів або у поживному середовищі. Для відокремлення клітин мікроорганізмів від поживного середовища застосовують метод фільтрації або центрифугування. Якщо продукт локалізований усередині клітин, їх руйнують за допомогою фізичних методів (дія ультразвуку, осмотичний шок) або хімічних (руйнування клітинних оболонок під дією бутанолу, толуолу або ферментів).

Для виділення цінних продуктів з поживного середовища застосовують такі методи: екстракція, ультрацентрифугування, кристалізація, хроматографія. Використане поживне середовище необхідно перевіряти на наявність життєздатних мікроорганізмів, щоб виключити можливість їх потрапляння в навколишнє середовище.

Одержання товарних форм препаратів

Розрізняють 3 основні групи біопрепаратів залежно від технології одержання:

1) біопрепарати, що містять життєздатні мікроорганізми (засоби захисту рослин, бактеріальні добрива, закваски для силосування кормів, біодеграданти);

2) біопрепарати, що містять інактивовану біомасу клітин і продукти її переробки (кормові дріжджі, грибний міцелій);

3) біопрепарати на основі очищених продуктів метаболізму мікроорганізмів (вітаміни, амінокислоти, антибіотики, ліпіди, полісахариди).

Типи промислових біопроцесів

Розрізняють такі типи промислових біопроцесів:

- виробництво біомаси (білок одноклітинних мікроорганізмів);
- виробництво клітинних компонентів (ферменти, нуклеїнові кислоти, ліпіди);
- виробництво первинних метаболітів (етанол, молочна та оцтова кислоти);

- виробництво вторинних метаболітів (антибіотики, гормони, алкалоїди, токсини);
- односубстратні конверсії (виробництво оцтової кислоти з етанолу, глюконової кислоти з глюкози, перетворення глюкози на фруктозу);
- багатосубстратні конверсії (очищення стічних вод, утилізація лігноцелюлозних відходів).

Виробництво біомаси мікроорганізмів

Біомасу мікроорганізмів використовують для одержання харчових білків та біологічно активних речовин. У медицині використовують біомасу зеленої водорості *Scenedesmus*. Її культивують у рідкому поживному середовищі, за рік одержують 80 т біомаси. Біомасу піддають ферментативному гідролізу лужною фосфатазою, при цьому 50% білків розщеплюються до пептидів й амінокислот. Одержаний гідролізат містить велику кількість незамінних амінокислот і вітамінів. Він використовується для швидкого одужання і відновлення організму після хвороб, а також як стимулятор загоєння ран.

Промисловий синтез білків за участі рекомбінантних мікроорганізмів

Однією з глобальних проблем людства є дефіцит харчових продуктів. Наприкінці ХХ ст. населення планети становило 7,5 млрд людей. За прогнозами вчених у 2025 р. населення планети становитиме більш ніж 8 млрд, а у 2050 р. збільшиться до 10 млрд людей. За даними ООН, понад половина населення Землі недостатньо забезпечена продуктами харчування. Основна проблема харчування людей полягає у дефіциті білка.

Біологічна цінність білків залежить від їх амінокислотного складу, а саме від наявності незамінних амінокислот, що не синтезуються в організмі людини. Для організму людини 8 амінокислот є незамінними: лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін. Рослинні білки, на відміну від тваринних, не містять повного спектра незамінних амінокислот. Найпоширенішими джерелами рослинних білків є соя, насіння соняшника та арахіс. Білки тваринного походження мають високу собівартість: для одержання 1 кг тваринного білка необхідно затратити 5 – 10 кг рослинних білків.

Альтернативним джерелом білків для харчування людини і тварин є мікроорганізми, у клітинах яких вміст білків становить 60 – 80% від маси

сухої речовини. Завдяки високому вмісту метіоніну, лізину, вітамінів і мінеральних речовин білок мікроорганізмів має високу харчову цінність. Перевагою мікроорганізмів як продуцентів білка є висока швидкість їх росту. Мікроорганізми у 10 – 100 000 разів швидше синтезують білки, ніж рослини і тварини. Наприклад, корова вагою 500 кг за добу утворює 0,5 кг білка, 500 кг рослин сої – 5 кг білка, а 500 кг дріжджів – 50 т білка.

У 1966 р. з'явився термін «білок одноклітинних організмів».

Білок одноклітинних організмів – це білкові продукти, що синтезуються монокультурою мікроорганізмів і використовуються як харчові добавки до раціону людини і тварин.

Для одержання білка одноклітинних організмів використовують різні мікроорганізми і субстрати (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Субстрати і мікроорганізми, що використовуються у процесі одержання білка одноклітинних організмів

Субстрат	Мікроорганізми	Представники
CO ₂	Ціанобактерії	<i>Spirulina maxima</i>
Сироватка (лактоза)	Дріжджі	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Алкани нафти	Дріжджі	<i>Candida lipolytica</i>
Целюлозні відходи	Гриби	<i>Chaetomium cellulolyticum</i>
Метан, метанол	Бактерії	<i>Methylophilus methylotrophus</i>

У біотехнологічній промисловості продуцентами білка є дріжджі, гриби, бактерії, мікроскопічні водорості. Як субстрати для виробництва білка одноклітинних організмів використовують вуглеводні нафти, метан, водень, вуглекислий газ, метанол, етанол, оцтова кислота, крохмаль, лігноцелюлозні відходи сільського господарства, відходи вугільної, хімічної, харчової, вино-горілчаної і деревообробної промисловості. Підраховано, що за участі мікроорганізмів з 1 кг нафти можна одержати 1 кг білка, а з 1 кг вуглеводів – 500 г білка.

Деякі мікроорганізми як субстрат використовують молочну сироватку. Використання сироватки для годування тварин є неефективним шляхом її утилізації, оскільки ступінь конверсії білка сироватки у тваринний білок дуже низький: для синтезу 1 кг тваринного білка необхідно 1700 кг сироватки молока. Утилізація сироватки за допомогою мікроорганізмів дозволяє одержувати значну кількість білка одноклітинних організмів.

Найчастіше у промисловому виробництві білка використовують дріжджі *Candida lipolytica*. Білок дріжджів за вмістом незамінних амінокислот перевершує білок зерна злакових культур, а за вмістом вітамінів – усі білкові корми, у тому числі рибну муку. Крім великої кількості білків, біомаса дріжджів містить вітаміни, мікроелементи, ліпіди з високим вмістом ненасичених вищих жирних кислот. Підраховано, що 1 т кормових дріжджів замінює 7 – 8 т кормових злаків, що забезпечує додаткове одержання 800 кг свинини або 5 т м'яса птиці. Уведення 1 т кормових дріжджів у раціон телят і поросят економить 6 т молока. Добавка 1 т біомаси дріжджів у раціон птахів дозволяє одержати додатково 1,5 – 2 т м'яса або 25 – 35 тис. яєць.

Крім дріжджів, високопродуктивними джерелами кормового білка є зелені водорості. Як харчову добавку до раціонів тварин використовують біомасу одноклітинних водоростей родів *Chlorella* і *Scenedesmus*. Клітини водорості *Chlorella* містять у своєму складі 50% білка, 40% вуглеводів, 7 – 10% ліпідів, вітаміни (А, В₂, В₅, К), мікроелементи. Клітини хлорели, що займають площу 1 га, продукують 20 – 30 т білка, а рослини люцерни – 2 – 3,5 т.

Водорості носток і спіруліна вживають в їжу. В Японії вживають носток, що росте на схилах вулкана, його називають ячмінний хліб Тенгу. Завдяки високому вмісту вітамінів і мінеральних речовин біомаса водорості *Spirulina platensis* використовується як основа медичних препаратів загальнозміцнювальної та імуномодулюючої дії. Спіруліна містить у своєму складі 65% білків, 19% вуглеводів, 6% пігментів, 4% ліпідів, 3% волокон, 3% мінеральних речовин. Для білків спіруліни характерний збалансований вміст амінокислот. Урожайність спіруліни дуже висока (20 г сухої маси водорості з 1 м² за добу), за рік вона перевищує врожайність пшениці приблизно у 10 разів.

Перспективними джерелами білка є ціанобактерії, що здатні до фіксації атмосферного азоту. Вміст білка у клітинах бактерій становить 80% від маси сухої речовини. Якість біомаси бактерій та інших мікроорганізмів оцінюється за високим вмістом білка і низьким вмістом нуклеїнових кислот, відсутністю шкідливих речовин.

Виробництво білкової біомаси є найбільшим мікробіологічним виробництвом. Уперше масштабне виробництво білка одноклітинних організмів було впроваджено у Німеччині під час Першої світової війни:

на патоці (джерело Карбону) і солях амонію (джерело Нітрогену) вирощували дріжджі *S.cerevisiae*, біомасу яких додавали у продукти харчування для підвищення вмісту білка.

Інтерес до білка одноклітинних організмів підвищився у зв'язку з утилізацією різних відходів. Розробка біотехнологічних процесів одержання білка із відходів потребує дослідження кінетики росту, метаболізму, можливостей генетичних маніпуляцій і безпечності мікроорганізмів.

У 60-х роках ХХ ст. створено установки з виробництва білка за участі мікроорганізмів, що можуть утилізувати нафту. Встановлено, що із 1 т нафти можна одержати 1 т дріжджів *Candida*, що містять приблизно 600 кг білка. Перше підприємство з виробництва дріжджів з алканів нафти почало діяти у СРСР у 1973 р. У 1970–1980 рр. СРСР посів перше місце у світі за обсягом мікробіологічного виробництва білка – більш ніж 1 млн т кормових дріжджів за рік. З 1985 р. білок одноклітинних організмів використовують у харчовій промисловості. Мікробний білок використовують для створення штучного м'яса, молока, сиру та інших продуктів. Вони пройшли апробацію на тваринах і людях. Такі штучні продукти можна зустріти на прилавках магазинів США, Англії, Індії, країн Азії та Африки. Але широке застосування білка одноклітинних організмів у харчовому раціоні людини обмежується такими факторами:

- можлива присутність у біомасі мікроорганізмів токсичних речовин, адсорбованих із субстрату (важкі метали) або синтезованих мікроорганізмами (мікотоксини), для виявлення яких необхідно здійснювати додаткові аналізи, що потребує значних витрат;

- високий вміст нуклеїнових кислот у біомасі мікроорганізмів може становити небезпеку для організму людини за деяких патологічних станів;

- низька швидкість руйнування клітин мікроорганізмів у травному каналі може призвести до розладів травлення або алергічних реакцій.

Мікроорганізми здатні синтезувати не лише харчові і кормові білки. За рахунок уведення клонованих генів можна одержувати різні білки за участі мікроорганізмів. У геном *E.coli* і дріжджів були введені гени, виділені з мідій *Mytilus edulis*. Ці гени кодують білок, що виконує роль біоклею.

У 1995 р. були виділені гени, що кодують білки павутини. Введення цих генів у геном мікроорганізмів забезпечило синтез білків павутини в їх клітинах. Як відомо, павутина у 100 разів тонша за волосину, м'якша за бавовну, міцніша за сталь, еластична, стійка до змін температури. Цей

матеріал можна використовувати для виготовлення парашутів, бронезилетів та ін.

Таким чином, за допомогою мікроорганізмів можна одержувати широкий спектр білків.

Виробництво клітинних компонентів мікроорганізмів

Промислове виробництво ферментів

Відомо, що мікроорганізми синтезують понад 2000 ферментів. У промислових масштабах за участі мікроорганізмів одержують близько 20 ферментів. За рік у світі виробляють 65000 т ферментів.

Галузі застосування деяких ферментів наведено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Застосування ферментів

Фермент	Застосування
Амілаза, глюкоамілаза	Пивоваріння, виробництво спирту
Аміноацилаза	Одержання L-амінокислот
Глюкозооксидаза	Виготовлення харчових продуктів
Ренін	Виготовлення сирів
Бромелайн, фіцин	Освітлення соків, денатурація білків м'яса
Каталаза	Антиоксидант
Целюлаза	Виробництво спирту і глюкози
Протеаза	Детергент, виробництво спирту
Глюкозоізомераза	Виробництво сиропів з високим вмістом фруктози
Інвертаза	Інверсія сахарози
Лактаза	Гідроліз лактози, утилізація сироватки
Ліпаза	Виготовлення сирів, ароматизаторів
Пектиназа	Освітлення соків, виробництво спирту

У найбільшій кількості одержують протеази, целюлази, пектинази, амілази, ліпази. Протеази використовують у харчовій, парфумерній і косметичній промисловості, медицині (лікування тромбозів, запальних процесів), кіновиробництві (розчинення желатинового шару під час регенерації плівок). Додавання протеаз до тваринних кормів покращує їх засвоєння. Протеазами обробляють відходи переробки риби та інші корми з високим вмістом білка. Крім протеаз, як добавку до комбікорму використовують ферменти целюлази, що здійснюють гідроліз целюлози – основного компонента клітинних стінок рослин.

Ферменти пектинази застосовують у текстильній промисловості (замочування льону перед обробкою), виноробстві (освітлення вин), консервуванні фруктових соків.

У спиртовій промисловості використовують протеази, пектинази, целюлази, амілази. Амілази використовують для отримання глюкози з картопляного чи кукурудзяного крохмалю. Глюкоза є цінним харчовим продуктом для дітей грудного віку, хворих, спортсменів.

Ферменти також використовують для виробництва замінників цукру. У 1957 р. був відкритий фермент глюкозоізомераза, що перетворює глюкозу на фруктозу. У 1966 р. за допомогою цього ферменту японські вчені отримали фруктозний сироп із глюкози. На сьогодні за рік у світі одержують 3 млн т фруктозного сиропу, який використовують для виготовлення напоїв.

Для виробництва синтетичних миючих засобів використовують лужні протеази, ліпази, оксидази. У 1907 р. Отто Рем запропонував додавати до миючих засобів порошок, отриманий з підшлункової залози свині. Отже, уперше був створений миючий засіб з біодобавками. Через 50 років було розроблено промислове виробництво лужних протеаз з використанням бактерій *Bacillus*. На сьогодні 80% синтетичних миючих засобів містять протеази (1 кг миючого засобу – 0,1 г ферменту, оптимум дії 40 – 60°C).

Найпоширенішими продуцентами ферментів є штами *Bacillus* або *Aspergillus*, їх вирощують на білкових або крохмальних сумішах. Як джерела Карбону для росту мікроорганізмів використовують крохмаль, кукурудзяний екстракт, соєву муку, гідролізати біомаси дріжджів. Для інтенсифікації процесів синтезу ферментів у поживне середовище додають амінокислоти, пурини, РНК, іони металів (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}).

Розроблено 2 методи культивування продуцентів ферментів: глибинний (мікроорганізми вирощують у рідкому поживному середовищі) і поверхневий (культура мікроорганізмів вирощується на поверхні твердого зволоженого поживного середовища).

Ферменти широко застосовують як каталізатори багатьох промислових процесів. Біологічні процеси за участі ферментів мають низку переваг: вони використовують відтворену сировину, здійснюються в м'яких умовах (нормальний тиск, температура), їх відходи екологічно безпечні і підлягають переробці. Використання ферментів у промислових процесах обмежується їх малою стійкістю і чутливістю до дії високих температур. Ці труднощі долають іммобілізовані ферменти, адсорбовані на носіях (органічні полімери, скло, силікати).

Імобілізовані ферменти

Важливим напрямом біотехнології є виробництво і використання іммобілізованих ферментів. Створенням іммобілізованих ферментів займається інженерна ензимологія. У 1916 р. Дж. Нельсон та Е. Гріффін створили перший іммобілізований фермент шляхом адсорбції інвертази на вугіллі і довели, що фермент зберігає каталітичну активність. Термін «іммобілізований фермент» з'явився у 1971 р. й означав обмежене переміщення білкових молекул у просторі.

Техніка іммобілізації дозволяє підвищувати стабільність ферментів. Розрізняють два методи іммобілізації ферментів:

- фізичний – адсорбція на нерозчинних у воді носіях (фермент не зв'язаний з носієм ковалентними зв'язками);
- хімічний – між ферментом і носієм утворюється ковалентний зв'язок.

