

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

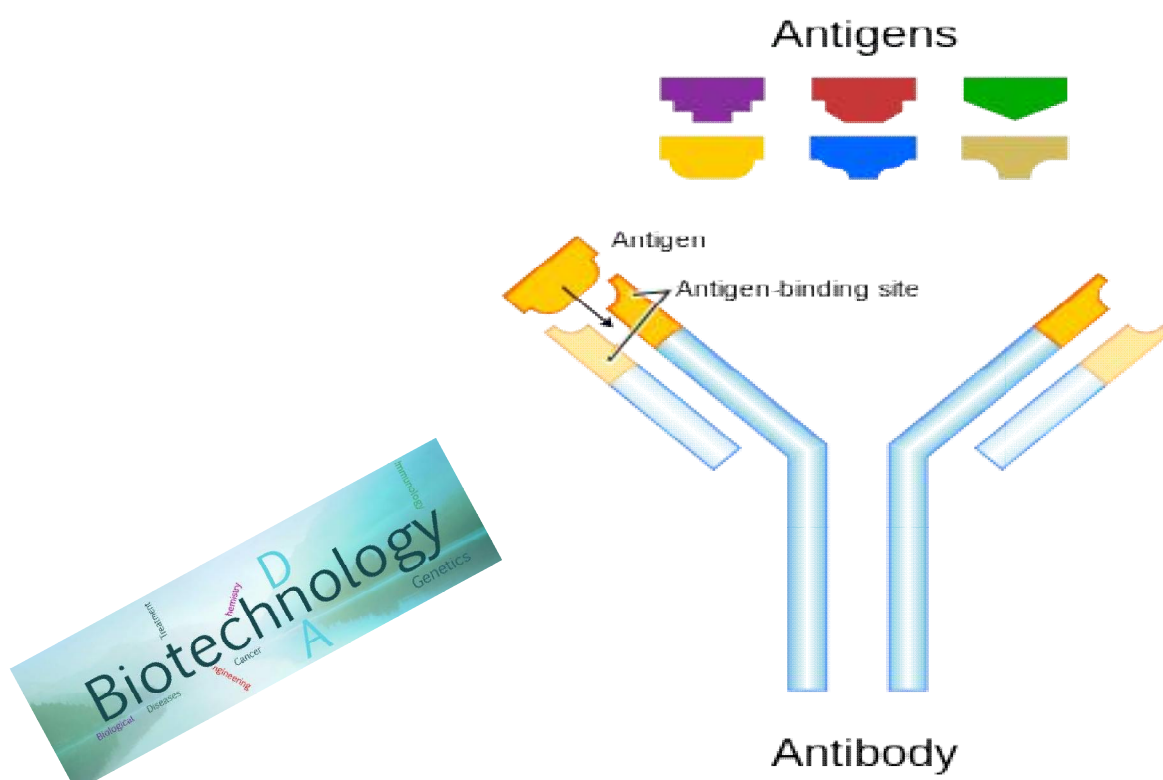
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

БІОТЕХНОЛОГІЯ

**методичні рекомендації для виконання
лабораторно-практичних робіт
для здобувачів вищої освіти СВО «бакалавр»
спеціальності 204 «ТВППТ»**



**Миколаїв
2019**

УДК 636.082.2
Б63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “ ” _____ р., протокол №__.

Укладач:

О. І. Юлевич – канд. техн. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету

Рецензенти:

О. А. Горбенко – канд. техн. наук, доцент, завідувач кафедри механізації та електрифікації с.-г. виробництва Миколаївського національного аграрного університету

С. П. Кот – канд. біол. наук, доцент, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

З М І С Т

ВСТУП	4
Лабораторна робота 1. Розшифрування генетичної інформації	5
Лабораторна робота 2. Механізми експресії ДНК	12
Лабораторна робота 3. Будова рестрикційних карт і методи секвенування ДНК	16
Лабораторна робота 4. Вектори для будови рекомбінантних ДНК	27
Лабораторна робота 5. Створення, ампліфікація і скринінг геномних бібліотек	31
Лабораторна робота 6. Лікарські засоби проти ВІЛ	38
Лабораторна робота 7. Створення вакцин нового покоління	41
Лабораторна робота 8. Отримання трансгенних тварин	43
Лабораторна робота 9. Напрями використання сільськогосподарських ГМ-тварин	49
Лабораторна робота 10. Клітинна інженерія. Моноклональні антитіла	55
Лабораторна робота 11. Ембріоінженерія. Кріоконсервація ембріонів	59
Лабораторна робота 12. Отримання монозиготних близнюків. Культивування ембріонів <i>in vitro</i>	70
Лабораторна робота 13. Клонування тварин. Методи регулювання статі тварин, визначення статі ранніх ембріонів	75
Лабораторна робота 14. Партеногенез, його види. Отримання химерних тварин	81
Лабораторна робота 15. Біоконверсійні технології	87
Список використаної літератури	94

ВСТУП

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:

«Червона» біотехнологія – виробництво біофармацевтичних препаратів, а також корекція генетичних дефектів.

«Зелена» біотехнологія – розробка і введення генетично модифікованих рослин у культуру.

«Біла» біотехнологія – виробництво біопалива, ферментів і біоматеріалів для різних галузей промисловості.

Академічні та урядові дослідження (наприклад, розшифрування генома деяких організмів).

Практичні досягнення біотехнології використовуються в медицині, екології, сільському, лісовому 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 за 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.

Лабораторна робота 1. Розшифрування генетичної інформації

Більшість генів містять в закодованому вигляді інформацію про синтез білків. Основною структурною одиницею білків є амінокислоти. Усі амінокислоти мають подібну хімічну будову і розрізняються лише боковим ланцюгом (R-групою). Існує 20 різних бокових груп і, відповідно, 20 амінокислот. В таблиці 1 наведено одно- і трилітерне позначення амінокислот.

Таблиця 1

Амінокислоти та їх позначення

Амінокислота	Трилітерне позначення	Однолітерне позначення
Аланін	Ala	A
Аргінін	Arg	R
Аспарагін	Asn	N
Аспарагінова кислота	Asp	D
Валін	Val	V
Гістидин	His	H
Гліцин	Gly	G
Глутамін	Gln	Q
Глутамінова кислота	Glu	E
Ізолейцин	Iso	I
Лейцин	Leu	L
Лізін	Lys	K
Метіонін	Met	M
Пролін	Pro	P
Серін	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонін	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенілаланін	Phe	F
Цистеїн	Cys	C

Кожна амінокислота кодується в ДНК групою нуклеотидів, яка має назву триплет. Вважаючи, що у білку 20 амінокислот, а у молекулі ДНК всього чотири типи нуклеотидів, кодон повинен складатися як найменш з трьох нуклеотидів. В цьому випадку можливо 64 (4^3) тринуклеотидних комбінації, а цього достатньо для кодування усіх амінокислот білка. Три кодони – UGA, UAG, UAA – це стоп-кодони, а один – AUG – старт-кодон, який кодує ще і амінокислоту метіонін (табл. 2). Якщо кодон AUG знаходиться не на початку молекули іРНК (матричної, або інформаційної РНК), а всередині неї, то під час елонгації він зчитується рибосомою за участю тРНК (транспортної РНК) та комплексу ферментів у вигляді метіоніну.

Таблиця 2

**Генетичний код і частота використання різних кодонів у геномі
E.coli та *Homo Sapiens***

Кодон	Амінокислота	Частота використання		Кодон	Амінокислота	Частота використання	
		<i>E.coli</i>	<i>Homo Sapiens</i>			<i>E.coli</i>	<i>Homo Sapiens</i>
GGG	Гліцин	0,13	0,23	UAG	Стоп	0,09	0,17
GGA	Гліцин	0,09	0,26	UAA	Стоп	0,62	0,22
GGU	Гліцин	0,38	0,18	UAU	Тирозин	0,53	0,42
GGC	Гліцин	0,40	0,33	UAC	Тирозин	0,47	0,58
GAG	Глутамінова кислота	0,30	0,59	UUU	Фенілаланін	0,51	0,43
GAA	Глутамінова кислота	0,70	0,41	UUC	Фенілаланін	0,49	0,57
GAU	Аспарагінова кислота	0,59	0,44	UCG	Серін	0,13	0,06
GAC	Аспарагінова кислота	0,41	0,56	UCA	Серін	0,12	0,15
GUG	Валін	0,34	0,48	UCU	Серін	0,19	0,17
GUA	Валін	0,17	0,10	UCC	Серін	0,17	0,23
GUU	Валін	0,29	0,17	AGU	Серін	0,13	0,14
GUC	Валін	0,20	0,25	AGC	Серін	0,27	0,25
GCG	Аланін	0,34	0,10	CGG	Аргінін	0,08	0,19
GCA	Аланін	0,22	0,22	CGA	Аргінін	0,05	0,10
GCU	Аланін	0,19	0,28	CGU	Аргінін	0,42	0,09
GCC	Аланін	0,25	0,40	CGC	Аргінін	0,37	0,19
AAG	Лізін	0,24	0,60	AGG	Аргінін	0,03	0,22
AAA	Лізін	0,76	0,40	AGA	Аргінін	0,04	0,21
AAU	Аспарагін	0,39	0,44	CAG	Глутамін	0,69	0,73
AAC	Аспарагін	0,61	0,56	CAA	Глутамін	0,31	0,27
AUG	Метіонін, старт	1,00	1,00	CAU	Гістидин	0,52	0,41
AUA	Ізолейцин	0,07	0,14	CAC	Гістидин	0,48	0,59
AUU	Ізолейцин	0,47	0,35	CUG	Лейцин	0,55	0,43
AUC	Ізолейцин	0,46	0,51	CUA	Лейцин	0,03	0,07
ACG	Треонін	0,23	0,12	CUU	Лейцин	0,10	0,12
ACA	Треонін	0,12	0,27	CUC	Лейцин	0,10	0,20
ACU	Треонін	0,21	0,23	UUG	Лейцин	0,11	0,12
ACC	Треонін	0,43	0,38	UUA	Лейцин	0,11	0,06
UGG	Триптофан	1,00	1,00	CCG	Пролін	0,55	0,11
UGU	Цистеїн	0,43	0,42	CCA	Пролін	0,20	0,27
UGC	Цистеїн	0,57	0,58	CCU	Пролін	0,16	0,29
UGA	Стоп	0,30	0,61	CCC	Пролін	0,10	0,33

Носій генетичної інформації повинен задовольняти дві основні вимоги: відтворюватися (*реплікуватися*) з високою точністю і *детермінувати* (кодувати) синтез білкових молекул. Модель ДНК Уотсона-Крика повністю відповідає цим вимогам. По-перше, згідно з принципом комплементарності, кожен ланцюг ДНК може слугувати матрицею для утворення нового комплементарного ланцюга. Отже, після одного раунду реплікації утворюються дві дочірні молекули, кожна з яких має таку ж нуклеотидну послідовність, як початкова молекула ДНК. По-друге, нуклеотидна послідовність структурного гена однозначно задає амінокислотну послідовність білка, яку вона кодує.

Механізм реплікації був запропонований Дж. Уотсоном і Ф. Криком – авторами теорії подвійного ланцюга ДНК. Він передбачає розплітання двох ланцюгів ДНК таким чином, щоб кожен з них міг слугувати матрицею для збірки іншого ланцюга відповідно принципу комплементарності. На матричному, або батьківському ланцюзі поодинокі нуклеотиди вишиковуються певним чином, а їх наступна полімеризація призводить до утворення нового, або дочірнього ланцюга (*репліки*), комплементарного першому.

Запропонований механізм реплікації був названий напівконсервативним, оскільки кожна з ідентичних одна до одної дочірніх молекул складається з одного старого і одного нового ланцюга ДНК.

Механізм реплікації повинен забезпечувати безпомилкове копіювання матриці. Включення в новий ланцюг ДНК некомплементарних нуклеотидів викликає виникнення мутацій, які можуть спричинити генетичні зміни, що порушують структуру і функції генетичного матеріалу. Наслідки таких мутацій відображаються негативно, а інколи й згубно на житті клітини і всього організму.

Для запобігання помилкового парування ДНК-полімерази володіють здатністю до самокорекції. Коригувальний механізм полягає в тому, що перед приєднанням кожного наступного нуклеотида до ростучого ланцюга, ДНК фермент «перевіряє» правильність парування попереднього нуклеотида. Якщо нуклеотиди спаровані вірно (відповідно до принципу комплементарності), полімераза приєднує наступний нуклеотид, який згодом також буде перевірений. У випадку помилки парування, «невірний» нуклеотид відщеплюється від ланцюга ДНК. Потім перевіряється попередній перед вирізаним нуклеотид і так далі. Вирізання нуклеотидів здійснюється завдяки тому, що ДНК-полімераза володіє крім полімеразної ще й 3'→5'-екзонуклеазною активністю. Коли полімераза відщепить неспарений нуклеотид або декілька нуклеотидів і дійде до нормально спарених нуклеотидів, відновлюється її полімеразна активність, і синтез ДНК продовжується до виявлення чергової дефектної пари.

Наявність у фермента коригувальної здатності передбачає, що для ініціації реплікації на матриці йому необхідна хоча б коротка ділянка дволанцюгової ДНК, з якої починається синтез комплементарного ланцюга. Така ділянка називається *праймером*, або запалом.

Для синтезу лідируючого ланцюга, який триває безперервно, праймер необхідний лише на початку полімеразної реакції. Полімераза, що здійснює

синтез відстаючого ланцюга, потребує праймер перед синтезом кожного фрагмента. Існує спеціальний фермент, що синтезує праймери. Він називається РНК-праймаза і створює короткі РНК-праймери довжиною біля 10 нуклеотидів. Після синтезу фрагментів Оказаци праймер треба видаляти.

Для видалення праймерів і забудови створених проломів починає діяти особлива система *репарації* (відновлення) ДНК. Основна роль в цьому належить ДНК-полімеразі I *E.coli* і аналогічним ферментам інших організмів. ДНК-полімераза I можна розглядати як два ферменти на одному поліпептидному ланцюзі. Перший називається *фрагментом Кленова* і володіє полімеразною і коригувальною (3'→5'-екзонуклеазною) активністю. Інший фермент здатний відщеплювати нуклеотиди в напрямку 5'→3', тобто в напрямку синтезу ДНК. Ця 5'→3'-екзонуклеазна активність і надає можливість видаляти праймер.