За допомогою хімічних зв'язків ферменти приєднують до носіїв – іонообмінних полімерів, поліорганосилоксанів, пористого скла, полісахаридів. У результаті іммобілізації ферменти отримують стійкість до руйнування і можуть використовуватися багаторазово.

Іммобілізовані ферменти порівняно з нативними ферментами мають деякі переваги:

- 1) можливість повторного використання ферментів, фермент легко виділити з реакційного середовища;
- 2) ферментативний процес можна здійснювати неперервно, регулюючи швидкість реакції і вихід продукту;
- 3) можливість зміни властивостей ферментів (чутливість до рН, специфічність) за рахунок модифікації їх молекул;
- 4) можливість регуляції каталітичної активності іммобілізованих ферментів шляхом зміни властивостей їх носіїв.

Як носії іммобілізованих ферментів найчастіше використовують органічні сполуки, що повинні відповідати таким вимогам:

- висока хімічна і біологічна стійкість;
- велика пориста питома поверхня;
- гідрофільність;
- невисока собівартість.

Класифікація органічних носіїв іммобілізованих ферментів наведена на рис. 5.3.

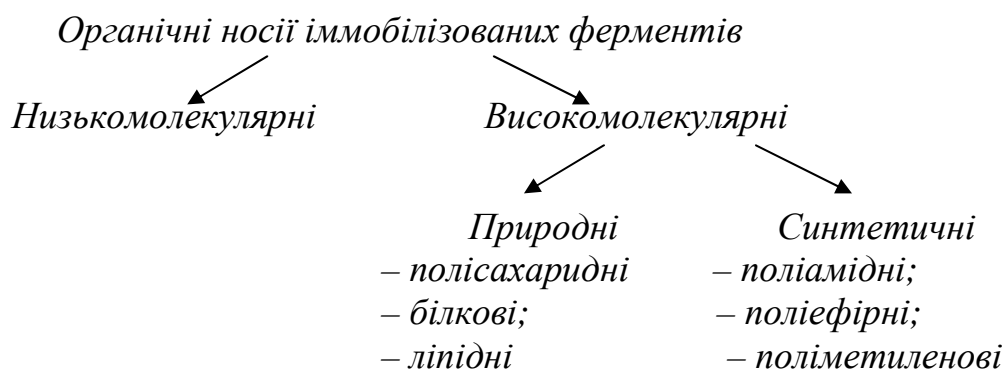


Рис. 5.3. Класифікація органічних носіїв

З природних високомолекулярних носіїв найчастіше використовують полісахаридні і білкові (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Порівняльна характеристика полісахаридних і білкових носіїв

Тип носіїв	Переваги	Недоліки	Приклади
Полісахаридні	Наявність високо реакційноздатних груп, гідрофільність	Нестійкість до дії мікроорганізмів, висока вартість	Декстран (сефадекси), агар, агароза, целюлоза та їх похідні
Білкові	Здатність до біодеградації, велика ємність	Висока імуногенність (крім колагену і фібрину)	Кератин, колаген, фібрин, міозин, альбумін

Серед синтетичних полімерів найчастіше використовують носії поліметильного типу і поліамідні. Широко застосовують включення ферментів у поліакриламідний гель, стійкий до хімічної дії. Полімерні носії на основі N-вінілпіролідону є біологічно інертними, їх використовують для одержання іммобілізованих ферментів, що можуть повільно розпадатися в організмі. Недоліком таких носіїв є їх здатність накопичуватися в організмі людини. Тому перевага віддається природним полімерам, що гідролізуються ферментами. До складу лікарських препаратів найчастіше входять полісахаридні полімери на основі декстрану.

Галузі застосування іммобілізованих ферментів:

- органічний синтез;
- аналіз (на основі дії ферментів працюють високочутливі й абсолютно специфічні імуноферментні методи аналізу);
- процеси конверсії енергії (фотоліз води);
- текстильна промисловість (відбілювання й обробка пряжі);
- харчова промисловість (за участі іммобілізованих ферментів одержують глюкозо-фруктозні сиропи, глюкозу, яблучну, аспарагінову

кислоти, L-амінокислоти, дієтичне безлактозне молоко, цукри із молочної сироватки);

– медицина (імуноферментний аналіз у клінічній діагностиці; направлений транспорт ліків в організмі; створення ліків пролонгованої дії зі зниженою токсичністю й алергенністю);

– фармацевтика (імобілізовані ферменти використовують як лікарські препарати локальної дії, а також у різних апаратах перфузійного очищення біологічних рідин («штучна нирка» – уреаза);

– імобілізовані ферменти можуть бути підсилювачами слабких сигналів (дія ультразвуку, механічних або світлових сигналів на носій змінює каталітичну активність системи фермент-носій). Цей принцип використовується для створення механо- і звукочутливих датчиків.

Імобілізовані клітини мікроорганізмів

На основі імобілізованих клітин мікроорганізмів розроблено методи одержання органічних кислот, амінокислот, антибіотиків, стероїдів, спиртів. Імобілізовані клітини використовують для очистки стічних вод, переробки сільськогосподарських і промислових відходів.

Понад 150 років тому для швидкого способу одержання оцту застосовували мікроорганізми, адсорбовані на тирсі деревини. Перше промислове застосування імобілізованих клітин було здійснено у 1974 р. в Японії для одержання аспарагінової кислоти. Японські вчені проводять найбільшу кількість у світі досліджень за участі імобілізованих клітин мікроорганізмів.

У Московському державному університеті ім. М.В. Ломоносова був розроблений метод одержання аспарагінової кислоти з використанням клітин *E.coli*, адсорбованих на поліакриламідному гелі. Період напівжиття біологічного каталізатора становить 110 днів.

Імобілізовані клітини мікроорганізмів порівняно з імобілізованими ферментами мають низку переваг:

1) відсутність витрат на виділення й очистку ферментів і зниження витрат на виділення продуктів реакції;

2) висока активність і стабільність;

3) можливість створення неперервних автоматичних процесів;

4) здатність до тривалого функціонування поліферментних систем без екзогенних кофакторів (живі клітини регенерують АТФ і коферменти НАДФ⁺, НАД⁺).

Імобілізовані клітини мікроорганізмів використовуються у багатьох процесах:

- біосинтез і трансформація органічних сполук (амінокислот, органічних кислот, стероїдів, вуглеводнів, нуклеотидів, антибіотиків);
- пивоваріння і виноробство;
- очищення стічних і природних вод;
- вилучення металів зі стічних вод;
- асиміляція сонячної енергії, створення водневих сонячних елементів;
- фіксація атмосферного азоту;
- розробка біосенсорів для аналітичних досліджень.

Перспективним напрямом біотехнології є іммобілізація рослинних і тваринних клітин для синтезу фізіологічно активних сполук, а також іммобілізація клітинних органел як поліферментних систем.

Технологія одержання мікробних ліпідів

Ліпіди мікроорганізмів можуть використовуватися в різних галузях промисловості: лакофарбовій, хімічній, фармацевтичній, медицині. Основними продуцентами ліпідів є дріжджі. У клітинах дріжджів *Cryptococcus terricolus* вміст ліпідів становить 60% від сухої маси. До 70% триацилгліцеридів накопичують дріжджі видів *Lipomyces Lipoferus* і *Rhodotorula gracilis*. Фосфоліпіди у значних кількостях синтезують дріжджі *Cryptococcus guilliermondii*, що утилізують алкани.

Як джерела вуглеводів для росту продуцентів ліпідів використовують гідролізати торфу і деревини. Висока концентрація азоту у поживному середовищі пригнічує біосинтез ліпідів і посилює синтез білка, нестача азоту стимулює синтез ліпідів.

Прості ліпіди (гліцериди і воски) мікробіологічного походження використовують у процесах обробки металів як технологічні мастила. Вищі жирні кислоти з числом атомів Карбону 14 – 18 використовують під час виробництва мила, шин, у хімічній і лакофарбовій промисловості. Фосфоліпіди використовують як добавку під час флотації мінералів, а також як антикорозійний компонент мастил.

Виробництво первинних метаболітів мікроорганізмів

Первинними метаболітами мікроорганізмів є речовини, що необхідні для процесів їх життєдіяльності. До первинних метаболітів належать амінокислоти, органічні кислоти, спирти, вітаміни та інші сполуки.

Виробництво амінокислот

Щорічно у світі виробляється більше 800 000 т амінокислот вартістю понад 5 млрд доларів. У промисловому масштабі амінокислоти одержують шляхом екстракції з білкових гідролізатів або як продукти метаболізму бактерій *Corynebacterium* або *Brevibacterium*.

До складу живих організмів входить більш ніж 150 амінокислот, 20 з яких є структурними компонентами білків. Приклади використання протеїногенних амінокислот наведено в табл. 5.4.

Загалом 66% амінокислот використовують для виготовлення кормів, 31% – у харчовій промисловості, 3% – у медицині, косметології, хімічних синтезах.

Таблиця 5.4

Застосування амінокислот

Амінокислота	Застосування
Аланін	Підсилювач смаку й аромату
Аргінін	Лікування захворювань печінки
Аспарагін	Діуретик
Аспарагінова кислота	Синтез замінників цукру, підсилювач смаку
Валін	Розчини для ін'єкцій
Гістидин	Лікування виразок, антиоксидант
Гліцин	Синтез замінників цукру
Глутамін	Лікування виразок
Глутамінова кислота	Підсилювач смаку й аромату
Ізолейцин, лейцин	Розчини для ін'єкцій
Лізін	Кормова і харчова добавки
Метіонін	Кормова добавка
Пролін	Розчини для ін'єкцій
Серин	Косметична промисловість
Тирозин	Розчини для ін'єкцій
Треонін	Кормова добавка
Триптофан	Розчини для ін'єкцій, антиоксидант
Фенілаланін	Синтез замінників цукру
Цистеїн	Антиоксидант, випікання хліба

У найбільшій кількості (60% від загального обсягу одержання амінокислот) виробляються такі амінокислоти: глутамінова кислота, метіонін, лізін і гліцин. Щорічно у світі мікробіологічним способом одержують 500 000 т глутамінової кислоти і 180 000 т лізину.

Незамінні амінокислоти (лізін і метіонін) використовують як добавку до рослинних кормів. У тваринних білках міститься 7–9% лізину, а в білках пшениці – 3%. Додавання до кормів 0,3% лізину скорочує витрати на 20%. Підраховано, що 1 т лізіна замінює 75 т зерна, 5 т рибної

муки або 9 т соєвого шроту, що забезпечує додаткове утворення 10 т м'яса. Основним продуцентом лізину є *Corynebacterium glutamicum*.

У Росії на основі *E.coli* був створений промисловий штам мікроорганізмів, що синтезують треонін. Додавання треоніну до рослинних кормів значно підвищує продуктивність сільськогосподарських тварин.

У харчовій промисловості амінокислоти використовують як ароматичні і смакові агенти. Гліцин має солодкий смак, тому його додають у солодкі напої. Також він володіє бактеріостатичною дією. Цистеїн покращує процеси випікання хліба та його якість. На основі глутамінової кислоти одержують глутамат натрію, що використовується як підсилювач смаку під час виготовлення приправ.

У медицині амінокислоти використовують для лікування деяких захворювань. Аргінін у комплексі з аспарагіною або глутаміною кислотами, K-Na-аспартат застосовуються під час лікування захворювань печінки. Фенілаланін і дигідроксифенілаланін ефективні при лікуванні хвороби Паркінсона. Цистеїн захищає SH-групи ферментів від окиснення, має детоксикуючу дію. З поліамінокислот отримують шовний матеріал для хірургії.

На основі амінокислот одержують замінник цукру аспартам (метиловий ефір L-аспартил-L-фенілаланіну). Аспартам – дипептид, що складається з аспарагінової кислоти і фенілаланіну. Аспартам у 150 разів солодший за глюкозу.

Ще один замінник цукру містить у своєму складі амінокислоти. Англійські біохіміки з плодів африканського куща *Dioscorephyllum cumminsii* Diels виділили білок, що у 100 000 разів солодший за цукор. Уведення гена цього білка у клітини *E.coli* дозволило одержати замінник цукру мікробіологічним шляхом.

Виробництво спиртів, органічних кислот, вітамінів

Основним продуцентом спиртів є дріжджі. За допомогою дріжджів *Kluuveromyces fragilis* одержують етанол шляхом збродження молочної сироватки. Дріжджі *Candida utilis* ростуть у стічних водах, що містять багато сульфідів.

На основі використання іммобілізованих клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* створено біореактори для промислового виробництва етанолу. Як основну сировину використовують глюкозу.

Біореактор об'ємом 2000 л за добу утворює 2400 л спирту. Імобілізовані дріжджі синтезують етанол протягом 4-х місяців. Етанол є сировиною для мікробіологічної промисловості під час одержання харчових і кормових білків, білково-ліпідних кормових препаратів.

Деякі дріжджі і бактерії синтезують бутанол, а також багатоатомні спирти – гліцерин і 2,3-бутандіол. Відкрито бактерії *Zygomonas mobilis*, що вдвічі ефективніше зброджують вуглеводи в етанол, ніж дріжджі. Сировиною для одержання спиртів є гідролізати деревини, меласи, крохмаль, молочна сироватка. Ферментація меласи різними видами бактерій *Clostridium* використовується для одержання етанолу, етанолу, етанової кислоти, етилацетату, диетилового ефіру. Під час зміни умов культивування ($\text{pH} > 7$) замість етанолу синтезується гліцерин. Відходи виробництва етанолу містять білки, вуглеводи, вітаміни і можуть використовуватися як кормові добавки.

За допомогою мікроорганізмів можна отримати 60 органічних кислот. У найбільшій кількості отримують молочну, оцтову та лимонну кислоти. Лимонна кислота синтезується за допомогою грибів *Aspergillus niger*. Оцтова кислота – шляхом мікробіологічної конверсії водню і вуглекислого газу бактеріями *Acetobacterium woodi* і *Clostridium aceticum*. Бактерії *Lactobacillus*, *Leuconostoc* перетворюють вуглеводи в молочну кислоту, етанол, вуглекислий газ. *Clostridium acetobutylicum* зброджує цукри в ацетон, етанол, ізопропанол, бутанол.

Мікробіологічним шляхом синтезуються вітаміни: B_2 , B_5 , B_{12} , С. Продуцентами вітамінів групи В є гриби *Ashbia* і бактерії *Pseudomonas*, *Clostridium*. Дріжджові гриби *Eremothecium ashbyii*, *Ashbia gossypii*, а також *Ascomycetes* у значних кількостях синтезують рибофлавін (вітамін B_2). Промислові штами мікроорганізмів виробляють у 20 000 разів більше вітаміну B_2 і у 50 000 разів більше вітаміну B_{12} , ніж дикі.

Мікроорганізми використовують для синтезу полімерних матеріалів на основі полісахаридів. Цінним мікробним полісахаридом є декстран, що синтезується бактеріями роду *Leuconostoc*. Декстран є основою медичних препаратів (кровозамінників) і препаратів для біохімічних досліджень (сефадекси, молекулярні сита).

Виробництво вторинних метаболітів мікроорганізмів

Вторинні метаболіти – це низькомолекулярні сполуки, що не є необхідними для росту мікроорганізмів. До вторинних метаболітів належать гормони, антибіотики, алкалоїди, токсини. З усіх продуктів, одержаних мікробіологічним шляхом, вторинні метаболіти мають найбільше значення.

Виробництво гормонів

За допомогою рекомбінантних мікроорганізмів одержують гормони людини, тварин і рослин (фітогормони). У найбільшій кількості виробляються такі гормони людини: інтерферони, інсулін, соматотропін, кортикостероїди.

Інтерферони – це білки, що синтезуються у відповідь на вірусну інфекцію і забезпечують неспецифічний противірусний імунітет.

За хімічною природою інтерферони є глікопротеїнами. Інтерферони були синтезовані одними з перших білків людини. У 1957 р. англійські вчені Ісаак і Ліндельман установили, що миші, які хворіли на грип, стійкі до впливу інших вірусів. Висловили припущення про те, що клітини тварин і людини виділяють речовину, що забезпечує стійкість клітин до вірусної інфекції. Цю речовину назвали інтерферон. Наступні 20 років тривали інтенсивні дослідження хімічної будови і властивостей інтерферонів.