У генах закодована інформація про білки, що синтезуються в клітині. Однак сама ДНК не використовується в якості безпосередньої матриці для синтезу білка. Реалізація генетичної інформації становить двостадійний процес. На першій стадії ген слугує матрицею для синтезу молекул РНК, на які досконало *транскрибується* (перепишується) послідовність нуклеотидів відповідного гена і, отже, інформація про послідовність амінокислот, що закодована в ньому. На другій стадії нуклеотидна послідовність РНК *транслюється* (перекладається) у поліпептидний ланцюг.

РНК – це лінійна полінуклеотидна молекула, що відрізняється від ДНК у двох позиціях. По-перше, моносахаридом у РНК є рибоза, що містить не одну, а дві гідроксильні групи; вони пов'язані з 2'- і 3'-атомами вуглецю. По-друге, однією із чотирьох основ у РНК є урацил (U), що займає місце тиміну. Більшість молекул РНК одноланцюгові, хоча часто в них є взаємокомплементарні ділянки, що утворюють дволанцюгові структури – «шпильки». Спарювання основ відбувається таким чином, як і в ДНК, за винятком того, що замість пари А-Т утворюється А-U.

Матрицею при синтезі РНК служить певна ділянка одного з ланцюгів ДНК. РНК-полімераза копіює цю ділянку, послідовно з'єднуючи рибонуклеотиди один з одним за допомогою 3'→5'-фосфодіефірних зв'язків відповідно до правила комплементарності. Транскрипція починається після приєднання РНК-полімерази до специфічної нуклеотидної послідовності – *промотора*. Завершується транскрипція коли РНК-полімераза досягає послідовності стоп-сигналу, або сигналу *термінації* транскрипції. Ділянка ДНК, що обмежена промотором і стоп-сигналом, становить одиницю транскрипції – *транскриптон*. Розбивка ДНК на множини транскриптонів забезпечує можливість незалежного зчитування різних генів, їх індивідуального включення і вимикання.

У ході транскрипції новосинтезована молекула РНК від'єднується від ДНК і подвійна спіраль ДНК відновлюється. Щоб забезпечити транскрипцію тільки окремих сегментів ДНК, повинні існувати якісь сигнальні послідовності, що вказують, де починається (*ініціюється*) транскрипція й де вона зупиняється (*термінується*). Сигнал ініціації звичайно розташовується перед

послідовністю, що кодує, а сигнал термінації – слідом за нею. Ділянка ДНК, що передує гену, який транскрибується, називається 5'-фланкуючою послідовністю, а розташована за ним - 3'-фланкуючою.

Завдання

1. Заповнить пропуски у наступних твердженнях:

А. Поєднання трьох нуклеотидів, що розміщені поряд, формує _____

Б. Кожен триплет нуклеотидів, або _____, визначає включення в поліпептидну структуру _____.

В. Для генетичного коду характерна така особливість, як _____ – це означає, що кілька _____ кодують _____.

Г. Реалізація генетичної інформації становить _____ процес. На першій стадії ген слугує матрицею для синтезу молекул _____, на які досконало _____ (зчитується) послідовність нуклеотидів відповідного гена. На другій стадії нуклеотидна послідовність _____ (перекладається) у поліпептидний ланцюг.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Кодони не здатні перекриватися; це означає, що залежно від точки старту можливий один варіант зчитування генетичної інформації.

Б. Якщо для зчитування використовується лише одна рамка, то при додаванні або відокремленні одного або двох нуклеотидів відбувається зсув «рамки зчитування». При цьому нуклеотидна послідовність у новій рамці залишається попередньою.

В. РНК - це лінійна полінуклеотидна молекула, що відрізняється від ДНК у двох позиціях. По-перше, моносахаридом у РНК є рибоза, що містить не одну, а дві гідроксильні групи; вони пов'язані з 2'- і 3'-атомами вуглецю. По-друге, одним із чотирьох основ у РНК є урацил (U), що займає місце тиміну.

Г. Існують три основних типи РНК: інформаційна, або матрична (мРНК), яка слугує матрицею для синтезу білка; транскрипційна (тРНК), за допомогою якої амінокислоти транскрибуються; рибосомна (рРНК) - необхідний компонент рибосом.

Д. Транскрипція починається після приєднання РНК-полімерази до специфічної нуклеотидної послідовності – промотора. Завершується транскрипція коли РНК-полімераза досягає послідовності стоп-сигналу, або сигналу термінації транскрипції.

3. Враховуючі дані, що наведені у таблицях 1 і 2 складіть:

А. Найбільш вірогідну нуклеотидну послідовність, яка кодує наступну амінокислотну послідовність

Для *Homo Sapiens*:

1. LSERPQVNAS;
2. MKIYTVAFGD.

Для *E.coli*:

1. FGKYTIWQAS;
2. DNMVCLKPSY.

Для запису нуклеотидної послідовності необхідно вказати регулюючі елементи – на початку ланцюга: промотор, оператор, старт-кодон; на при кінці – стоп-кодон.

Б. Якій амінокислотній послідовності відповідає наступна нуклеотидна послідовність? Для розв'язання завдання необхідно врахувати наступні позначення:

UGA, UAG, UAA - стоп (термінус)

AUG - старт (сайт ініціації)

AACUG – сайт зв'язку (промотор)

Між промотором і сайтом ініціації обов'язково існує оператор, послідовність з 5 нуклеотидів (наприклад **AAUUG**). В тому випадку, коли стоп-кодон існує поряд зі старт-кодоном, синтезується набір окремих білків. Якщо старт-кодону нема, спостерігається нонсенс-мутація і наступний білок не синтезується.

AACUGAAUUGAUGGGCGAGGACGUGGCGGCUAAGAACUAAAUGUUG
CCGCGUAGUUUCUACUAG

AACUGAAGUGAUGAUCCCAUUACAUCGUAGCUGAAUGUCUUUCAUAAC
GACUAAGUAG

AACUGACUUGAUGCCCUGUUGGAUCAAGCCUGAAUGCACAGAAGUUU
CUUUUAA

AACUGAUUUGAUGGGGCAACUUUUGCCGUCCAUUAUAAUUAAGACG
AUACACAAAUUAUAA

4. Існує наступна молекула ДНК:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
А. TAC	ATG	ATC	TCA	ATT	TGA	AAT	TTC	TAG	CAT	GTA
Б. ATG	TAC	TAG	AGT	TAA	ACT	TTA	AAG	ATC	GTA	CAT,

Цифрами позначений порядок триплетів, а буквами А і Б окремі ланцюги молекули ДНК. Відомо, що ця ДНК забезпечує синтез поліпептиду з п'яти (5) амінокислот. Який ланцюг ДНК, з якого кодону і в якому напрямку повинен транскрибуватися?

5. Складіть таблицю за наданим зразком (табл. 3), заповніть її і вкажіть 5' і 3'-кінці для молекули ДНК, мРНК і тРНК.