Раніше джерелом отримання інтерферонів людини була донорська кров і культура клітин людини, що не дозволяло одержувати значні кількості гормону. Так, для одержання 1 г інтерферону необхідна кров від 90 000 донорів. У 1978 – 1979 рр. Чарльз Вейсман розробив технологію одержання інтерферону людини за допомогою бактерій. У 1980 – 1985 рр. у лабораторіях кількох країн, у тому числі у СРСР, гени інтерферону були виділені і клоновані. У 1989 – 1990 рр. з'явилися нові ліки – людський інтерферон α (комерційна назва препарату – «реаферон»). Основними продуцентами інтерферону стали бактерії. Важливо, що бактерії швидко розмножуються, використовують дешеве поживне середовище і синтезують велику кількість білка. Із 1 л культуральної рідини бактерій одержують таку кількість інтерферону- α , як із 10 000 літрів донорської крові.

Існують 3 класи інтерферонів: α , β , і γ . Лейкоцити крові продукують α -інтерферон, фібробласти – β -інтерферон, Т-лімфоцити – γ -інтерферон (імунний). Інтерферони застосовують під час лікування вірусних гепатитів,

герпесу, простудних захворювань, розсіяного склерозу, СНІДу, деяких онкологічних захворювань.

Інсулін – це гормон підшлункової залози, що відіграє провідну роль у регуляції вуглеводного обміну. Якщо не вистачає інсуліну, розвивається цукровий діабет. В Україні 2% населення (1 млн) хворіють на цукровий діабет. У медицині з'явився термін «епідемія цукрового діабету». Найбільшу кількість хворих на цукровий діабет становлять люди похилого віку.

У 1923 р. за відкриття інсуліну канадському досліднику Ф. Бантингу присудили Нобелівську премію. З 1926 р. інсулін тваринного походження застосовували для лікування цукрового діабету. У 1958 р. Ф. Сенгер отримав Нобелівську премію за встановлення амінокислотної послідовності інсуліну. Пріоритет у виділенні гена інсуліну людини належить Гілберту, який у 1973 р. розробив метод секвенування ДНК. У 1980 р. Гілберт, Берг і Сенгер одержали Нобелівську премію з хімії за виділення і клонування гена людського інсуліну. У 1978 р. біотехнологічна компанія Genentech здійснила одержання інсуліну людини за допомогою *E.coli*. Створено високопродуктивні промислові штами бактерій. Із 1000 л культуральної рідини бактерій можна отримати до 200 г інсуліну (стільки ж із 1600 кг підшлункових залоз свині чи великої рогатої худоби). Молекула інсуліну складається із двох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками. У клітинах бактерій утворення дисульфідних зв'язків неможливе. З'єднання ланцюгів інсуліну, синтезованих бактеріальними клітинами, здійснюється *in vitro*.

В Україні працює інсуліновий завод «Індар», що виробляє 28 видів інсуліну (людський рекомбінантний і напівсинтетичний, свинячий моноклональний, короткої, середньої і тривалої дії). Виробництво вітчизняного інсуліну відбувається за повним технологічним циклом, включаючи синтез кристалів інсуліну. У світі на таке спроможні лише 4 фармацевтичні компанії. Ступінь очищення інсуліну понад 99% – світовий фармацевтичний рекорд. На заводі створений власний біотехнологічний центр, фахівці якого разом з ученими Національної академії та Академії медичних наук України працюють над упровадженням сучасних біотехнологій у виробництво.

Соматотропін (гормон росту) застосовують для лікування гіпофізарної карликовості. Якщо вводити соматотропін хворим дітям тричі на день у дозі 10 мг/кг маси тіла, за рік їх ріст може збільшитися на

6 см. Раніше соматотропін одержували з трупного матеріалу: з одного трупа – 4 – 6 мг соматотропіну. Завдяки застосуванню технології рекомбінантної ДНК стало можливим отримання соматотропіну у великих кількостях за допомогою мікроорганізмів.

Соматотропін використовують не лише для боротьби з карликовістю, а також як стимулятор загоєння ран, зростання кісток. У тваринництві застосування гормону росту прискорює ріст тварин, збільшує надої молока.

Кортикостероїди – це гормони кори надниркових залоз, похідні холестерину. Кортикостероїди (кортизон, гідрокортизон, преднізолон) застосовують для лікування алергії, ревматоїдного артриту.

Біосинтез кортикостероїдів – складний, багатостадійний процес. У клітинах мікроорганізмів здійснюються реакції гідроксилування стероїдів. Модифікація стероїдів за участі мікроорганізмів у сотні разів знижує собівартість їх синтезу.

Виробництво антибіотиків

Антибіотики становлять найбільший клас фармацевтичних сполук, синтез яких здійснюють мікроорганізми. Обсяг світового ринку антибіотиків зростає на 10 – 12% за рік і становить понад 23 млрд доларів. Щороку вчені відкривають від 100 до 200 нових антибіотиків, з яких лише 1 – 2% мають терапевтичну цінність.

Антибіотики – це специфічні хімічні речовини, що продукуються мікроорганізмами і здатні у малих кількостях справляти вибірково токсичну дію на інші мікроорганізми або клітини пухлин.

Термін «антибіотик» походить від латинського слова *antibioticum*, що означає «проти життя». У 1889 р. французький лікар П. Віллемен запропонував термін «антибіозис», що означав процес взаємного пригнічення організмів. Наприкінці ХІХ ст. російські лікарі В.А. Манасєїн та А.Г. Полотебнов застосовували зелену плісень для лікування гнійних ран. У 1896 р. Б. Гозіо виділив з грибів перший антибіотик – мікофенолову кислоту. Німецький лікар Герхард Домагк відкрив перший сульфаніламід – пронтозил.

У 1913 р. К. Алсберг виділив пеніцилінову кислоту.

У 1921 р. Олександр Флемінг відкрив лізоцим. У 1928 р. О. Флемінг одержав завдання написати статтю про мінливість стафілококів. В одну з чашок Петрі зі стафілококами випадково потрапили спори зеленої кистевидної плісені *Penicillium notatum*. Учений звернув увагу на

руйнування колоній стафілококів навколо *Penicillum*, так був відкритий пеніцилін (1929 р.). У 1940 р. Ернест Борис Чейн очистив пеніцилін і встановив його молекулярну масу, а Хауард Уолтер Флорі провів перші дослідження пеніциліну на тваринах. У 1945 р. Флемінг, Чейн і Флорі отримали Нобелівську премію за дослідження пеніциліну. Під час Другої світової війни пеніцилін урятував життя багатьох поранених.

У 1945 р. Бротзу виділив з проби морської води плісень *Cephalosporium acremonium*, що синтезує кілька антибіотиків, у тому числі цефалоспорин С.

У СРСР дослідження пеніциліну проводила професор З.В. Єрмольєва. На основі пліснявого гриба дині *Penicillum chrysogenum* методом селекції був одержаний промисловий штам, продуктивність якого (50 г пеніциліну на 1 л поживного середовища) у 10 000 разів перевищувала продуктивність дикого штаму *Penicillum notatum*, що використовував Флемінг.

У 1952 р. Зельман Ваксман (за походженням українець) отримав Нобелівську премію за відкриття стрептоміцину. Саме З. Ваксман запропонував термін «антибіотик». З 60-х років ХХ ст. учені перейшли від пошуку нових антибіотиків до модифікації структури вже відомих. З 1970 – 1980 рр. розпочалося промислове виробництво антибіотиків. У 1980 р. обсяг світового виробництва антибіотиків становив 25 000 т, а сьогодні – понад 100 000 т за рік.

Відомо більш ніж 6000 видів антибіотиків, хімічна структура встановлена лише для 1/3 з них. Антибіотики синтезуються в результаті сумісної дії продуктів 10 – 30 генів. Синтезувати антибіотики хімічним шляхом складно, дорого, практично неможливо. Хімічний синтез тетрацикліну радянським ученим академіком М.М. Шемякіним вважається одним із найвагоміших досягнень органічного синтезу.

У біотехнологічній промисловості основними продуцентами антибіотиків є бактерії *Streptomyces*, що мешкають у ґрунті. Один вид *Streptomyces griseus* синтезує більш ніж 50 антибіотиків. Найпоширенішими антибіотиками є пеніциліни, цефалоспорини, тетрацикліни.

Залежно від впливу антибіотики поділяють на такі групи:

- 1) антибактеріальні (тетрацикліни, аміноглікозиди, цефалоспорини);
- 2) протипухлинні (олівоміцин, рубоміцин, актиноміцин, карміноміцин);
- 3) протигрибкові (ністатин, гризеофулін).

Молекулярні механізми дії антибіотиків реалізуються за рахунок порушення таких процесів:

- синтез клітинної оболонки бактерій (пеніциліни);
- синтез білків (тетрацикліни, хлорамфеніколи);
- синтез нуклеїнових кислот (протипухлинні антибіотики);
- цілісність плазматичної мембрани (полієни).

У сільському господарстві антибіотики використовують не лише для боротьби з інфекційними захворюваннями рослин і тварин, а й для стимулювання росту тварин. Кормові антибіотики є висушеною біомасою продуцента, що, крім антибіотиків, містить амінокислоти, вітаміни, ферменти та інші біологічно активні речовини. Прикладом кормових антибіотиків є препарати на основі хлортетрацикліну (біовіт, біоміцин), одержані на основі біомаси бактерій *Bacillus Licheniformis*.

У медицині антибіотики використовують для лікування інфекційних (туберкульоз, менінгіт, плеврит, пневмонія) та онкологічних захворювань; у тваринництві – як добавки до кормів для покращання росту і розвитку молодняка; у харчовій промисловості – як консерванти; у біологічних дослідженнях – для з'ясування механізмів біосинтезу білка і нуклеїнових кислот, функціонування біологічних мембран, трансформації нормальних клітин у злоякісні під дією онкогенних вірусів.

Застосування технології рекомбінантних ДНК дозволяє створювати нові антибіотики з унікальною структурою, що мають сильнішу дію на певні мікроорганізми і володіють мінімальними побічними ефектами.

Нові продукти біопромисловості

Синтез полігідроксиалканоатів

У Росії (Інститут біофізики РАН) була створена нова промислова біотехнологія одержання полімерів нового покоління – поліоксиалканоатів. Особливістю цих полімерів є їх біосумісність і здатність до біодеградації – руйнування за участі живих організмів. Продуцентом полімерів є мікроорганізми *Alkaligenes eutrophus*. Найбільш дослідженим полігідроксиалканоатом є полігідроксибутират. У клітинах бактерій *Alkaligenes eutrophus* вміст полігідроксибутирату досягає 80% від маси клітини. Бактерії використовують полімер як джерело Карбону та енергії. За участі мікроорганізмів поліоксибутират розкладається до вуглекислого газу і води.

Ураховуючи біосумісність полігідроксиалканоатів і здатність до біодеградації, перспективним є використання цих полімерів у фармакології і медицині як шовного матеріалу, матеріалу для імплантації судин.

Синтез полілактидів

Розроблено нові біосумісні матеріали на основі молочної кислоти – полілактиди. Ці полімери були отримані з циклічного димера молочної кислоти – дилактида, що є побічним продуктом ферментації біомаси з великим вмістом крохмалю (кукурудза, пшениця, цукровий буряк). Полілактиди також можна отримувати на основі продуктів переробки нафти. Полілактиди можуть застосовуватися в медицині як носії різних терапевтичних препаратів, використовуватися як шовний матеріал у хірургії, бути основою для фіксації кісток при незначних переломах. Імпланти на їх основі поступово руйнуються і заміщуються тканинами організму, стимулюють процеси регенерації. Застосування цих матеріалів дозволяє уникати повторного хірургічного втручання.

Синтез акриламід

Акриламід є вихідним мономером для отримання полімерів, що використовуються під час очищення стічних вод, у гірничій промисловості, під час виробництва фарб, освітлення соків і вин.

У хімічній промисловості акриламід одержують шляхом гідролізу акрилонітрилу. Цей процес відбувається за високої температури (105°C) у присутності сульфатної кислоти. У 1987 р. були виявлені мікроорганізми, що здатні перетворювати акрилонітрин в акриламід. У результаті селекції цих мікроорганізмів створено промислові штами бактерій, що синтезують у 10 000 разів більше ферменту нітрингідратази, ніж дикі штами. На сьогодні здійснений промисловий процес біокаталітичного одержання акриламід, що відбувається за кімнатної температури і нормального тиску, не утворює відходів, екологічно чистий. Акриламід, одержаний за цією технологією, має високу чистоту.

Синтез нанокристалів

Сучасні нанотехнології потребують нових матеріалів. Магніточутливі бактерії синтезують кристали магнетиту Fe_3O_4 із солей Феруму. Синтез наночастинок здійснюється у спеціальних органелах – магнітосомах. Бактерії синтезують магнітні наночастинки практично однакової форми за кімнатної температури. Зв'язування іонів Феруму здійснює білок mmsB. Дослідники з Tokyo University of Agriculture and Technology (Японія) встановили, що білок

mmsb можна використовувати для синтезу in vitro кристалів магнетиту за кімнатної температури з $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Учені з Iowa State University (США) використали білок mmsb для синтезу нанокристалів фериту кобальту CoFe_2O_4 , який живі організми не здатні синтезувати.

Таким чином, за допомогою бактерій можливий синтез наночастинок з високим ступенем кристалічності.

Біогеотехнологія

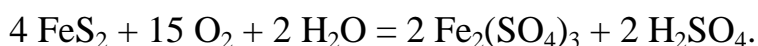
Біогеотехнологія – це галузь біотехнології, спрямована на використання геохімічної діяльності мікроорганізмів у гірничодобувній промисловості (екстракція металів під час біологічного очищення стічних вод гірничодобувних підприємств, окиснення піритів і десульфування кам'яного вугілля, вилуговування бідних і відпрацьованих руд, боротьба з метаном у вугільних шахтах тощо).

Біогеотехнологія зародилася у XVI ст. в Угорщині, де вперше для одержання міді застосували бактеріальне вилуговування металів. Офіційною датою народження біогеотехнології вважається 1922 р., коли німецькі вчені Рудольф і Хельброннер установили, що метод одержання міді є мікробіологічним процесом. У 80-х роках XX ст. сформувалися основні розділи біогеотехнології:

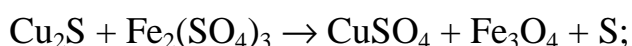
- біогеотехнологія вилуговування металів;
- десульфування кам'яного вугілля;
- підвищення видобутку нафти.

Біогеотехнологія екстракції металів

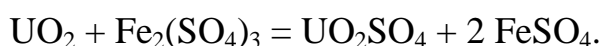
Біогеотехнологія екстракції металів ґрунтується на використанні тіонових бактерій для вилучення металів із гірських порід. Під час переробки бідних руд тонни металів втрачаються у вигляді відходів, шлаків. У 1947 р. Колмер і Кінкель відкрили вид тіонових бактерій *Thiobacillus ferrooxidans*, які отримують енергію за рахунок окиснення відновлених сполук Сульфуру та іонів Fe^{2+} у присутності кисню:



За участі іонів Fe^{3+} здійснюється окиснення халькоцинїта:



або уранїта:



Тіонові бактерії окиснюють усі відомі сульфідні метали, при цьому метали із нерозчинних сульфідів переходять у розчинні сульфати. Із сульфатних розчинів метали вилучають шляхом осадження, екстракції, сорбції.

За участі тіонових бактерій у світі добувають сотні тисяч тонн міді, що становить приблизно 5% від загального видобутку металу. У деяких країнах розроблено технології видобування урану за таким методом.

Десульфування кам'яного вугілля

Відомо, що вміст Сульфуру у кам'яному вугіллі може досягати 10 – 12%. Під час спалювання вугілля Сульфур окиснюється до оксидів SO_2 і SO_3 , які потрапляють в атмосферу, де утворюється H_2SO_4 . З атмосфери сульфатна кислота потрапляє на поверхню землі у вигляді кислотних дощів.

Перші дослідження з видалення Сульфуру із кам'яного вугілля за участі мікроорганізмів були проведені у 1959 р. радянськими вченими З. Зарубіною, Н. Ляліковою та Е. Шмук. У результаті експерименту за 30 днів за участі тіонових бактерій *Thiobacillus ferrooxidans* із вугілля було видалено 23 – 30% Сульфуру.

Американським ученим удалося за 4 дні знизити вміст Сульфуру у вугіллі на 50%. Установлено, що в лабораторних умовах вміст Сульфуру у кам'яному вугіллі за 5 діб можна знизити практично на 100%.

Таким чином, використання тіонових бактерій є ефективним методом видалення сульфурвмісних сполук із кам'яного вугілля.

Боротьба з метаном у вугільних шахтах

В 1 т кам'яного вугілля містяться сотні метрів кубічних метану. Чим глибше залягає вугілля, тим більше метану воно містить. Під час видобутку вугілля метан надходить в атмосферу шахт, що становить загрозу для життя шахтарів. Традиційні методи боротьби з метаном у вугільних шахтах (вентиляція, вакуумна дегазація, зволоження пластів водою) неефективні.

Ідея використання мікроорганізмів для боротьби з метаном у вугільних шахтах належить радянським ученим. У 1939 р. А. Юровський, Г. Капілаш, Б. Магнубі для зниження концентрації метану запропонували застосувати бактерії, що окиснюють метан. Бактерії разом з поживним середовищем (мінеральні сполуки Нітрогену і Фосфору) у вигляді суспензії подають у шахти: 1 т вугілля може поглинути 20 – 40 л суспензії. У вугіллі бактерії розподіляються по тріщинах і порах. Для життєдіяльності бактерій необхідний кисень, який подають у шахти.

Завдяки застосуванню бактерій надходження метану з вугільних пластів знижується вдвічі, а видобуток кам'яного вугілля зростає у 1,5 рази.

Підвищення видобутку нафти

Нафта є основною енергетичною і хімічною сировиною. Її запаси з кожним роком зменшуються. Існуючі технології дозволяють видобувати половину нафти, що знаходиться у пластах. Нафта міцно зв'язана з породами. Для підвищення вторинного видобування нафти використовують мікроорганізми. У результаті діяльності бактерій, що окиснюють вуглеводні, нафта розкладається, накопичуються гази (CO_2 , H_2) і низькомолекулярні органічні кислоти, які перетворюються на метан. Це сприяє розрідженню нафти і підвищенню газового тиску в нафтоносному пласті, що супроводжується зростанням видобутку нафти.

Біоелектроніка

Новим напрямом біопромисловості є біоелектроніка, метою якої є створення біосенсорів. Біосенсори містять іммобілізовані клітини мікроорганізмів або їх компоненти. Так, у складі біосенсорів молекули білків виконують роль напівпровідників.

Біосенсори використовують для якісного і кількісного аналізу широкого спектра речовин. За допомогою біосенсорів проводять екологічний моніторинг (визначають забрудненість довкілля радіонуклідами, важкими металами, нітритами). Біосенсори прості у використанні, дозволяють проводити вимірювання як у лабораторних, так і в польових умовах.

Основні переваги біосенсорів:

- висока селективність і чутливість;
- мініатюрні розміри;
- низька собівартість за умов масштабного виробництва.

Світовими лідерами у виробництві біосенсорів є японські компанії Hitachi і Sharp. В Україні в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України була розроблена серія аналітичних приладів нового покоління на основі ферментів і клітин мікроорганізмів. Біосенсори створюють шляхом нанесення на поверхню іоноселективних електродів клітин мікроорганізмів. Наприклад, *Neurospora eurorea* використовують для визначення концентрації аміаку, а *Trichosporon brassicae* – оцтової кислоти. Як сенсори використовують моноклональні антитіла, що володіють високою специфічністю, або ферменти мікроорганізмів. Біосенсор, що на поверхні

електрода містить фермент глюкозооксидазу, дозволяє визначити вміст глюкози у 100 пробах крові протягом однієї години.

Майбутнє діагностики (клінічної, санітарної, екологічної) нерозривно пов'язане із застосуванням біосенсорів.

Контрольні запитання

1. Опишіть основні стадії біотехнологічного виробництва.
2. Назвіть типи промислових біопроектів.
3. Яким вимогам повинні відповідати промислові штами мікроорганізмів?
4. Що таке метаболічні перевантаження? Як впливає присутність у клітині рекомбінантної плазмиди на її ріст?
5. Яким чином можна подолати проблему забезпечення киснем клітин *E.coli*, що синтезують у великій кількості рекомбінантний білок?
6. Які параметри необхідно контролювати для оптимізації процесу ферментації?
7. Які переваги і недоліки механічного руйнування клітин порівняно з хімічним?
8. Які критерії використовують під час оцінки можливості використання рекомбінантного білка як харчового продукту?
9. Біомаса яких мікроорганізмів використовується для одержання білка?
10. Проаналізуйте переваги і недоліки введення білка одноклітинних організмів у харчовий раціон людини.
11. Поясніть роль мікроорганізмів у промисловому виробництві ферментів.
12. Що таке іммобілізовані ферменти? Які переваги вони мають порівняно з нативними ферментами?
13. Які органічні речовини найчастіше використовують як носії іммобілізованих ферментів? Назвіть галузі застосування іммобілізованих ферментів.
14. В яких промислових процесах застосовують іммобілізовані клітини мікроорганізмів? Які переваги має застосування іммобілізованих клітин мікроорганізмів порівняно з іммобілізованими ферментами?
15. Поясніть роль мікроорганізмів у промисловому виробництві амінокислот. Які амінокислоти одержують у найбільшій кількості?

16. Які мікроорганізми є продуцентами спиртів, органічних кислот, вітамінів?

17. Поясніть роль мікроорганізмів у промисловому виробництві ліпідів. У яких промислових виробництвах використовують ліпіди мікроорганізмів?

18. Які речовини називають вторинними метаболітами? Поясніть роль мікроорганізмів у промисловому виробництві антибіотиків.

19. Які гормони одержують за допомогою рекомбінантних мікроорганізмів?

20. Назвіть полімери, які можна одержати за допомогою рекомбінантних мікроорганізмів. Які переваги мають ці полімери порівняно з поліетиленом?

21. Що таке біогеотехнологія? Назвіть основні напрями біогеотехнології.

22. Поясніть роль мікроорганізмів у процесах видобутку металів.

23. Яким чином за допомогою мікроорганізмів можна знизити вміст Сульфур у кам'яному вугіллі?

24. За допомогою яких мікроорганізмів можна знизити концентрацію метану у вугільних шахтах?

25. Що таке біосенсори? Назвіть галузі застосування біосенсорів.

РОЗДІЛ 6. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОХОРОНИ ДОВКІЛЛЯ

Біотехнологія охорони довкілля – відносно молода галузь, бо налічує трохи більш ніж сто років. Проте розвивається вона дуже інтенсивно, особливо в останні десятиліття.

Біотехнологія охорони довкілля включає очищення трьох головних його складових: води, ґрунту та повітря (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Біотехнологія охорони довкілля від хімічного забруднення

Об'єкт охорони	Характер забруднення	Джерело забруднення	Наявність біологічних методів обробки	
			за кордоном	в Україні
Вода	Технологічний	Промислові стічні води	+	+
		Побутові стічні води	+	+
		Води з-під звалищ побутових відходів	+	±
		Зливові води	+	+
		Води, забруднені радіонуклідами	+	±
	Аварійний (відкритих водойм)	Виливи нафтопродуктів	+	+
		Виливи пестицидів	-	+
		Промислові стоки	+	-
		Побутові стоки	+	+
		Потрапляння радіонуклідів	-	±
Ґрунт	Технологічний	Нафтошлами	+	+
		Звалища побутових відходів	+	-
		Породи мінеральні (відвали)	+	-
		Токсичні відходи	+	-
	Аварійний	Вилив нафтопродуктів	+	+
		Розсипи пестицидів	+	+
Повітря	Технологічний	Пари органічних розчинників	+	+
		Пари нафтопродуктів	+	+
		Пари формальдегіду, метанолу	+	-

Примітка: ± – здійснено в лабораторних умовах на пілотних установках.

В Україні застосовується переважна більшість існуючих у світі екологічних біотехнологій. Вони використовуються як для запобігання забрудненню довкілля хімічними речовинами природного і штучного походження, так і для подолання наслідків техногенних аварій.

Біотехнологія очищення води

Усі біотехнології очищення ґрунту і повітря від хімічних забруднень здійснюються із використанням води. Наприклад, для очищення повітря від хімічного забруднення використовують біофільтри, в яких повітря пропускають через рідину з мікроорганізмами, унаслідок чого видаляється близько 90% сполук, концентрація яких становила 0,1 – 0,25 кг органічної речовини в 1 м³ повітря. У зв'язку з цим найбільш поширеними стали біологічні методи очищення води.

В Україні вперше у межах Російської імперії ще у 1887 р. було введено в експлуатацію біологічні зрошувальні системи. Було започатковано використання спеціально селекціонованих мікроорганізмів – деструкторів органічних речовин, що забруднюють воду, у практиці очищення промислових стоків.

Біотехнологія очищення води передбачає трансформування різних хімічних елементів у нерозчинні у воді речовини, які переходять у повітря або випадають в осад. Підраховано, що кожен міський мешканець продукує за добу 150 – 200 л побутових стічних вод.

Основним традиційним методом біологічного очищення стічних вод є їх обробка активним мулом в аеротенках. Біотехнологія очищення стічних вод активним мулом була запропонована і реалізована в Англії у 1914 р. і відтоді принципово не змінилася. Типова технологічна схема очищення води включає механічне, біологічне і фізико-хімічне очищення.

Стічна вода після ретельного механічного очищення від різноманітного сміття, піску, жиру, інших дисперсних домішок надходить в аеротенк. Аеротенк – це залізобетонна споруда, в яку постійно подається повітря. В аеротенках вода очищується складним гідробіоценозом – активним мулом. Концентрація активного мулу в аеротенках не перевищує 2 – 4 г/л. Активний мул на 95% складається з прокаріотів, здебільшого бактерій, і лише 5% біомаси мулу становлять найпростіші. До складу активного мулу входять бактерії родів *Actynomyces*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Desulfomonas*, *Pseudomonas*, *Sarcina* та ін. Серед найпростіших у складі активного мулу переважають *Sarcodina*, *Mastigophora*, *Ciliata*, *Suctoria*, які регулюють віковий і видовий склад бактерій. Показником якості активного мулу є **коефіцієнт протозойності** – співвідношення кількості найпростіших мікроорганізмів до кількості бактерій. На 1 млн бактерій повинно міститися 10 – 15 клітин найпростіших.

Після тривалої обробки (24 год. і більше) вода з аеротенка надходить у вторинний відстійник, в якому звільняється від активного мулу, а потім потрапляє у проміжні водойми (ставки) для третинного фізико-хімічного доочищення, після чого надходить у річку. У проміжних водоймах вода проходить освітлення і насичується киснем. Після біологічної очистки воду хлорують або озонують.

Основним недоліком цієї технології є необхідність утилізації великої кількості надлишкового мулу, що містить небезпечні мікроорганізми, віруси, токсичні і мутагенні сполуки. Перероблений активний мул використовують як добриво або піддають анаеробному руйнуванню з утворенням органічного палива. Утилізацію активного мулу здійснюють у метатенках – герметичних спорудах об'ємом кілька м³. Біоценоз метатенків бідніший, ніж аеротенків, і складається з бацил, псевдомонад, оцтовокислих і метаноутворюючих бактерій. У результаті діяльності цих мікроорганізмів активний мул перетворюється на цінне органічне паливо – біогаз, основним компонентом якого є метан.

Отже, під час очищення стічних вод за традиційною технологією досягається три основні мети:

- деградація органічних і неорганічних відходів;
- відновлення ресурсів для повернення у кругообіг біогенних елементів (С, N, P, S);
- одержання цінних видів органічного палива.

Постійне погіршення хімічного складу стоків і водночас підвищення вимог до якості очищеної води обумовлюють необхідність у створенні нових методів біологічної обробки води. В Інституті колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України (Київ) був розроблений метод очищення води під назвою «біоконвеєр» (рис. 6.1).

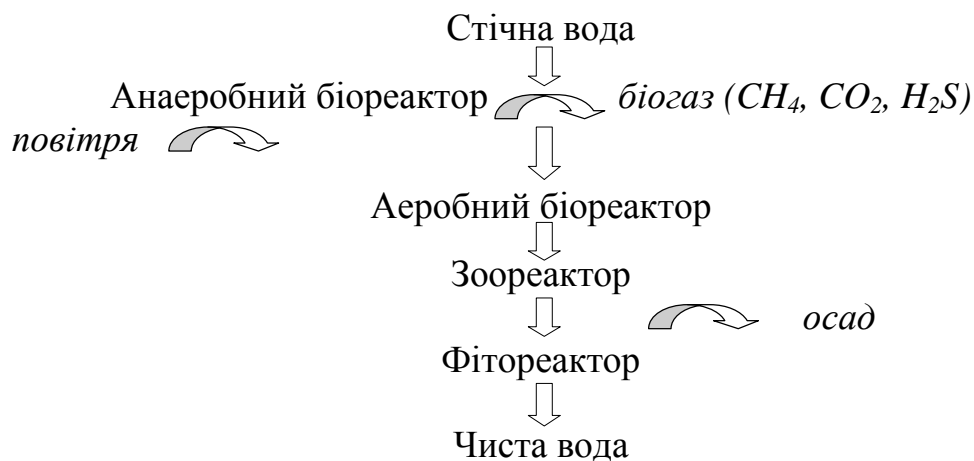


Рис. 6.1. Біоконвеєр

Технологічна суть біоконвеєра полягає у тому, що на шляху стічної води розміщені гідробіонти – анаеробні бактерії, аеробні мікроорганізми (оліготрофи, найпростіші), фільтратори, хижаки, які утилізують розчинені у воді хімічні сполуки.

Цей метод має низку переваг порівняно з традиційною системою біологічного очищення води:

- можливість очищати будь-які (природні, зливові, побутові, промислові стічні) води, що містять розчинені органічні сполуки, навіть токсичні, канцерогенні чи мутагенні;

- біоконвеєр дає змогу доводити якість очищеної води до будь-якого заданого ступеня чистоти;

- немає проблеми щодо утилізації надлишкової біомаси, бо вона споживається і мінералізується у трофічному ланцюгу. Чим більша кількість трофічних рівнів міститься у біоконвеєрі, тим менше біомаси залишається в очищеній воді. Досить мати в очисній споруді трофічний ланцюг у 2 – 3 ланки, щоб зменшити кількість надлишкової біомаси у 100 – 1000 разів.

За принципом біоконвеєра вже працює велика кількість очисних споруд з очищення промислових і побутових стоків, а також зливових і природних вод.

Так, у 2001 р. на терміналі «Південний» нафтопроводу Одеса – Броди було здано в експлуатацію станцію біологічного очищення побутових стічних вод, побудовану за принципом біоконвеєра. Станція включає відстійник, анаеробний та аеробний мікробні біореактори, зоо- та фітореактори. Порівняно з традиційною технологією очищення води експлуатаційні витрати вдвічі менші, надлишкового мулу практично немає, а якість очищеної води дуже висока (хімічне споживання кисню – 15 мг/л, завислі речовини < 2 мг/л).

Не менш переконливий інший приклад. Під час виробництва хімічного полімеру анід на чернігівському ВО «Хімволокно» утворюється стічна вода, що містить 2500 – 4000 мг/л гексаметилендіаміну. Очистити таку воду неможливо жодним з відомих фізико-хімічних і традиційних біологічних методів. Її знешкоджували термічно – «спалювали» у термічних газових печах за температури 950°C, витрачаючи при цьому 350 м³ метану на 1 м³ води. Мікробіологи Інституту колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України знайшли мікроорганізми, які здатні використовувати гексаметилендіамін як джерело Карбону,

Нітрогену і енергії. Для біотехнологічного очищення 1 м³ води потрібно витратити 100 г ортофосфорної кислоти і 0,75 кВт·год електроенергії на аерацію та перекачування стоку.