Таблиця 3

Будова ділянки ДНК і відповідні їй мРНК, тРНК і білок

С												Дволанцюгова ДНК
						Т	Г	А				
	С	А			U							мРНК
									Г	С	А	Антикодон тРНК
			Триптофан									Амінокислота, у складі білку

6. За допомогою таблиці генетичного коду визначіть, які зміни відбудуться в послідовності амінокислот у білку, якщо до 3'-кінця мРНК додати урацил? (Вважається, що для початку трансляції не потрібний кодон AUG).

5' – CAG UCG GAA CCA CGA GAU AAG CAU - 3'

Як зміниться послідовність амінокислот у білку, якщо до 5'-кінця мРНК додати аденін?

7. За допомогою генетичного коду надайте відповіді на наступні питання:

А. Визначіть амінокислотну послідовність поліпептиду на підставі мРНК, враховуючи, що лише кодон AUG є ініціюючим:

5'- AUG UUC AAG AUG GUG ACU UGG UAA - 3'

Б. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо перший нуклеотид G замінити на С?

В. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо перший нуклеотид С замінити на U?

Г. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо перший нуклеотид С замінити на G?

Д. Якою буде амінокислотна послідовність поліпептиду якщо останній нуклеотид G замінити на А?

Слова для словника: кодон, компліментарність, термінація, промотор, реплікація, репарація, праймер, рекомбінантні ДНК, експресія, правило виродження.

Контрольні запитання

1. В чому різниця між ДНК і РНК?
2. На підставі чого визначена загальна кількість кодонів?
3. Що таке правило виродження, яке значення воно має для експресії генів?
4. В чому різниця будови генів прокариот і еукаріот?
5. Яку функцію в процесі експресії генів виконує ділянка термінусу?
6. В чому полягає основна догма молекулярної біології?

7. Чому модель ДНК Уотсона–Крика відповідає вимогам, що надаються до носія генетичної інформації?
8. Які ферменти беруть участь у синтезі молекули ДНК?
9. Чому механізм реплікації має назву напівконсервативний?
10. Яка ділянка необхідна для початку синтезу дочірнього комплементарного ланцюга ДНК?
11. В чому полягає особливість функціонування фермента ДНК-полімерази I?

Лабораторна робота 2. Механізми експресії ДНК

З молекулярної точки зору ген складається з регулюючих і структурних елементів. Регулюючі – відповідають за порядок зчитування інформації, а структурні – за структуру білка (кінцевого продукту). У прокариот структурний ген – це безперервна ділянка молекули ДНК. Транскрипція починається після зв'язування РНК-полімерази з регулюючою ділянкою, а потім відбувається копіювання з першого гена до останнього, з утворення мРНК.

Первинна структура білка, що синтезується, визначається тільки інформацією, що існує в мРНК. Інші типи РНК, рибосоми, ферменти лише беруть участь у реалізації цієї інформації.

Було встановлено, що дія генів підлягає генетичному контролю. Сукупність суміжних структурних генів поряд з групою регуляторних генів складає одиницю генетичної регуляції – *оперон*. Відповідно моделі оперона хромосома містить як найменш 4 компоненти регулювання: структурний ген (або гени, що контролюють взаємозв'язані біохімічні функції S_1, S_2, S_3), ген-регулятор (R), ген-оператор (O), ген-промотор (P). Ген-регулятор визначає структуру білка репресора. Білок-репресор здатний зв'язуватися з геном-оператором (O), в цьому випадку процес зчитування інформації припиняється, оскільки РНК-полімераза не може пересуватися вздовж молекули ДНК. Ген-оператор (O) відповідає за порядок зчитування інформації, ген-промотор (P) є початковою ділянкою для зв'язування РНК-полімерази, ферменту, який каталізує транскрипцію ДНК в мРНК.

Якщо у середовище додати речовину-індуктор (Y), то білок репресор блокується, втрачає здатність з'єднуватися з геном-оператором і процес транскрипції здійснюється.

У тому випадку, коли необхідно, щоб експресія відбувалася постійно, проводять мутації в гені-регуляторі, тоді змінюється структура білка-репресора і він втрачає здатність зв'язуватися з геном-оператором, або мутацію здійснюють у гені-операторі, тоді білок-репресор не розпізнає його і зв'язок також не відбувається. Такі мутанти мають назву *конститутивні мутанти*.

В еукаріот значна кількість структурних генів складається з декількох дискретних кодуючих ділянок – *екзонів*, відділених некодуючими ділянками – *інтронами*. Транскрипція генів у еукаріот відбувається в ядрі клітини, що

сприяє утворенню мРНК-попередників, тобто про-мРНК, або гетерогенних ядерних мРНК.

Після завершення транскрипції структурного гена еукаріот інтрони вирізуються (*процесинг*) з первинного транскрипту, а екзони зшиваються один з одним (*сплайсінг*) з утворенням функціональної, або *зрілої мРНК*. Після закінчення сплайсінгу зріла мРНК, яка має значно менший розмір, ніж ядерна мРНК, надходить в цитоплазму клітини, де відбувається друга, заключна, стадія експресії гена – трансляція білка.

На відміну від генів прокариот, гени, що кодують білки еукаріот, не поєднані в оперони. Кожен еукаріотичний структурний ген має свій власний набір регуляторних елементів, як ті з яких починається процес зчитування інформації (промоторні), так і ті, завдяки яким синтез припиняється – термінатори транскрипції, або термінуси.

Завдання

1. Які з перерахованих елементів не входять до складу *Lac*-оперону *E.coli*?

- А. Гени, що кодують синтез регуляторного білка-репресора
- Б. Гени, що кодують синтез РНК-полімерази
- В. Промотор
- Д. Оператор

2. Які з перерахованих функцій виконує індуктор?

- А. Зв'язується із репресором і запобігає його приєднанню до промотора
- Б. Зв'язується із репресором і запобігає його приєднанню до оператора
- В. Зв'язується із промотором і запобігає приєднанню репресора до оператора
- Г. Зв'язується із оператором і запобігає приєднанню репресора до цього місця
- Д. Зв'язується із кодонами термінації й індукує подальший синтез білка.

3. Заповнить пропуски у наступних твердженнях:

- А. _____ каталізує синтез РНК-копії на ланцюзі ДНК при здійсненні процесу, який має назву _____
- Б. Синтез РНК починається на _____ ДНК і закінчується на особливій ділянці ДНК, що має назву _____
- В. _____ в тРНК, побудований таким чином, що його основи створюють пари з комплементарною послідовністю з трьох нуклеотидів, яка називається _____, в молекулі мРНК.
- Генетичний код називають _____, тому що більшість амінокислот представлена більше, ніж одним кодоном.
- Г. Конструювання _____ молекул здійснюється за допомогою ферментів, в першу чергу це ферменти _____, що розщеплюють нуклеотидні послідовності.
- Д. Для з'єднання фрагментів ДНК використовують фермент _____.

Е. Розрізання молекули ДНК навскіс створює _____ кінці, які _____ між собою.

4. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Напрямок руху РНК-полімерази залежить від зв'язування із промотором, а вибір матричного ланцюга від додаткових білкових факторів.