Отже, сучасні біотехнології охорони довкілля, зокрема води, від хімічного та біологічного забруднення є не лише екологічно раціональними, а й економічно вигідними.

Показники забруднення стічних вод

На кожному етапі очищення стічних вод здійснюється контроль за їх якісним складом. Під час визначення вмісту органічних речовин у воді використовують 2 методи:

– хімічне поглинання кисню – кількість 0,25% розчину K₂Cr₂O₇, що витрачається на окиснення речовин, які містяться у стічних водах. Пробу води кип'ятять протягом 2 год. у 50% розчині H₂SO₄ у присутності каталізатора Ag₂SO₄;

– біохімічне поглинання кисню – кількість кисню, що використовується мікроорганізмами під час аеробного розкладання речовин, які містяться у стічних водах, за стандартних умов за певний проміжок часу. У пробах стічної води визначають вміст кисню, після чого вносять мікроорганізми. Через певний проміжок часу здійснюють повторне визначення вмісту кисню у пробах води. Чим менше кисню залишається у воді, тим вищий ступінь її забруднення.

Для оцінки чистоти стічних вод необхідно використовувати обидва методи одночасно.

Роль аквакультури в очищенні стічних вод

Для очищення стічних вод, крім мікроорганізмів, використовують аквакультуру різних видів водних рослин (водний гіацинт або ряска, очерет, рогоза, аїр), риб (звичайний короп, тиляпія), креветок, молюсків (мідій).

Як природні біофільтри і біоіндикатори забруднення водою успішно використовують мідій. Мідії проявляють високу стійкість до забруднень. Вони акумулюють токсичні речовини в організмі і тому використовуються як біоіндикатори забруднення морської води важкими металами, пестицидами, нафтопродуктами. Ці молюски живляться фітопланктоном. Вони дуже ефективно фільтрують воду: один дорослий молюск профільтровує 2 – 5 л води за годину. За добу мідії фільтрують з ефективністю 95 – 98% десятки тонн води на кожний м² своїх поселень.

Вони утворюють природний потужний біофільтр. Навколо мідієвих поселень вода особливо чиста. Метаболіти молюсків, що екскретуються, володіють біологічною активністю відносно продуцентів органічної речовини (бактеріопланктону і фітопланктону). Встановлено, що в районах культивування мідій чисельність клітин бактеріопланктону вища у 4 – 6 разів, а фітопланктону – у 10 – 30 разів. Мідії трансформують речовини в малотоксичні форми, перешкоджають поширенню забруднення, контролюють чисельність фітопланктону. Перспективним є використання мідій для очищення стічних вод.

Біодеградація ксенобіотиків

Однією з важливих проблем захисту біосфери є біодеградація ксенобіотиків – руйнування складних речовин у результаті діяльності живих організмів.

Ксенобіотики (з грецької *xenos* – «чужий») – це неприродні, синтетичні сполуки. Більшість ксенобіотиків токсичні, проявляють мутагенну, канцерогенну та алергенну дію. У видаленні ксенобіотиків з навколишнього середовища відіграють роль такі фактори: рН середовища, стійкість ксенобіотиків до руйнівної дії, їх розчинність у воді, леткість, здатність надходити у клітини мікроорганізмів, подібність ксенобіотиків до природних сполук, що підлягають біодеградації. Найважче розкладаються детергенти, пластики та вуглеводні.

У середині 60-х років ХХ ст. у ґрунті були виявлені мікроорганізми, здатні здійснювати деградацію ксенобіотиків (гербіцидів, пестицидів, детергентів, розчинників та ін.). Найпоширенішими мікроорганізмами, що очищують воду, повітря і ґрунт, є бактерії роду *Pseudomonas*. Біохімічні дослідження засвідчили, що різні штами *Pseudomonas* здатні розщеплювати понад 100 органічних сполук. Так, *Pseudomonas putida* руйнує толуол і трихлоретилен. Трихлоретилен є одним із найпоширеніших забруднювачів ґрунту і води. Ця сполука використовується як розчинник і має канцерогенну дію. Основними компонентами пестицидів і гербіцидів є галогенопохідні ароматичних сполук. Під дією бактерій ці речовини перетворюються на катехол, гідрохінон або їх галогенопохідні. Швидкість їх деградації зворотно пропорційна числу атомів галогену у вихідній сполуці. Негалогеновані

ароматичні сполуки бактерії перетворюють на катехол, а далі – на проміжні продукти обміну (піровиноградну кислоту й ацетальдегід).

Здатність бактерій розкладати ксенобіотики обумовлена наявністю в їх клітинах специфічних ферментів (оксидоредуктаз, гідроксилаз), що окиснюють вуглеводні та ароматичні сполуки: бензол, толуол, ксилол. Гени цих ферментів містяться у складі плазмід. Жоден мікроорганізм не може зруйнувати всі органічні сполуки, тому з допомогою методів генної інженерії створюються бактерії, що містять плазмиди кількох штамів і мають широкий спектр дії.

У 1979 р. професор Ананда Чакрабарті створив перший бактеріальний штам з ширшими катаболічними можливостями. Цей штам розщеплював більшість вуглеводнів нафти і був названий «супербацилою». Для його одержання були використані плазмиди, кожна з яких кодує фермент, що розщеплює певні вуглеводні: плазмід А САМ забезпечує деградацію камфари, ОСТ – октану і гексану, НАН – нафталіну, ХУЛ – ксилолу і толуолу. Схема одержання бактеріального штаму, здатного утилізувати нафту, зображена на рис. 6.2.

Утворений новий штам був здатний рости на неочищеній нафті краще, ніж вихідні штами. У 1981 р. Чакрабарті одержав перший патент США на створення генетично модифікованого мікроорганізму. Ця подія стимулювала подальший розвиток біотехнології.

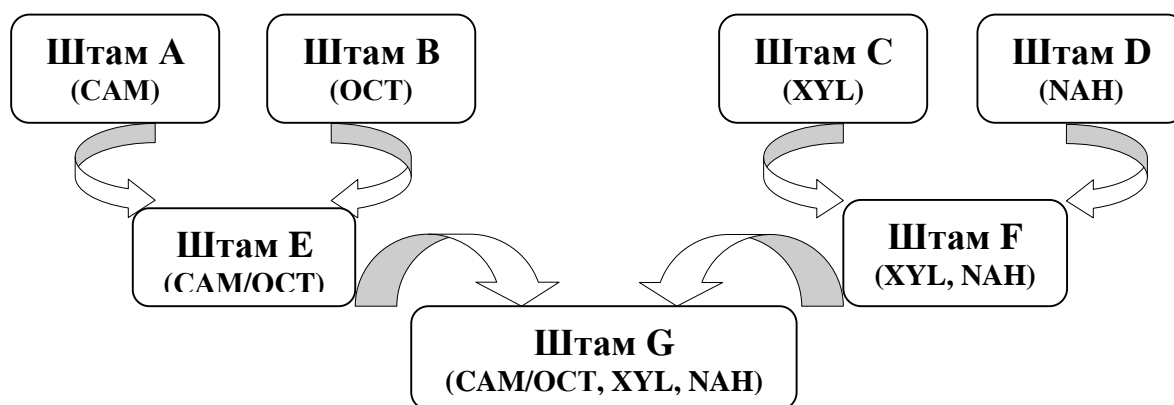


Рис. 6.2. Одержання бактеріального штаму, здатного утилізувати нафту

Сьогодні мікроорганізми застосовують для біодеградації нафти під час техногенних катастроф. Підраховано, що за рік у моря потрапляє приблизно 6 млн т нафти. Для більшої ефективності утилізації нафти створюють мікроемульсію, що містить бактеріальні штами і капсули із сумішшю сполук – джерел Нітрогену, Фосфору і Калію. Додавання цих

речовин стимулює розмноження бактерій. Біопрепарати на основі бактерій роду *Pseudomonas* ефективно утилізують нафту і нафтопродукти (мазут, дизельне паливо, бензин) у широкому діапазоні температур (8 – 35°C) і рН середовища (3,5 – 10).

Встановлено, що для біодеградації ксенобіотиків ефективнішим є використання асоціацій мікроорганізмів, ніж їх окремих видів. Деякі мікроорганізми здатні змінювати молекулу ксенобіотика таким чином, що вона стає доступним джерелом енергії для інших мікроорганізмів (кометаболізм). У деяких випадках відбувається хімічна модифікація ксенобіотиків (фосфорилування, метилювання, ацетилювання та ін.), що призводить до зменшення або втрати їх токсичності.

Найнебезпечнішим забруднювачем довкілля є ЕДТА (етилендіамінтетраацетат). Цю сполуку широко використовують як детергент у складі синтетичних миючих засобів. ЕДТА зв'язує іони важких металів і сприяє їх накопиченню у ґрунті. Бактерії родів *Pseudomonas* і *Bacillus* здатні руйнувати комплекс Fe-ЕДТА. Ці бактерії застосовують для очистки побутових стічних вод і ґрунту від детергентів миючих засобів.

Крім бактерій *Pseudomonas* та *Bacillus*, біодеградацію ксенобіотиків можуть здійснювати представники родів *Acinebacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Rodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*. Деякі бактерії містять фермент цианідгідратазу, що здійснює руйнування цианідів.

В Інституті біотехнології в Лейпцизі (Німеччина) виділені штами бактерій, що поглинають і відкладають у своїх клітинах ртуть.

Для очищення води від Феруму використовують залізобактерії, яких на сьогодні відомо більш ніж 20 видів. Згідно із санітарними нормами вміст Феруму у воді не повинен перевищувати 0,3 мг/л. У річній чи ставковій воді вміст Феруму коливається в межах від 0,01 до 1 мг/л. Залізобактерії ефективно окиснюють Fe^{2+} до Fe^{3+} , що дає можливість видаляти нерозчинні сполуки Феруму з води.

Крім бактерій, біодеградацію ксенобіотиків здійснюють гриби таких родів, як: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Phanerochaete*. Встановлено, що гриби ефективніше утилізують ксенобіотики, ніж бактерії. Деякі гриби можуть руйнувати ароматичні сполуки – пентахлорбензол і пентахлорфенол. В одному з експериментів грибами було оброблено 10 000 т ґрунту з території деревообробного комплексу, забрудненого цими сполуками. Вміст пентахлорфенолу у ґрунті становив 700 мг/кг. Через один

рік він знизився до 10 мг/кг, що є допустимою нормою. Таким чином, протягом одного року гриби зменшили концентрацію ксенобіотиків у ґрунті у 70 разів. Бактерії змогли б очистити ґрунт лише через 4 – 5 років. Руйнування ароматичних вуглеводнів гриби здійснюють позаклітинно, вони активні навіть узимку. Підраховано, що вартість грибної і бактеріальної очистки ґрунту однакова, але під час застосування грибів значно скорочуються терміни біодеградації ксенобіотиків.

Таким чином, мікроорганізми широко використовують для ефективного й економічно раціонального руйнування токсичних хімічних відходів. Перевагою мікробіологічної очистки над хімічною є те, що вона не призводить до появи у навколишньому середовищі нового забруднюючого агента.

Фіторемедіація

Здатність рослин засвоювати розчинні неорганічні іони з ґрунту і води може бути використана для видалення із забруднених територій токсичних сполук. Так, окремі лінії індійської гірчиці *Brassica Juncea* ефективно видаляють з ґрунту іони кадмію і свинцю. У зв'язку з цим стала широко застосовуватися фіторемедіація – використання рослин для очищення довкілля, насамперед ґрунту, від хімічних забруднень.

Основні напрями фіторемедіації:

- фітоекстракція – використання рослин, здатних накопичувати елементи-забруднювачі в надземних органах, які потім утилізуються;
- фітодеградація – використання рослин і штамів мікроорганізмів для руйнування органічних забрудників;
- фітофільтрація – використання коренів рослин (ризофільтрація) або проростків (бластофільтрація) для поглинання забруднювачів, головним чином важких металів, із водних розчинів;
- фітоволіталізація – використання рослин для екстрагування летких речовин із ґрунту;
- фітостабілізація – використання рослин для переведення речовин-забруднювачів у малодоступну форму.

Недоліками фіторемедіації є невелика біомаса рослин-акумуляторів, їх повільний ріст, необхідність в утилізації одержаної рослинної біомаси.

Біодеградація і конверсія побутових і промислових відходів

Центральною проблемою екологічної біотехнології є рециркуляція (повторне використання) речовини та енергії.

Мікробіологічна утилізація полімерних побутових відходів

Значну частину побутових відходів становлять поліетилен та вироби з нього. Виробництво поліетилену досягає десятків мільйонів тон на рік. Цієї кількості поліетилену вистачить, щоб накрити поліетиленовою плівкою товщиною 0,05 мм територію Франції.

Кількість полімерних відходів, що утилізуються, становить менш ніж 7%. Утилізація поліетилену здійснюється за рахунок його спалювання або вторинної переробки. Як відомо, поліетилен досить стійкий до дії тепла і вологи, тому у природних умовах він не руйнується протягом тривалого часу (кілька десятків років).

Із навколишнього середовища були виділені мікроорганізми, що здатні використовувати поліетилен як джерело Карбону. Консорціум мікроорганізмів, до складу якого входить один вид грибів і 5 видів бактерій, здійснює біодеградацію поліетилену в анаеробних умовах. Руйнування поліетилену розпочинається на ділянках механічного пошкодження плівки. Продуктами біодеструкції поліетилену є газоподібні вуглеводні та органічні кислоти. Встановлено, що за участі мікроорганізмів руйнування поліетилену здійснюється протягом 12 місяців. Отже, мікробна біодеградація поліетилену є ефективним способом його утилізації.

Утилізація рослинної біомаси

Відходи сільського господарства, деревообробної і целюлозно-паперової промисловості містять велику кількість лігноцелюлозних матеріалів. Ці відходи можна використовувати як промислову сировину.

Як відомо, целюлоза, геміцелюлоза і лігнін утворюють структурний каркас рослин. Целюлоза – це найпоширеніший природний полімер, побудований із залишків глюкози, сполучених β -1,4-глікозидними зв'язками. Геміцелюлоза – це гетерогенний полімер, що складається із гексозних (глюкоза, маноза, галактоза) і пентозних (ксилоза, арабіноза) мономерів. Лігнін побудований із залишків фенілпропану. Цей полімер обумовлює стійкість рослин до механічних пошкоджень і дії мікробів.

Відомо, що бактерії і гриби здатні розщеплювати целюлозу завдяки сумісній дії кількох ферментів – целюлаз. Високу целюлазну активність проявляють гриби *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Sporotrichum*. Однак гідроліз целюлози під дією целюлолітичних мікроорганізмів відбувається повільно і не до кінця. За допомогою генної інженерії були створені мікроорганізми з високою целюлазною активністю. Для цього гени целюлолітичних ферментів виділили із прокариот та еукаріот, а потім клонували їх у мікроорганізмах: *E.coli*, *S.cerevisiae* і *Z.mobilis*. Мікроорганізми, що містять целюлазні гени, можуть здійснювати перетворення целюлози в етанол.

Була досліджена можливість використання ферментів целюлаз у промисловій переробці паперових відходів. Гідроліз паперових відходів за участі целюлаз здійснювали за температури 45°C, а потім проводили ферментацію вивільненої глюкози за допомогою *S.cerevisiae* за температури 37°C. Це дозволило одержати 400 л етанолу із 1 т паперових відходів.

Як відомо, у промисловому виробництві етанолу використовують дріжджі *S.cerevisiae*, але їх може замінити бактерія *Zyomonas mobilis*, що ефективніше зброджує вуглеводи. За допомогою генної інженерії на основі *Z.mobilis* був створений продуцент етанолу, який як джерело Карбону може використовувати ксилозу – побічний продукт деревообробної і целюлозно-паперової промисловості.