Б. В будь-якому місці подвійної спіралі молекули ДНК лише один ланцюг ДНК використовується як матриця.

В. В клітинах бактерій транскрипцію РНК всіх класів здійснює РНК-полімераза одного типу, в той час, як у клітинах еукаріот використовуються три різних типи РНК-полімераз.

Г. Під дією рестриктаз I типу відбуваються розриви у ланцюзі ДНК, що розташовані навскіс один від іншого, внаслідок чого створюються одноланцюгові комплементарні кінці, які використовують для будування рекомбінантних молекул.

Д. Обробка зразка ДНК певною рестриктазою I типу завжди дає один і той самий набір фрагментів – за умови, що розщеплення здійснюється по всіх сайтах розпізнавання.

Е. ДНК-лігаза бактеріофага T4 каталізує утворення фосфодієфірних зв'язків між кінцями полінуклеотидних ланцюгів, які вже утримуються разом завдяки з'єднанню липких кінців.

5. Один ланцюг ділянки ДНК, має наступну послідовність основ:

5' – GTAGCCTACCCATAGG - 3'.

А. Припустимо, що з цієї ДНК транскрибується мРНК, причому матрицею слугує комплементарний ланцюг. Яка буде послідовність мРНК?

Б. Який пептид буде синтезуватися, якщо трансляція починається точно із 5'-кінця цієї мРНК? (Припустимо, що стартовий кодон не потрібний).

В. Скільки пептидів кодує ця мРНК? Чи будуть синтезуватися такі ж пептиди, якщо матрицею для трансляції буде слугувати інший ланцюг ДНК?

Г. Припустимо, що ця послідовність ДНК транскрибується, як вказано в пункті А, але Вам не відомо, яка рамка зчитування використовується. Чи може ця ділянка ДНК належати початкові гена, його середині, його кінцю?

6. Перераховані різні матричні процеси за участю ДНК, РНК і білку:

1. ДНК → РНК

5. РНК → білок

2. ДНК → білок

6. Білок → ДНК

3. РНК → ДНК

7. Білок → РНК

4. ДНК → ДНК

Які з перерахованих процесів вірні?

Контрольні запитання

1. Які основні типи РНК існують?
2. У чому полягає різниця між РНК-полімеразами про- і еукаріот?
3. З яких генів складається модель оперона?
4. Які мутанти мають назву конститутивні; мутації в яких генах оперона викликають їх утворення?
5. Які регуляторні елементи процесу транскрипції існують в еукаріот?
6. Вкажіть за рахунок яких процесів утворюється зріла мРНК?
7. У чому полягає роль атенуаторів і енхансерів, на яких ділянках ДНК вони розміщені?
8. Які ферменти використовують у генетичній інженерії?
9. Які типи рестриктаз існують? Чим вони розрізняються?
10. Що таке сайт рестрикції?
11. У чому полягає перевага створення рекомбінантних ДНК за рахунок липких кінців?
12. Яку роль у створенні рекомбінантних ДНК виконують ДНК-лігази?
13. В якому випадку використовують ревертази?
14. Чим відрізняється клонована ДНК (кДНК) від звичайної ДНК еукаріот?

Лабораторна робота 3. Будова рестрикційних карт і методи секвенування ДНК

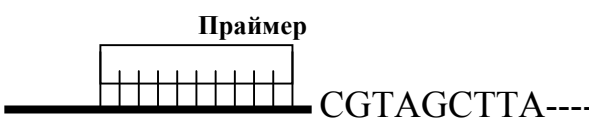
Обробка ДНК певною рестриктазою завжди дає однаковий набір фрагментів – за умови розщеплення по всіх сайтах рестрикції. Якщо використовувати однакові (клоновані) фрагменти ДНК і спочатку обробити ДНК кожною з рестриктаз окремо, а потім їх комбінацією, можливо побудувати фізичну карту даного фрагменту ДНК, тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції уздовж молекули. Розміри отриманих фрагментів визначають за допомогою гель-електрофорезу, принцип якого заснований на тому, що всі макромолекули мають певний електричний заряд, і коли через гель, де вони містяться, пропускають електричний струм, ділянки ДНК починають рухатись. Чим менший розмір молекул, тим швидше вони рухаються. Поступово вихідний препарат, який складався з різних макромолекул, розподіляється на зони. Для контролю відносної молекулярної маси розподілених фрагментів, одночасно здійснюють електрофорез маркерних молекул з відомою молекулярною масою. Відносна молекулярна маса дволанцюгових нуклеїнових кислот вимірюється у числі пар нуклеотидів (п.н.).

Для побудови рестрикційної карти необхідно порівняти розміри фрагментів, отриманих при рестрикції окремими ферментами і при рестрикції їх сумішшю. Результат такого порівняння наведено на рис.1.

Одним із способів *секвенування* (встановлення нуклеотидної послідовності ділянки гена) є так званий дидезоксинуклеотидний метод.

Дидезоксинуклеотид – це отриманий штучним шляхом нуклеотид, позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглецевих атомах цукрового кільця. Приєднання цього нуклеотиду до ланцюга ДНК що росте, зупиняє синтез ДНК. Зупинка синтезу ДНК – це ключовий етап дидезоксиметоду, але для того, щоб секвенування здійснилося в повному обсязі, необхідно дотримуватися ще декількох умов.

Перший крок стандартної процедури – це створення штучного олігонуклеотида довжиною 17-20 ланок і гібридизація його зі специфічною ділянкою одного з ланцюгів ДНК, яка знаходиться поряд з ділянкою, що визначається. Цей нуклеотид є праймером, що здійснює ініціацію синтезу нуклеотидних послідовностей комплементарних ділянці, що визначається, за рахунок постачання 3'-гідроксильної групи. Розчин з праймером розподіляють по чотирьох пробірках, в кожній з яких містяться по чотири дезоксинуклеотиди (dNTP), на підставі яких синтезується ланцюг ДНК, – dATP, dCTP, dTTP, dGTP, (один з них мічений ізотопом), і один з чотирьох дидезоксинуклеотидів (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP). Концентрацію кожного з dd-нуклеотидів підбирають таким чином, щоб він був включений по всіх позиціях в суміші ланцюгів, що ростуть (рис. 2).



Реакційна суміш	Праймер і довжина добуваної послідовності	Праймер і добувана послідовність
ddATP+ чотири dNTP	Праймер + 3 Праймер + 7 Праймер + 8	Праймер-dGdCddA Праймер-dGdCdAdTdCdGddA Праймер-dGdCdAdTdCdGdAddA
ddCTP+ чотири dNTP	Праймер + 2 Праймер + 5	Праймер-dGddC Праймер-dGdCdAdTddC
ddGTP+ чотири dNTP	Праймер + 1 Праймер + 6	Праймер-ddG Праймер-dGdCdAdTdCddG
ddTTP+ чотири dNTP	Праймер + 4 Праймер + 9	Праймер-dGdCdAddT Праймер-dGdCdAdTdCdGdAdAddT

Рис. 2. Ріст праймера при синтезі ланцюга в присутності дидезоксинуклеотидів

Необхідно пам'ятати, що після приєднання дидезоксинуклеотида ріст ланцюга одразу припиняється, тому кожен ланцюг закінчується 3'-дидезоксинуклеотидом. Після закінчення синтезу за участю ДНК-полімерази в кожній пробірці виявляється унікальний набір олігонуклеотидів, кожен з яких містить праймерну послідовність.

Далі в пробірки додають формамід, щоб забезпечити розходження ланцюгів, і проводять електрофорез у поліакриламідному гелі на чотирьох доріжках (по числу пробірок). Це дозволяє відокремити одноланцюгові фрагменти ДНК, навіть в тому випадку, коли вони розрізняються лише на один нуклеотид. На радіоавтографі виявляється набір смуг, що відповідає міченим фрагментам ДНК, зіставлення яких надає можливість безпосередньо “прочитати” нуклеотидну послідовність сегменту ДНК, який досліджувався. При встановленні нуклеотидної послідовності необхідно пам’ятати про правило компліментарності, відповідно до якого створюється новий ланцюг: А↔Т; G↔С. Найбільш “швидка” смуга (радіоактивно мічений фрагмент у самому низу гелю) відповідає найкоротшому фрагменту. В нашому прикладі (рис. 3.) це олігонуклеотид, що знаходиться на доріжці ddTTP.

ddATP	ddCTP	ddTTP	ddGTP	3'
—				T
	—			G
	—			G
		—		A
—				T
			—	C
			—	C
		—		A
—				T
	—			G
			—	C
		—		A
	—			G
			—	C
—				T
		—		A
			—	C
	—			G
		—		A
				5'

Рис.3. Схематичне зображення радіоавтографа, що створюється при секвенуванні ДНК за допомогою дидезокси-методу

Праймерна послідовність розташована на фіксованій відстані (10–20 нуклеотидів) від того сайту, по якому вбудована ДНК, що клонується; це дозволяє легко розпізнавати початок клонованого фрагменту.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

- А.** Ферменти _____ дозволяють перетворювати молекули ДНК великих розмірів у набір _____ довжиною від декількох сотень до декількох тисяч основ.
- Б.** Використання _____ для розділення _____ надає можливість отримувати _____.
- В.** Якщо використовувати декілька ферментів _____ і спочатку обробляти ДНК кожної з _____ окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати _____ даної ДНК.
- Г.** Визначивши розмір отриманих фрагментів за допомогою _____ можна знайти положення сайтів _____ (здійснити _____).
- Д.** _____ – визначення нуклеотидної послідовності. До основних методів _____ належать хімічний і ферментативний.
- Е.** В основі методу _____ лежить принцип _____ комплементарного ланцюга ДНК на одноланцюгової матриці.
- Є.** Основним моментом ферментативного _____ є _____ синтезу ланцюга, що будується.
- Ж.** _____ – це нуклеотиди позбавлені 2'- і 3'-гидроксильних груп при вуглецевих атомах цукрового кільця.
- З.** Подовження ланцюга здійснюється до того часу, коли замість _____ не приєднається _____.
- И.** Автоматичне _____ – це, в першу чергу, електрофоретичний розподіл мічених продуктів реакції _____ за допомогою спеціальних приладів – автоматичних _____.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

- А.** За допомогою методу електрофорезу в агарозному гелі фрагменти ДНК, що розрізняються за розмірами, можна розділити, а потім досліджувати кожен рестрикт окремо.
- Б.** Гель-концентрований розчин полімеру використовують для визначення нуклеотидної послідовності окремих фрагментів ДНК.
- В.** Молекулярну масу рестрикту можна визначити за допомогою каліброваної кривої, що була попередньо побудована при використанні ДНК з відомими молекулярними масами.
- Г.** Для побудови рестрикційних карт, необхідно порівняти розміри фрагментів, за умови, що розщеплення відбувається частково, під впливом кожної з рестриктаз окремо, і при рестрикції сумішню ферментів.
- Д.** Хімічне секвенування засновано на вибірковій хімічній деградації нуклеотидів. Для цього методу використовують дволанцюгову молекулу ДНК, на одному з кінців якої роблять радіоактивну мітку за допомогою ізотопу фосфору ^{32}P ; препарат міченої ДНК поділяють на чотири порції і

кожну обробляють реагентом, який специфічно руйнує одну або дві з чотирьох основ. Необхідно підібрати умови реакції таким чином, щоб на одну молекулу припадало лише декілька пошкоджень.

Е. В основі методу Сенгера лежить принцип денатурації ланцюга ДНК, при цьому відбувається термінація - припинення синтезу дочірнього ланцюга у різних місцях.

Є. Основним ферментом методу ферментативного секвенування є ревертаза. В присутності РНК-матриці, короткого полінуклеотидного праймеру і нуклеотидів за принципом компліментарності відбувається синтез другого ланцюга ДНК.

Ж. Оскільки обрив ланцюгу відбувається у випадкових місцях, то створюється набір фрагментів усіх можливих довжин, починаючи з праймеру до кінця фрагмента, що досліджується.

З. Використання флуоресцентних барвників, пов'язаних з нуклеотидами термінації, дозволяє проводити усі реакції в одній пробірці.

3. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *VamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoR1</i>	<i>VamH1</i>	<i>EcoR1</i> + <i>VamH1</i>
600 -----	850 -----	450 ----
450 -----	350 -----	400 ----
300 ----	150 -----	200 ----
		150 ----
		150----

4. Побудувати карту рестрикції ДНК, якщо під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *VamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

<i>EcoR1</i>	<i>VamH1</i>	<i>EcoR1</i> + <i>VamH1</i>
6500	5500	3500
4000	4500	3000
1000	1500	2500
		1500
		1000

5. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *VamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
2000	1800	1400
1200	900	800
300	800	600
		400
		300

6. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *BamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
11000	9500	7000
6500	9000	5000
2500	1500	4000
		2500
		1500

7. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *BamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
1250	1550	950
950	1000	650
450	100	600
		350
		100

8. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *BamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
2200	1900	1500
1400	1800	1400
800	700	700
		500
		300

9. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *BamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
850	950	650
550	650	400
350	150	350
		200
		150

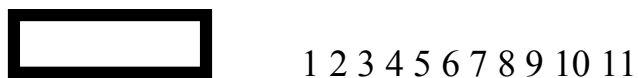
11. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *BamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
1800	1700	1300
1600	1500	1000
1300	1400	800
600	700	700
		600
		500
		400

12. Побудувати карту рестрикції ДНК, як що під час її гідролізу кожною з двох рестриказ *EcoR1* і *BamH1* утворюються три фрагмента, тобто початковий фрагмент має два сайти розпізнавання для кожної з рестриказ

EcoR1	BamH1	EcoR1 + BamH1
800	750	550
750	500	450
550	450	350
350	450	300
	300	250
		200
		200
		150

13. Визначити довжину і порядок добудованої за допомогою праймера послідовності :



ddA	Праймер + 4	ddG	Праймер +1
	Праймер + 5		Праймер +7
	Праймер + 10		Праймер +8
ddT	Праймер +6	ddC	Праймер +2
	Праймер +11		Праймер +3
			Праймер +9