Крім етанолу, з рослинної біомаси можна отримувати сировину для хімічної промисловості: бутанол, ацетон, фурфурол, фенол, крезол. Було встановлено, що із 200 000 т соломи можна одержати 50 000 т етанолу і 20 000 т фурфуролу. Також за мікробної конверсії целюлози можна одержати до 30% нафтопродуктів. Мікроорганізми роду *Clostridium* можуть синтезувати оцтову і молочну кислоти, а також ацетон, використовуючи як субстрат соломку або відходи цукрової тростини. *Clostridium acetobutylicum* зброджує цукри в ацетон, етанол, ізопропанол, n-бутанол.

Одним з основних компонентів рослинної біомаси є крохмаль. Як відомо, крохмаль – це резервний полісахарид, що є сумішшю гомополімерів D-глюкози – лінійних (амілоза) і розгалужених (амілопектин). Амілоза складається з $1 \cdot 10^2$ – $4 \cdot 10^5$ залишків глюкози, з'єднаних α -1,4-глікозидними зв'язками. Амілопектин містить $1 \cdot 10^4$ – $4 \cdot 10^7$ залишків глюкози, що з'єднані α -1,4- й α -1,6-зв'язками. Крохмаль широко використовується у харчовій промисловості: його гідролізують до глюкози, з якої одержують етанол або сироп з високим вмістом фруктози.

Гідроліз крохмалю здійснюють ферменти α -амілаза і глюкоамілаза. Для промислового виробництва α -амілазу одержують із бактерій *Bacillus amyloliquefaciens*, глюкоамілазу – із грибів *Aspergillus niger*.

Таким чином, мікробна деградація і конверсія рослинної біомаси є ефективним шляхом одержання цінних речовин, які можна використовувати у харчовій (етанол, фруктозний сироп) та хімічній промисловості (етанол, бутанол, ацетон, фенол, крезол, фурфурол).

Біоенергетика

Одним із головних завдань екологічної біотехнології є відновлення і збереження енергетичних ресурсів. Близько 99,4% або $1,7 \cdot 10^{23}$ калорій неядерної енергії ми отримуємо від Сонця за рік. Потенціальним джерелом енергії є біомаса рослин – консервантів сонячної енергії. Рослинний покрив Землі становить понад 1800 млрд т сухої речовини, що енергетично еквівалентно $30 \cdot 10^{21}$ Дж і відповідає запасам енергії всіх корисних копалин. Ліси становлять 68% біомаси, трав'яні екосистеми – 16%, оброблювані землі – 8%. Під час спалювання деревини реалізується лише 10% енергозапасів, при цьому в атмосфері накопичується вуглекислий газ. Конверсія рослинної біомаси в біогаз дає можливість реалізувати 50 – 80% потенційної енергії без забруднень атмосфери.

Відходи харчової промисловості і сільського господарства, стоки переробних підприємств, побутові відходи, надлишковий мул, що утворюється у процесі очищення води, за участі мікроорганізмів можна перетворювати на екологічно чистий вид палива – біогаз. Біогаз є сумішшю речовин: метану (60 – 70%), карбон (IV) оксиду (30 – 40%), водень сульфур (1%), а також домішок оксидів Нітрогену, водню, азоту, аміаку.

Біогаз є цінним енергоносієм. Енергія, що міститься у 28 м^3 біогазу, еквівалентна енергії $16,8 \text{ м}^3$ природного газу або $20,8 \text{ л}$ нафти чи $18,4 \text{ л}$ дизельного палива.

Порівняно з традиційними енергоносіями біогаз має деякі переваги:

- біогаз – джерело енергії, що доступне на сімейному рівні;
- відходи процесу одержання біогазу є високоякісними добривами;
- процес виробництва біогазу сприяє підтримці чистоти навколишнього середовища.

Одержання біогазу здійснюють у спеціальних апаратах – метатенках або дайджестерах. Загальна схема процесу включає накопичення і

підготовку біомаси, її трансформацію в біогаз (метанове бродіння), а також раціональне використання продуктів метанового бродіння (біогазу, органічно-мінеральних добрив).

Розкладання органічних сполук з утворенням метану (метанове бродіння) відбувається у 3 етапи:

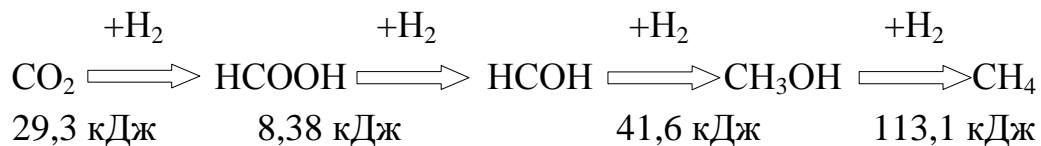
– розчинення і гідроліз органічних сполук: полісахариди гідролізуються до оліго- і моносахаридів, білки – до амінокислот і пептидів, ліпіди – до гліцеролу і вищих жирних кислот;

– ацидогенез – продукти першого етапу перетворюються на органічні кислоти, які окиснюються до оцтової кислоти і CO_2 . При цьому також утворюються H_2 , NH_3 , H_2S ;

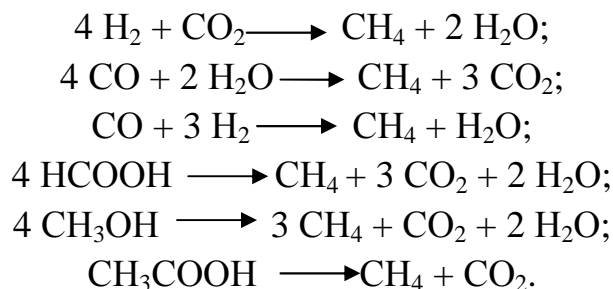
– метаногенез – синтез метану із CO_2 і H_2 .

Кожен етап метаногенезу відбувається за участі ферментів мікроорганізмів. Відомо близько 50 видів мікроорганізмів, здатних здійснювати першу стадію, – представники бацил і псевдомонад. Ацидогенез здійснюють оцтовокислі, пропіоновокислі та інші бактерії. За допомогою метаноутворюючих бактерій (метаногенів) відбувається відновлення карбон (IV) оксиду до метану. Ідентифіковано більш ніж 20 видів метанутворюючих бактерій. Це анаеробні мікроорганізми, що становлять окрему групу архебактерій. Найважливіші родини метанутворюючих бактерій: *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*. У природних умовах завдяки діяльності метаногенних бактерій щорічно утворюється приблизно 800 млн т метану.

Відновлення CO_2 до CH_4 є багатостадійним процесом, у процесі якого бактерії-метаногени одержують енергію:



Біосинтез метану відбувається за такими реакціями:



Коефіцієнт трансформації енергії біомаси в енергію біометану досягає 80%. Коферментом у реакціях перенесення метильних груп є 2-меркапто-етансульфонова кислота.

Вихід біогазу значною мірою залежить від хімічного складу біомаси. Під час використання біомаси з високим вмістом целюлози в біогазі нагромаджуються однакові кількості метану і вуглекислого газу. Збільшення у складі біомаси азотовмісних сполук і ліпідів сприяє підвищенню концентрації метану і зниженню кількості вуглекислого газу. Швидкість розмноження мікроорганізмів-метаногенів та їх метаболічна активність залежить від концентрації в середовищі йонів важких металів, NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , нітратів, сульфідів, а також різних ксенобіотиків.

Процес метаногенезу відбувається у широкому діапазоні температур – від 0 до 60°C. Встановлено, що під час утилізації біомаси за температури 55°C швидкість утворення біогазу у 2,5 – 3 рази вища, ніж за температури 35°C. Оптимальною для метаноутворюючих мікроорганізмів є концентрація твердої речовини 10 – 12%. Довжина частинок біомаси не повинна перевищувати 30 мм. Тривалість ферментації біомаси становить 24 – 28 діб. За допомогою бактерій-метаногенів із 1 кг сухої речовини біомаси добувають у середньому 0,4 – 0,6 м³ біогазу.

Таким чином, використання метаногенезу – перспективний шлях розв'язання не лише екологічних, а й енергетичних проблем.

Мікроорганізми можна використовувати як джерело альтернативних видів палива. Із зеленої водорості *Botryococcus braunii* була одержана речовина, аналогічна до дизельного палива. Клітини водорості містять у своєму складі 75% вуглеводнів від сухої маси. Існують різновиди *B.braunii*, відмінні за пігментацією і структурою вуглеводнів. Зелений різновид містить лінійні вуглеводні з непарним числом (25 – 31) атомів Карбону, а червоний – з парним (34 – 38). Під час створення оптимальних умов для культивування водоростей вихід вуглеводнів може становити 60 т/га за 1 рік.

Як альтернативний спосіб одержання енергії досліджують механізм перетворення енергії у галофітних бактерій *Halobacterium halobium*, які використовують енергію Сонця за рахунок її поглинання пурпурним пігментом бактеріородопсином, що міститься в мембранах клітини. Поглинання світла спричиняє фізико-хімічні зміни в мембранах (створення електрохімічного градієнту, транспорт H^+), що забезпечують синтез АТФ.

H. halobium можна культивувати у водоймах з високим вмістом мінеральних солей. З 10 л бактеріальної культури можна отримати 0,5 г мембран, що містять 100 000 молекул пігменту. Пігмент можна фіксувати на матеріалах, що мають фізико-хімічні властивості, необхідні для транспорту протонів.

Перспективним напрямом біоенергетики є розробка технологій одержання екологічно чистої енергії за рахунок утворення фотоводню. Як відомо, у хлоропластах під дією світла відбувається фотоліз води – розкладання на кисень і водень. Моделювання процесів фотосинтезу дозволить запасати енергію Сонця в цінному паливі – водні.

Переваги такого способу одержання енергії:

- наявність надлишку субстрату (води);
- нелімітоване джерело енергії – Сонце;
- продукт (водень) можна зберігати, не забруднюючи атмосферу;
- водень має вищу теплотворність (29 ккал/г) порівняно з вуглеводнями (3,5 ккал/г);
- процес відбувається за нормальної температури без утворення токсичних сполук;
- процес циклічний, оскільки під час використання водню регенерується субстрат – вода.

Отже, пошук і розробка альтернативних джерел енергії, а також використання природних процесів очищення відходів з метою одержання тепла, енергії і поживних речовин є основними завданнями екологічної біотехнології.

Контрольні запитання

1. Поясніть основні етапи очищення стічних вод за традиційною технологією. Який основний недолік має ця технологія?
2. Що таке активний мул? Які мікроорганізми входять до складу активного мулу?
3. Яким чином утилізують надлишковий активний мул?
4. Які переваги має сучасний метод очищення води за принципом «біоконвеєра» порівняно з традиційною системою очищення?
5. Поясніть роль аквакультури в очищенні стічних вод.
6. Які методи використовують для оцінки забрудненості стічних вод?

7. Що таке ксенобіотики? Поясніть роль мікроорганізмів у процесах біодеградації ксенобіотиків.
8. Опишіть технологію створення рекомбінантних мікроорганізмів, здатних утилізувати нафту.
9. Що таке фітореMediaція? Назвіть основні напрями фіореMediaції.
10. За допомогою яких мікроорганізмів можна утилізувати поліетилен?
11. Які органічні сполуки можна одержати шляхом утилізації рослинної біомаси за допомогою мікроорганізмів?
12. Назвіть основні етапи одержання біогазу. За участі яких мікроорганізмів здійснюється цей процес?
13. Які хімічні реакції відбуваються під час метаногенезу?
14. Біомасу яких мікроорганізмів можна використовувати як джерело альтернативних видів палива?
15. Поясніть технологію одержання екологічно чистої енергії за рахунок утворення фотоводню. Які переваги вона має?

РОЗДІЛ 7. ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ

З розвитком біотехнології пов'язують розв'язання глобальних проблем людства: ліквідацію нестачі продовольства, енергії, мінеральних ресурсів, поліпшення стану охорони здоров'я і якості навколишнього середовища.

В основі промислового застосування досягнень біотехнології лежить техніка створення рекомбінантних молекул ДНК. За допомогою методів генної інженерії з'являються нові можливості:

- створення трансгенних організмів;
- створення нових білків за рахунок конструювання нових генів шляхом об'єднання як відомих, так і нових, штучно синтезованих послідовностей нуклеотидів;
- застосування ізольованих генів у складі генно-інженерних конструкцій для одержання харчових продуктів і біологічно активних речовин білкової природи;
- здійснення генотерапії шляхом штучної заміни мутантних алелей.

Багато промислових технологій замінюють технологіями, що використовують ферменти і мікроорганізми: біотехнологічні методи переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очищення стічних вод, одержання біогазу. Центральною проблемою біотехнології є інтенсифікація біопроектів як за рахунок підвищення потенціалу біологічних агентів та їх систем, так і за рахунок удосконалення обладнання, застосування біокатализаторів у промисловості, медицині, хімії.

Сфери застосування методів біотехнології:

- прилади для аналітичної хімії;
- процеси біосинтезу і біодеградації;
- відтворювана сировина для хімічної промисловості;
- хімічні речовини, що використовуються в побуті (клеї, детергенти, барвники, волокна, камеді, харчові добавки, ароматизатори, пігменти, пластик тощо);
- їжа і напої (агропромислове виробництво і переробка продуктів);
- створення високоврожайних рослин і високопродуктивних тварин;
- боротьба із захворюваннями рослин і тварин;
- охорона здоров'я (діагностика, лікування);
- лікарські препарати (антибіотики, вакцини, ферменти), діагностичні методи;

- контроль за станом довкілля (повітря, вода, ґрунт);
- переробка відходів, що забруднюють навколишнє середовище;
- джерела енергії;
- видобуток мінеральної сировини на суші і в морі.

Пріоритетні напрями біотехнології

1. **Технологія мікробного синтезу** корисних для людини речовин.

2. Вивчення участі мікроорганізмів у біосферних процесах, направлена регуляція їх життєдіяльності з метою розв'язання проблеми **охорони довкілля** від техногенних, сільськогосподарських і побутових забруднень. З цією проблемою пов'язані дослідження щодо вивчення ролі мікроорганізмів у родючості ґрунтів (гумосоутворенні і поповненні запасів нітрогену), боротьбі зі шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур, утилізації пестицидів та інших хімічних сполук у ґрунті.

3. **Регенерація ландшафтів** – зміна стратегії господарчої діяльності людини від хімізації до біологізації землеробства доцільна не лише з екологічної, а й з економічної точки зору.

4. **Створення полімерів**, що здатні замінити сучасні пластмаси. Ці полімери мають суттєву перевагу перед традиційними матеріалами, оскільки вони нетоксичні і підлягають біодеградації.

5. Розробка технологій одержання **екологічно чистої енергії**.

Світовими лідерами біотехнології є США, країни Євросоюзу, Китай. Особливістю підходу Євросоюзу до розвитку біотехнології є екологічне спрямування. До 2020 р. у країнах ЄС до 20% хімічної промисловості буде працювати з використанням відтворюваної біосировини. Швеція протягом найближчих 10 – 12 років планує повністю відмовитися від використання нафтопродуктів і перейти на біопаливо.

У Китаї біотехнологія на державному рівні визнана стратегічним пріоритетом на найближчі роки. Щорічні темпи росту біотехнології в Китаї становлять 6 – 18%. Китай посідає 4 місце у світі в галузі генної інженерії рослин.

Розвиток біотехнології дає такі переваги країні:

- зниження залежності від імпорту медичних препаратів;
- забезпечення населення якісними продуктами харчування;
- розв'язання екологічних проблем;

- вироблення альтернативних джерел енергії і сировини на основі відтворюваних ресурсів;
- розвиток економіки, створення нових робочих місць;
- створення системи протидії біотероризму і забезпечення біобезпеки.

Подальший прогрес людства нерозривно пов'язаний із розвитком біотехнології. Водночас варто пам'ятати, що неконтрольоване поширення генно-інженерних організмів і продуктів може порушити біологічний баланс у природі і становити загрозу для здоров'я людини.

Контрольні запитання

1. Яким чином здійснюється контроль за поширенням трансгенних організмів у дикій природі? Чому такий контроль необхідний?
2. Яким чином біотехнологія розв'язує проблему нестачі продовольства?
3. Поясніть роль біотехнології в охороні довкілля.
4. Як регламентуються експерименти з генної терапії соматичних клітин?
5. Поясніть, чому експерименти в галузі генної терапії клітин зародкової лінії заборонені?
6. Наведіть аргументи «за» і «проти» використання трансгенних організмів.
7. Назвіть пріоритетні напрями розвитку біотехнології.

СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

Абзими – антитіла, що проявляють каталітичну активність.

Аденін – пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот. Аденін комплементарний тиміну та урацилу.

Аеробні організми, аероби – організми, що існують, якщо є в середовищі вільний кисень.

Алель – одна із двох альтернативних структурних форм гена.

Ампліфікація – утворення додаткових копій нуклеотидних послідовностей ДНК.

Анаеробні організми, анаероби – організми, що існують, якщо в середовищі відсутній вільний кисень.

Антибіотики – специфічні хімічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами і здатні у малих кількостях справляти вибіркочу токсичну дію на інші мікроорганізми і клітини пухлин.

Антигени – речовини, що сприймаються організмом як чужорідні та викликають імунну відповідь.

Антипаралельна орієнтація – протилежна направленість (5'→3' і 3'→5') полінуклеотидних ланцюгів у дволанцюгових молекулах нуклеїнових кислот.

Антитіло – білок (імуноглобулін), що синтезується В-лімфоцитами у відповідь на появу в організмі антигена.

Ауксини – фітогормони, що стимулюють ріст рослин.

Ауткросинг – міграція трансгенів із генетично модифікованих рослин до диких або сільськогосподарських рослин.

Аутологічні клітини – клітини, що виділені з організму, певним чином модифіковані і введені в організм-донор.

Бактеріофаг – вірус, що інфікує бактерії.

Бактеріофаг I – бактеріофаг E.coli, який широко використовується як вектор під час клонування ДНК.

Бакуловірус – вірус, що інфікує комах.

Балістична трансфекція – спосіб уведення ДНК в органели або клітини. ДНК наносять на поверхню вольфрамових або золотих частинок й «обстрілюють» ними клітини.

Білок одноклітинних організмів – білкові продукти, що синтезуються монокультурою мікроорганізмів і використовуються як харчова добавка до раціону тварин.

Біоаккумуляція – накопичення певної речовини (наприклад ДДТ) у живих організмах.

Біодеградація – руйнування речовин, що забруднюють довкілля, за допомогою живих організмів.

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

Біореактор (ферментер) – пристрій, в якому відбуваються біохімічні реакції за участі мікроорганізмів, їх клітинних екстрактів або ферментів.

Біотехнологія – це наука про методи і технології створення генетично змінених біологічних об'єктів для інтенсифікації виробництва й одержання нових видів продуктів.

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

Вектор – молекула ДНК, що використовується для перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Вестерн-блоттинг – перенесення білкових молекул, розділених за допомогою гелю-електрофорезу, на твердий носій.

Віріон – вірусна частинка.

Вірулентність – характеристика патогенності мікроорганізму.

Віруси – неклітинні форми життя, здатні проникати у живі клітини і розмножуватися тільки всередині цих клітин.

В-клітини – лімфоцити, що продукують антитіла, походять з клітин кісткового мозку.

Вторинні метаболіти – речовини, що не є необхідними для росту і функціонування клітин мікроорганізмів.

Гамети – репродуктивні гаплоїдні клітини багатоклітинних організмів.

Ген – ділянка ДНК, що кодує первинну структуру поліпептиду, молекули транспортної або рибосомної РНК.

vir-Гени – група генів Ті-плазмиди, що забезпечують перенесення Т-ДНК у рослинну клітину.

Генетичний код – система запису генетичної інформації у вигляді послідовності нуклеотидів, в якій кожні три нуклеотиди (кодон) кодують одну амінокислоту.

Генна імунізація – індукція імунної відповіді шляхом уведення у клітини гена, що кодує білок-антиген.

Генна інженерія – напрям молекулярної біології, пов'язаний зі створенням *in vitro* нових комбінацій генетичного матеріалу, здатного синтезувати продукти обміну.

Генна терапія *ex vivo* – введення гена в ізольовані клітини хворого. Після культивування і трансформації клітини вводять в організм хворого. Ця процедура дозволяє виправляти генетичні дефекти.

Генна терапія *in vivo* – введення гена безпосередньо в тканину або орган хворого з метою корекції генетичних дефектів.

Геном – основний гаплоїдний набір хромосом організму.

Геномна бібліотека, банк генів – набір клонованих фрагментів ДНК, що в сукупності утворюють індивідуальний геном.

Ген-репортер – ген, що кодує білок, який легко виявити. Такі гени використовують для перевірки включення рекомбінантної ДНК у клітину.

Гетеромерний білок – білок, що складається з двох і більше різних поліпептидних ланцюгів (субодиниць).

Гібридизація ДНК – з'єднання фрагментів або цілих молекул ДНК із різних джерел.

Гібридний білок (химерний білок) – поліпептидний ланцюг, що є продуктом клонованих послідовностей із різних генів.

Гібридома – гібридна клітина, одержана шляхом злиття лімфоцитів і мієломних клітин. Гібридами володіють здатністю до необмеженого росту і синтезу моноклональних антитіл.

Глікозилювання – ковалентне приєднання вуглеводного залишку до білкової молекули.

β-1,3-Глюканаза – фермент, що гідролізує компоненти клітинної стінки патогенних грибів. Синтезується рослинами і деякими бактеріями.

Гомозиготність – наявність ідентичних алелей в одному або кількох локусах. Клітина або організм з такими алелями називається гомозиготою.

Гомомерний білок – білок, що складається з кількох ідентичних поліпептидних ланцюгів (субодиниць).

Гуанін – пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот. Гуанін комплементарний цитозину.

Дезоксирибоза – пентоза, що входить до складу ДНК.

Дезоксирибонуклеаза I, ДНКаза I – фермент, що розщеплює дволанцюгову ДНК. Використовується для очищення препаратів РНК.

Дезоксирибонуклеїнова кислота, ДНК – полімер, що складається з дезоксирибонуклеотидів; видоспецифічний носій генетичної інформації.

Денатурація ДНК – втрата просторової структури ДНК унаслідок руйнування водневих зв'язків (відокремлення ланцюгів ДНК один від одного).

Дидезоксинуклеотид – нуклеозидтрифосфат, позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп у структурі пентози.

Диплоїд – організм, клітини якого містять два гомологічні набори хромосом.

Дисульфідний зв'язок – ковалентний зв'язок між двома атомами сульфуру, що входять до складу цистеїну. Дисульфідні зв'язки стабілізують просторову структуру білків.

Діазотроф – організм, що здатний фіксувати атмосферний азот.

ДНК-лігаза – фермент, що каталізує утворення 3',5'-фосфодіефірних зв'язків між нуклеотидами в місці розриву ланцюга ДНК.

ДНК-полімераза – фермент, що каталізує реплікацію ДНК.

ДНК-полімераза Taq – термостабільна ДНК-полімераза бактерії *Thermus aquaticus* (зберігає активність за температури 95°C), застосовується у методі ПЛР.

Домінантність – участь лише одного алеля у виявленні ознаки гетерозиготного організму.

Екзон – інформативна ділянка гена еукаріот (містить інформацію про структуру поліпептиду або РНК).

Експлантація – метод збереження життєздатності ділянок тканин поза організмом.

Експресія генів – транскрипція і трансляція генів.

Електропорація – утворення пор у клітинних мембранах під дією електричного струму. Через такі пори у клітини проникає чужорідна ДНК.

Електрофорез – метод розділення заряджених молекул (ДНК, РНК, білків), заснований на різній швидкості їх переміщення в електричному полі.

Ембріональні стовбурові клітини – клітини з ембріонів на стадії бластоцисти, що здатні до диференціації в будь-які типи клітин.

Еукаріоти – організми, що мають ядро та органели. До еукаріотів належать тварини, рослини, гриби і деякі водорості.

Ефективність трансформації – відношення кількості трансформованих клітин до кількості трансформуючої ДНК. Виражають як число трансформантів на 1 мкг ДНК.

Ємність вектора – максимальний розмір ділянки ДНК, що може бути клонований у даному векторі.

Замісна терапія – введення в організм метаболітів, кофакторів, гормонів з метою поповнення їх дефіциту, обумовленого генетичним дефектом.

Зворотна транскриптаза – РНК-залежна ДНК-полімераза, що використовує молекулу РНК як матрицю для синтезу комплементарного ланцюга ДНК.

Імуноафінна хроматографія – метод фракціонування й очистки білків, за якого фіксоване на матриці антитіло зв'язує специфічний білок.

Імунологічний аналіз – метод, що ґрунтується на здатності антитіла взаємодіяти зі специфічним компонентом біологічного зразка.

Імунотерапія – використання антитіл для лікування хворих.

Індолил-3-оцтова кислота – рослинний гормон класу ауксинів, що стимулює ріст рослин.

Інсектицид – речовина, що знищує комах.

Інтерлейкіни – ростові фактори імунної системи – білки, що продукуються Т-лімфоцитами та макрофагами і стимулюють проліферацію лімфоцитів і деяких інших клітин організму.

Інтерферони – білкові фактори, що синтезуються специфічними клітинами у відповідь на вірусну інфекцію. Інтерферони є універсальними противірусними агентами.

Інтрон – неінформативна ділянка гена еукаріот (некодуюча послідовність).

Калус – тканинне новоутворення у рослин у місцях пошкоджень.

Капсид – білкова оболонка вірусів.

«Кеп» – метильований гуанозин на 5'-кінці мРНК еукаріот.

Клітини зародкової лінії – клітини, що поступово перетворюються на гамети.

Клітинна інженерія – напрям біології, спрямований на добування нової генетичної інформації за допомогою гібридизації і реконструкції клітин, що є в культурі.

Клітинна лінія – клітини, які можна культивувати поза організмом протягом невизначено тривалого часу.

Клон – популяція молекул, клітин або організмів, що є точними копіями одного спільного предка. Клони одержують нестатевим шляхом.

Клонування – набір методів і прийомів, які застосовуються для виділення і розмноження нестатевим шляхом генетично однорідних фрагментів ДНК, клітин або організмів, що є точними копіями одного предка.

Клонування генів – система методів, що використовуються для одержання клонованих ДНК: виділення необхідного гена, включення його у плазмиду (вектор), уведення у клітину організму-хазяїна, багатократна реплікація.

Кодон – послідовність із трьох нуклеотидів, що кодує певну амінокислоту.

Комплементарна ДНК, кДНК – молекула ДНК, що синтезована на основі мРНК за участі РНК-залежної ДНК-полімерази (зворотної транскриптази).

Корончатий гал – пухлина рослин, появу якої спричиняють бактерії роду *Agrobacterium*.

Косміда – плазмиди, які містять вбудовану *Cos*-ділянку ДНК фага λ .

Коферментація – одночасний ріст двох мікроорганізмів в одному біореакторі.

Ксенобіотики – неприродні, синтетичні хімічні речовини.

Культура – популяція клітин або мікроорганізмів, що вирощується в контрольованих умовах *in vitro*.

«Липкі» кінці – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, що утворюються під час розриву дволанцюгових ДНК за участі рестриктаз.

Лізис – руйнування клітинних стінок унаслідок дії різних агентів.

Літичний цикл – розмноження вірусу у клітині-хазяїні, що завершується лізисом клітини.

Локус – місце на хромосомі, де знаходиться специфічний ген.

Макрофаг – лейкоцит, що має здатність до фагоцитозу.

Матрична РНК, мРНК – молекула РНК, що містить інформацію про амінокислотну послідовність білкової молекули. мРНК служить матрицею для синтезу клітинних білків.

Мезофіли – організми, що ростуть за температури від 20 до 50°C; оптимальна температура росту – 37°C.

Меристема – тканина рослин, що має здатність до активного поділу. У молодих рослин меристема міститься на кінчиках коренів і пагонів.

Метаболічне перевантаження – порушення метаболізму організму-хазяїна в результаті введення чужорідної ДНК у його геном.

Метилування – приєднання до молекули метильної групи.

Мікроін'єкція – введення ДНК або інших молекул у клітину за допомогою тонкої голки.

Мицелій – вегетативне тіло гриба.

Мобільний генетичний елемент – ділянка ДНК, що може змінювати своє положення в геномі. Серед таких елементів розрізняють IS-елементи і транспозони.

Молекулярна діагностика – виявлення патогенного мікроорганізму, специфічної речовини або зміненої нуклеотидної послідовності за допомогою молекулярно-біологічних методів.

Моноклональні антитіла – однакові за структурою і специфічністю імуноглобуліни, біосинтез яких здійснюють клоновані гібридами.

Мутагенез – процес виникнення мутацій.

Мутагени – фактори, які підвищують частоту виникнення мутацій.

Мутант – організм, змінений у результаті мутації.

Мутації – спонтанні або індуковані зміни структури генома, що успадковуються.

Неперервна ферментація – культивування мікроорганізмів за неперервного додавання в біореактор компонентів поживного середовища і видалення такого самого об'єму клітинної суспензії.

Нуклеозид – сполука, що складається з азотистої основи і вуглеводу рибози (рибонуклеозиди) або дезоксирибози (дезоксирибонуклеозиди).

Нуклеоїд – ДНК-вмісна зона клітини прокариот.

Нуклеотид – сполука, що складається з азотистої основи, вуглеводу (рибози або дезоксирибози) та одного чи кількох залишків фосфатної кислоти.

Онкогени – гени, унаслідок експресії яких відбувається перетворення нормальних клітин еукаріот у злоякісні.

Опіни – продукти конденсації амінокислот з кетокислотами або вуглеводами.

Паліндром – послідовність нуклеотидів, ідентична в обох ланцюгах ДНК у напрямку 5'→3'.

Первинна культура – культура клітин або тканин, що одержана безпосередньо з організму.

Періодична ферментація – культивування мікроорганізмів протягом обмеженого інтервалу часу (до завершення процесу культивування не додають поживні речовини і не видаляють синтезовані продукти).

Періодична ферментація з додаванням субстрату – культивування мікроорганізмів протягом обмеженого інтервалу часу з періодичним додаванням субстрату.

Плавлення ДНК – термічна денатурація ДНК.

Плазміда – позахромосомна дволанцюгова молекула ДНК у кільцевій формі, що автономно реплікується.

Полівалентна вакцина – вакцина, що забезпечує імунну відповідь на кілька інфекційних агентів або на різні епітопи однієї молекули.

Поліедрин – білок капсиду бакуловірусів.

Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР – метод ампліфікації специфічного сегмента ДНК. Процес складається із циклічно повторюваних реакцій: денатурація ДНК, приєднання праймерів, синтез ДНК.

Посттрансляційна модифікація – зміна структури білкових молекул після завершення їх синтезу. До таких модифікацій належать: фосфорилування, глікозилування, відщеплення сигнальних пептидів, окиснення цистеїну та ін.

Праймер – короткий олігорибонуклеотид, з якого розпочинається синтез ДНК.

Проект «Геном людини» – міжнародна програма, метою якої є створення генетичних і фізичних карт генома людини і визначення повної нуклеотидної послідовності ДНК.

Прокаріоти – організми, що не мають ядра. До прокаріотів належать усі бактерії.

Протеїнази, протеази – ферменти, що розщеплюють пептидні зв'язки в білкових молекулах.

Протеоліз – ферментативне розщеплення білків.

Протопласт – клітина, у якої зруйнована клітинна стінка.

Процесинг – сукупність процесів утворення зрілих молекул РНК або білків у клітині, включаючи послідовне розщеплення молекули-посередника під дією ендонуклеаз або протеїназ.

Психрофіли – мікроорганізми, що здатні рости за температури 0 – 5°C.

Рекомбінантна ДНК – молекула ДНК, що утворена під час сполучення генів у новій комбінації. Створюється *in vitro* шляхом об'єднання фрагментів ДНК різних організмів.

Рекомбінантний білок – білок, що є продуктом експресії генів рекомбінантної ДНК.

Ренатурація ДНК – процес відновлення нативної структури денатурованої ДНК.

Реплікація – процес самоподвоєння ДНК.

Репресія – пригнічення транскрипції або трансляції.