17. Який з наведених праймерів може бути використаний для копіювання ланцюга ДНК наступного виду:

5' – ATGCCTAGGTC – 3'

- | | |
|---------------|---------------|
| 1. 5' - ATGCC | 4. 5' - GACCT |
| 2. 5' - TACGG | 5. 5' - GGCAT |
| 3. 5' - CTGGA | |

18. Який з наведених праймерів може бути використаний для копіювання ланцюга ДНК наступного виду:

5' - TCCGATGCTAGCTAA – 3'

- | | |
|---------------|---------------|
| 1. 5' - AATCG | 4. 5' - AGCCT |
| 2. 5' - TTAGC | 5. 5' - TCGGA |
| 3. 5' - TCCGA | |

19. Археологи знайшли тіло мамонта у кризі в зоні вічної мерзлоти. Виникло питання: яка ступінь гомології ДНК мамонта і ДНК існуючих індійських слонів? Відповідь на нього можна отримати двома способами: шляхом секвенування (колонка I) і гібридизацією (колонка II). Що необхідно зробити і в якій послідовності, щоб відповісти на поставлене питання? Відберіть необхідні заходи з наступного переліку і вкажіть їх у порядку здійснення.

1. Зробити аналіз каріотипу мамонта
2. Здійснити гідроліз ДНК мамонта і слона кислотою або лугами
3. Зробити полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) ДНК мамонта
4. Виділити з клітин ДНК мамонта і слона
5. Визначити показник T_m (температура при якій плавиться 50% молекул ДНК) для ДНК мамонта, слона і гібридної ДНК і порівняти їх
6. Зробити секвенування певних ділянок ДНК мамонта і слона
7. Здійснити обробку ДНК мамонта і слона рестриктазами
8. Поєднати за допомогою лігази окремі ділянки ДНК слона і мамонта
9. Побудувати рестрикційну карту ділянок ДНК мамонта і слона
10. Здійснити гібридизацію молекул ДНК мамонта і слона
11. Створити ДНК-зонд для скринінгу ділянок ДНК мамонта
12. Здійснити трансформацію ДНК мамонта у клітини слона
13. Здійснити трансформацію ДНК слона у клітини мамонта
14. Порівняти нуклеотидні послідовності ДНК мамонта і ДНК слона

20. Існує три препарати ДНК. Відомо, що один з них отриманий із печінки миші (ДНК 1), другий – із м'язів миші (ДНК 2), третій – з м'язів коня (ДНК 3). Етикетки на пробірках із препаратами ДНК 2 і ДНК 3 стерлись. Чи можливо відновити вірні надписи на пробірках?

А. Можна встановити лише приблизно, якщо зробити експеримент по гібридизації відомої ДНК 1 із іншими пробами.

Б. Можна встановити точно за допомогою гібридизації. При цьому ДНК 1 обов'язково повинна показати майже 100% гомологію із ДНК 2 і більш низький рівень із ДНК 3.

В. Ні, встановити не можливо, оскільки ДНК 1 буде гібридизуватися однаково як із ДНК 2, так і з ДНК 3, незалежно від виду організму.

Г. Ні, встановити неможливо, оскільки експеримент по гібридизації ДНК зовсім не вийде. ДНК з різних тканин одного того самого організму не підлягають гібридизації між собою, як і ДНК з різних організмів.

Слова для словника: сайт рестрикції, рестрикційна карта, секвенування, дидезоксинуклеотид, лінкер.

Контрольні запитання

1. Вкажіть основні ферменти, що використовуються в генній інженерії.
2. На основі яких властивостей розрізняють рестриктази I і II класів?
3. Що таке “липкі” і “тупі” кінці фрагмента ДНК?
4. Яким чином можна визначити довжину ділянок ДНК?
5. Що таке ”рекомбінантні ДНК” і за допомогою якого класу рестриктаз можливо їх створювати?
6. Що таке секвенування, для чого воно потрібно?
7. У чому різниця між хімічним і ферментативним секвенуванням?
8. У чому полягає особливість хімічної будови дидезоксинуклеотиду?
9. Який метод надає можливість визначити довжину всіх фрагментів ДНК, що створилися?
10. Де в генній інженерії використовуються штучні олігонуклеотиди?
11. Що таке ”праймер”; для чого він використовується?
12. Які методи створення рекомбінантних ДНК існують?

Лабораторна робота 4. Вектори для будови рекомбінантних ДНК

Введення у клітину і наступна стабільна підтримка генетичної інформації, що міститься у рекомбінантних молекулах ДНК, досягається за допомогою векторних молекул, або *векторів*. Справа у тому, що при звичайному введенні ДНК, наприклад, у бактеріальну клітину вона, як правило, піддається атаці ферментів, які розкладають її на складові компоненти – нуклеотиди. В деяких випадках ДНК «виживає» у клітині, однак у процесі розподілу клітин вона не успадковується і втрачається. Для того, щоб рекомбінантна ДНК стала складовою частиною генетичного апарату клітини, вона повинна або вбудуватися в її геном (інтегруватися у хромосому) і реплікуватися за його рахунок, або бути здатною до автономної реплікації. *Векторами* називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (перенесення в

інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткової генетичної інформації. Для конструювання векторів у генній інженерії використовують хромосоми вірусів, віруси тварин, бактеріофаги, мобільні елементи, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин, а також невеликі молекули нуклеїнових кислот, здатних до автономної реплікації в бактеріальних і еукаріотичних клітинах – *плазмід*.

Найбільш поширеним методом генної інженерії є метод отримання рекомбінантних плазмід, тобто плазмід, що містять чужорідний ген. Плазмідами є кільцеві дволанцюгові молекули ДНК, що складаються з декількох тисяч пар нуклеотидів. Цей процес включає наступні етапи:

1. Рестрикція – розрізання ДНК, наприклад, людини на фрагменти.

2. Лігування – фрагмент з потрібним геном включають у плазмід і зшивають їх.

3. Трансформація – введення рекомбінантних плазмід у бактеріальні клітини. Трансформовані бактерії при цьому набувають певних властивостей. Кожна з трансформованих бактерій розмножується й утворює колонію з багатьох тисяч нащадків – клон

4. Скринінг – відбір серед клонів трансформованих бактерій тих, які містять плазмід, що несуть потрібний ген людини.

Весь цей процес називається клонуванням.

За допомогою плазмідних векторів можна клонувати фрагменти ДНК довжиною до 10 т.п.н. Кожна така колонія являє собою клон або потомство однієї клітини. Плазмід однієї колонії містять клон геномної ДНК, а сукупність плазмід можна назвати бібліотекою геномної ДНК. Недолік такого методу в тому, що фрагменти ДНК утворюються у величезній кількості. Розрізання геномної ДНК відбувається випадково, тому лише частина фрагментів містять повноцінні гени. Деякі фрагменти можуть містити тільки частину гена або ж інтронні послідовності.

Однак при створенні геномних бібліотек часто доводиться працювати із більшими фрагментами. Для цього розроблено вектори на основі бактеріофага λ *E. coli*.