Рестриктаза (рестрикційна ендонуклеаза) – бактеріальний фермент, що розщеплює дволанцюгову молекулу ДНК у специфічних сайтах.

Ретровіруси – група РНК-вмісних вірусів, що містять зворотну транскриптазу; синтезована на основі мРНК вірусу ДНК може вбудовуватися у хромосому інфікованої вірусом клітини.

Рибоза – пентоза, що входить до складу РНК.

Рибозими – РНК, що володіють каталітичними властивостями.

Рибонуклеїнова кислота, РНК – нуклеїнова кислота, що складається з рибонуклеотидів. Розрізняють типи РНК: мРНК, тРНК, рРНК.

Рибосомна РНК, рРНК – РНК, що входить до складу рибосом.

Ризосфера – шар ґрунту, що близько розташований біля коренів рослин.

РНК-полімераза – фермент, що каталізує синтез РНК із рибонуклеотидтрифосфатів. Матрицею служить ДНК або РНК, відповідні РНК-полімерази називають ДНК- або РНК-залежними.

Сайт-специфічний (олігонуклеотид-направлений) мутагенез – внесення *in vitro* мутації в певний сайт клонованої нуклеотидної послідовності. Цей метод дозволяє ідентифікувати функціональні ділянки в молекулах білків й одержувати білки із заданими властивостями.

Саузерн-блоттинг – метод аналізу фрагментів ДНК. За допомогою рестриктаз ДНК розрізають на фрагменти, які піддають електрофорезу.

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

Секвенування – визначення нуклеотидної послідовності ДНК і РНК.

Сидерофор – низькомолекулярна речовина, що ефективно зв'язує залізо. Синтезується мікроорганізмами, що мешкають у ґрунті.

Симбіоз – взаємовигідне співіснування різних організмів.

Соматична клітина – нестатева клітина багатоклітинного організму.

Стовбурова клітина – це недиференційована клітина, що здатна до перетворення у спеціалізовані клітини організму.

Структурні гени – ділянки генома, що кодують РНК чи білок.

T-ДНК – фрагмент Tі-плазмід, що вбудовується в ядерну ДНК клітини-хазяїна. Спричиняє утворення пухлини (корончатого гала) у рослин.

Термофіли – мікроорганізми, що ростуть за температури вище 50°C. Деякі термофіли ростуть за температури 90 – 100°C.

Тимін – піримідинова азотиста основа, що входить до складу ДНК. Тимін комплементарний аденіну.

Tі-плазміда – плазміда ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, T-ділянка якої здатна включатися в ядерну ДНК.

Тотипотентність – властивість клітин реалізувати генетичну інформацію ядра, яка забезпечує їх диференціацію, а також розвиток до цілого організму тотипотентних запліднених яйцеклітин.

Трансгенез – введення чужорідного гена в рослинну чи тваринну клітину.

Трансгенний організм – організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал.

Трансдукція – перенесення генетичного матеріалу з однієї бактеріальної клітини в іншу за допомогою бактеріофага.

Транскриптома – сукупність усіх видів РНК клітини.

Транскрипція – процес синтезу мРНК на основі ДНК.

Трансляція – процес синтезу білків на основі мРНК.

Трансплантація – пересадка тканини або органа в рослину, тварину і людину.

Транспортна РНК, тРНК – РНК, що транспортує амінокислоти до рибосом.

Трансфекція – процес уведення ДНК бактеріофагів у клітини.

Трансформація – зміна спадкових властивостей клітини внаслідок проникнення в неї чужорідної ДНК.

Урацил – піримідинова азотиста основа, що входить до складу РНК. Урацил комплементарний аденіну.

Ферменти – біологічні каталізатори білкової природи.

Фертильність – здатність організмів давати життєздатне потомство.

Фізична карта генів – розташування генів на хромосомі. На такій карті відстані вимірюються в числі пар нуклеотидів.

Фіксація азоту – перетворення атмосферного азоту на аміак. Цей процес каталізує фермент нітрогеназа, що виявлений лише у прокариот.

Фітопатогени – організми (гриби, бактерії, віруси), що спричиняють захворювання рослин.

Фіторемедіація – використання рослин для очищення довкілля від хімічних забруднень.

Фолдинг – процес набування білком просторової структури.

Хемосинтез – тип живлення бактерій, що базується на засвоєнні CO₂ за рахунок окиснення неорганічних сполук.

Химера – організм, що містить клітини, тканини й органи різних організмів.

Хітиназа – фермент, що гідролізує хітин клітинної стінки грибів, синтезується рослинами і деякими бактеріями у відповідь на зараження патогенними грибами.

Хромосома – надмолекулярна структура клітинного ядра, основу якої утворює конденсована молекула ДНК; носій генетичної інформації.

Цитозин – піримідинова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот. Цитозин комплементарний гуаніну.

Цитокініни – фітогормони, що індукують поділ клітин.

Чисті лінії – організми, гомозиготні за ознаками.

Штам – культура генетично однорідних мікроорганізмів.

Штучна бактеріальна хромосома – векторна система на основі F-плазмиди *E.coli*, використовується для клонування довгих (100 – 300 тис. п. н.) послідовностей.

Штучна хромосома людини – хромосома, що утворена шляхом об'єднання теломери, центромери і ділянок геномної ДНК людини.

Штучна хромосома на основі дріжджів – рекомбінантна ДНК, що складається з плазмиди, центромерних і теломерних ділянок хромосом дріжджів, маркерних генів.

Штучна хромосома P1 – векторна система на основі фага P1, використовується для введення у клітини *E.coli* нуклеотидних послідовностей довжиною 100 – 300 тис. п. н.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галяс В. Л. Біохімічний і біотехнологічний словник / В. Л. Галяс, А. Г. Колотницький. – Львів : Оріяна-Нова, 2006. – 468 с.
2. Гвоздяк П. І. 50 запитань і 49 відповідей з нової біотехнології очистки води / П. І. Гвоздяк. – К. : Знання, 1990. – 28 с.
3. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
4. Дмитренко Г. Н. Биотехнология очистки высококонцентрированных сточных вод от органических растворителей / Г. Н. Дмитренко, П. И. Гвоздяк // Химия и технология воды. – 2002. – 24, № 2. – С. 185 – 190.
5. Лещинская И. Б. Современная промышленная микробиология / И. Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 14 – 18.
6. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2004. – Т. 1 : Генная и белковая инженерия. – 526 с.
7. Россихин В. В. Биотехнология : введение в науку будущего / В. В. Россихин. – Харьков : Колорит, 2005. – 288 с.
8. Сергієнко В. Перспективи вітчизняних біотехнологій / В. Сергієнко // Урядовий кур'єр. – 2006. – 26 січня.
9. Складнев Д. А. Что может биотехнология? / Д. А. Складнев. – М. : Знание, 1990. – 48 с.
10. Уолкер Ш. Биотехнология без тайн / Ш. Уолкер. – М. : Эксмо, 2008. – 336 с.
11. Фаллер Д. М. Молекулярная биология клетки : руководство для врачей / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. – М. : Бином-Пресс, 2003. – 272 с.
12. Эллиот В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М. : МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002. – 446 с.
13. <http://www.ncbi.nih.gov> – сайт центру біотехнологічної інформації (Center for Biotechnology Information – NCBI).
14. <http://biotech.nature.com> – сайт журналу «Nature Biotechnology».
15. <http://www.biotechnolog.ru> – електронний навчальний посібник Н.А. Кузьміної «Основы биотехнологии».

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

А

Абзими 65, 156
Аденін 156
Аеробні організми 156
Амінокислоти 123 – 124
Ампліфікація 27, 156
Анаеробні організми 156
Антибіотики 156
Антигени 97, 156
Антитіло 95, 156
Ауксини 48, 156
Ауткросинг 56, 156
Аутологічні клітини 102, 156

Б

Бактеріофаг 17 – 18, 156
Бакуловірус 51, 156
Білок одноклітинних організмів 114, 156
Біоаккумуляція 157
Біодеградація 142, 157
Біоелектроніка 134
Біоенергетика 148
Біоконтроль 157
Біореактор 110, 157
Біосенсиори 134
Біофільтри 141
Бомбардування мікрочастинками 21, 38

В

Вакцини 97 – 99
Вектор 17, 36, 157
Вестерн-блоттинг 157
Вірулентність 51, 157
Віруси 39, 51, 67, 157

Вторинні метаболіти 126, 157

Г

Гамети 157
Гель-електрофорез 30 – 31
Гематопоетичні стовбурові клітини 87
Генетичний код 7, 157
Генна діагностика 99 – 101
Генна імунізація 157
Генна інженерія 13, 34, 52, 158
Генна терапія *ex vivo* 102 – 103, 158
Генна терапія *in vivo* 103 – 104, 190
Геном 8, 31 – 33, 158
Геномна бібліотека 158
Генотип 100 – 101
Ген-репортер 158
Гербіцид 40 – 41, 56
Гетеромерний білок 158
Гібридизація 21, 100, 158
Гібридоми 81, 95 – 96, 158
Глікозилювання 24, 158
Гомозиготність 158
Гомомерний білок 158
Гормони 48, 126 – 128
Гуанін 158

Д

Дезоксирибоза 30, 158
Денатурація ДНК 28, 159
Дидезоксинуклеотид 30, 159
Диплоїд 67, 159
Дисульфідний зв'язок 159
ДНК-діагностика 100 – 101
ДНК-зонди 100 – 101
ДНК-лігаза 15, 159

ДНК-полімераза 15, 159
ДНК-полімераза Таq 28, 159
Домінантність 159

Е

Екзон 159
Експлантація 159
Експланти 77
Експресія генів 159
Електропорація 20 – 21, 38, 159
Електрофорез 30, 159
Ембріональні стовбурові клітини 85 – 86, 159
Еукаріоти 10, 24, 67, 159
Ефективність трансформації 20, 159

Є

Ємність вектора 18 – 19, 160

З

Замісна терапія 160
Зворотна транскриптаза 23, 160
Зигота 86

І

Імунітет 98, 126
Імуноафінна хроматографія 160
Імуноглобуліни 95
Імунодіагностика 96
Імунотерапія 95 – 96, 160
Імуноферментний аналіз 120
Індоліл-3-оцтова кислота 48, 160
Інсектициди 49 – 51, 160
Інсулін 8, 87, 127
Інтерлейкіни 96, 160
Інтерферони 126, 160
Інтрон 23, 101, 160

К

Калус 70, 160
Капсид 160, 163
Клітини зародкової лінії 53, 160
Клітинна інженерія 67, 70, 160
Клітинні лінії 9, 67 – 68, 160
Клон 22, 82, 160
Клонування генів 22, 161
Кодон 62, 161
Комплементарна ДНК, кДНК 23, 161
Корончатий гал 36, 161
Косміди 17, 19, 161
Коферментація 161
Ксенобіотики 142 – 144, 161
Культивування клітин 67 – 69, 80 – 81
Культури клітин 25, 67 – 70, 74, 80 – 81

Л

Лігнін 146
Лізін 42, 113, 123
Літичний цикл 161
Локус 19, 161

М

Макрофаг 161
Матрична РНК, мРНК 23, 26, 161
Мезофіли 161
Меристема 70, 161
Метаболічне перевантаження 162
Мікроін'єкція 20 – 21, 38, 162
Мікрочип 31
Міцелій 51, 112, 162
Мобільний генетичний елемент 162
Молекулярна діагностика 99, 162

Моноклональні антитіла 95 – 96,
162
Мутагенез 61 – 63, 162
Мутагени 63, 162
Мутант 162
Мутації 61 – 63, 103, 162

Н

Направлений мутагенез 63
Невірусні системи доставки генів
103
Неперервна ферментація 111, 162
Нітрогеназа 45
Нуклеозид 162
Нуклеотид 17

О

Онкогени 81, 162
Опіни 37, 162

П

Паліндром 16, 162
Первинна культура 67, 162
Періодична ферментація 111, 163
Періодична ферментація з
додаванням субстрату 111, 163
Плавлення ДНК 28, 163
Плазміди 17 – 18, 163
Полівалентна вакцина 163
Полігідроксиалканоати 130 – 131
Поліедрин 163
Полімеразна ланцюгова реакція,
ПЛР 27 – 30, 163
Посттрансляційна модифікація 24,
163
Праймер 28, 31, 163
Проект «Геном людини» 31 – 32,
163

Прокаріоти 24, 163
Протеїнази 117 – 118, 163
Протеоліз 24, 163
Протоксин *Bacillus thuringiensis*
38 – 39
Протопласт 75 – 76, 163
Процесинг 163

Р

Рекомбінантна ДНК 25, 20, 163
Рекомбінантний білок 92 – 94, 164
Ренатурація ДНК 28, 164
Реплікація 164
Репортні гени 21
Репресія 164
Рестриктаза 14 – 15, 164
Ретровіруси 164
Рибоза 30, 164
Рибозими 103, 164
Рибосомна РНК 164
РНК-полімераза 164

С

Сайт-специфічний мутагенез 63,
164
Саузерн-блоттинг 164
Секвенування 30 – 32, 164
Сидерофори 47, 164
Симбіоз 45 – 46, 95, 164,
Синтез генів 16 – 17, 29
Синтезатори ДНК 16
Системи ДНК-діагностики 99 – 100
Скринінг 54
Соматичні клітини 81 – 82, 164
Соматотропін 54, 127 – 128
Спадкові захворювання 99 – 100
Стійкість рослин
– до вірусів 39 – 40

- до гербіцидів 40 – 41
- до комах-шкідників 38 – 39
- до сольового стресу 41
- до фітопатогенних грибів і бактерій 40
- Стовбурові клітини 84 – 90, 165
- Структурні гени 165

Т

- Т-ДНК 36 – 37, 189, 165
- Термофіли 165
- Технологія рекомбінантних ДНК 13
- Тіонові бактерії 132 – 133
- Ті-плазмідни 36 – 38, 165
- Тимін 23, 165
- Тотипотентність 71, 165
- Трансгенез 165
- Трансгени 52 – 54
- Трансдукція 165
- Транскриптома 165
- Транскрипція 165
- Трансплантація 84 – 85, 89, 165
- Транспортна РНК, тРНК 26, 165
- Трансфекція 20, 165
- Трансформація 20 – 21, 165

У

- Урацил 15, 165
- Утилізація
 - побутових відходів 146
 - рослинної біомаси 146 – 147

Ф

- Ферментація 109 – 111
- Ферменти 14, 117 – 121, 165
- Фертильність 165
- Фізична карта генів 32, 165

Фіксація азоту 44 – 45, 166

Фітопагени 40, 166

Фіторемедіація 145, 166

Фолдинг 24, 166

Х

Хемосинтез 166

Химера 166

Хітиназа 40, 48, 166

Холестеролоксидаза 39

Ц

Целюлоза 146 – 147

Цитозин 15, 166

Цитокініни 48, 78, 166

Ч

Чисті лінії 166

Ш

Штам 108 – 109, 143, 166

Штучні хромосоми

– бактерій 17, 19, 166

– бактеріофагів 17, 19, 166

– дріжджів 17, 19, 166

– ссавців 17, 19, 166

Я

Ядро 52, 82 – 83, 86

Яйцеклітини 52, 82 – 83, 86

Навчальний посібник

Іншина Наталія Миколаївна

Біотехнологія

Для студентів біологічних спеціальностей
вищих навчальних закладів III – IV рівнів акредитації

Суми: Вид-во СумДПУ, 2009 р.
Свідоцтво ДК № 231 від 02.11.2000 р.

Відповідальна за випуск *А.А. Сбруєва*
Комп'ютерний набір *Н.М. Іншина*
Комп'ютерна верстка *І.Є. Трифонова*

Здано в набір 27.11.09. Підписано до друку 29.12.09.
Формат 60x84x16. Гарн. Times. Друк. ризогр. Папір офсет.
Умовн. друк. арк. 9,9. Обл.-вид. арк. 9,3. Тираж 100. Вид. № 91.

Видавництво СумДПУ ім. А.С. Макаренка
40002, м. Суми, вул. Роменська, 87

Виготовлено у видавництві
СумДПУ ім. А.С. Макаренка