Після проникнення фагу λ у клітину *E. coli* події можуть розвиватися за двома сценаріями. Якщо реалізується *літичний цикл*, то фаг починає інтенсивно розмножуватися й приблизно через 20 хв клітина руйнується (лізує) з вивільненням до 100 нових фагових часток. При альтернативному варіанті розвитку подій фагова ДНК включається в хромосому *E. coli* як профаг і реплікується в клітині разом із нормальними бактеріальними генами. Однак, при нестачі живильних речовин або інших несприятливих обставинах інтегрована фагова ДНК вивільнюється і запускається літичний цикл розвитку.

Розмір ДНК фага λ становить близько 50 т.п.н., причому значна її частина (близько 20 т.п.н.) несуттєва для розмноження фага й відповідає за його вбудовування в ДНК власника. У зв'язку із цим виникла ідея, що її можна замінити фрагментом іншої ДНК еквівалентного розміру. Рекомбінантна молекула, що створюється, буде реплікуватися у клітині як ДНК рекомбінантного фага λ , що встав на літичний шлях розвитку.

Фагові вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК довжиною 15-25 т.п.н. Однак, цього явно недостатньо, щоб клонувати цілком багато генів тварин і рослин, довжина яких найчастіше перевищує 35-40 т.п.н. Необхідною місткістю володіють векторні молекули, називані *космідами*. Косміди являють собою невеликі плазміди, в які *in vitro* введені *cos*-сайти ДНК фага λ . Звідси походить назва всього типу даних векторів (*cosmid*). У ДНК нормальних фагових часток *cos*-сайти розташовані на кінцях молекул, вони розділяють мономери фагової ДНК. У процесі пакування *cos*-сайти розпізнаються компонентами ферментативної системи й по них відбувається послідовне відокремлення (відрізання) упакованої у фагову часточку λ -ДНК від іншої не упакованої ДНК.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Введення у клітину генетичної інформації, що міститься у рекомбінантних молекулах ДНК, досягається за допомогою _____.

Б. _____ для _____ використовують для _____ (збільшення кількості) шляхом реплікації фрагмента ДНК, що вбудований у такий вектор.

В. _____ для _____ використовують для аналізу певних послідовностей генів і білкових продуктів, а також для створення певного білка.

Г. _____ для _____ використовують для введення чужорідного фрагмента ДНК у геном реципієнта.

Д. У складі _____ існує _____ ген, який після проникнення _____ у клітину надає їй фенотип, який свідчить про наявність у клітині _____.

Е. Після проникнення фагу λ у клітину *E. coli* події можуть розвиватися за двома сценаріями. Якщо реалізується _____, то фаг починає інтенсивно розмножуватися й приблизно через 20 хв клітина руйнується - _____ з вивільненням до 100 нових фагових часток. При альтернативному варіанті розвитку подій фагова ДНК включається в хромосому *E. coli* як _____ і _____ в клітині разом із нормальними бактеріальними генами.

Є. _____ являють собою невеликі плазміди, в які *in vitro* введені _____ ДНК фага λ .

Ж. Клітини, що здатні поглинати _____ ДНК, називаються _____. _____ клітин можна збільшити за рахунок _____ при обробці їх електричним струмом.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Вектор повинен бути репліконом, тобто здатним до реплікації в певних клітинах за рахунок послідовності початку реплікації або власної, або клітини-власника.

Б. Розмір ДНК фага λ становить близько 50 т.п.н., причому значна її частина (близько 20 т.п.н.) несуттєва для розмноження фага й відповідає за його вбудовування в ДНК власника. У зв'язку із цим виникла ідея, що її можливо замінити фрагментом іншої ДНК еквівалентного розміру. Рекомбінантна молекула, що створюється, буде реплікуватися у клітині як ДНК рекомбінантного фага λ , що встав на літичний шлях розвитку.

В. ДНК фага λ — це кільцева дволанцюгова молекула довжиною 50 т.п.н. з одностанцюговими 5'-«хвостами» з 12 нуклеотидів; їх називають липкими (*cos*) кінцями, оскільки вони взаємно комплементарні й можуть з'єднуватися з чужорідною ДНК. Після того як фагова ДНК проходить через відросток і потрапляє в клітину *E. coli*, *cos*-кінці з'єднуються з утворенням кільцевої молекули.

Г. Фазміда являє собою кільцеву молекулу ДНК, що містить ряд генетичних елементів, які дозволяють їй існувати у позахромосомному стані в клітинах дріжджів.

Д. Оскільки рекомбінантні фаги λ існують у бактеріальних клітинах у вигляді однієї копії, виключається спільне клонування в одній клітині різних фрагментів ДНК і утворення химерних молекул.

Е. Чужорідний ген, що вбудовується у ДНК-власника, обов'язково повинен містити інформацію, необхідну для реплікації в клітині рекомбінантної ДНК.

Є. При отриманні рекомбінантних ДНК, створених за рахунок введення у прокаріотичну клітину-реципієнт ділянки еукаріотичної ДНК, з фрагменту еукаріотичної молекули ДНК спочатку необхідно вилучити інтрони за допомогою рестриктаз.

Ж. Кон'югативна плазміда здатна проникати з донорної клітини у реципієнтну шляхом передачі двохланцюгової кільцевої молекули ДНК через спеціальну точку проникнення.

3. На підставі наведених етапів створення плазмідних векторів скласти схему їх отримання.

Принципи створення плазмідних та вірусних векторів загальні, тому розглянемо їх на прикладі плазмідних. Слід зазначити, що з вірусних ДНК краще використовувати ДНК фагів, оскільки вони мають велику ємність і дозволяють вставляти більші ділянки генома.

Очищені кільцеві молекули ДНК плазмід обробляють рестриктазою, отримуючи лінійну ДНК. Клітинну ДНК обробляють тієї ж рестриктазою й додають до плазмідної, додають лігази. Таким чином отримують рекомбінантну плазмідну ДНК, яку вводять у бактеріальні або дріжджові клітини. Плазміда реплікується з утворенням багатьох копій. Деякі плазмідні несуть ген стійкості

до антибіотиків, і якщо в рекомбінантній плазміді є такий ген, то клітини легко виявляти, вирощуючи на середовищі з антибіотиком.

Слова для словника: вектор, реплікон, ампліфікація, плазміда, фаг, літичний цикл, лізис, косміда, фазміда, транспозон, маркерний ген, трансформація, трансдукція, трансфекція, кон'югація, фактор фертильності, мобілізація, компетентні клітини, кріотрансформація, електропорація.

Контрольні запитання

1. Які молекули ДНК називають векторами? Які існують типи векторів?
2. Які нові властивості можуть надавати клітинам маркерні гени?
3. Які вимоги надають до векторів?
4. Чому плазмідні вектори майже не використовують при створенні геномних бібліотек?
5. Чим відрізняються кон'югативні плазміди від некон'югативних?
6. Як називається процес перенесення некон'югативної плазміди за допомогою кон'югативної?
7. З яких етапів складається життєвий цикл фага?
8. В чому різниця між вірулентними і помірними фагами?
9. Чому процес трансфекції значно ефективніший процесу трансформації?
10. В чому полягає стан компетентності клітин і яким чином його можна підвищити?
11. Яку роль грає *cot*-ділянка у фага λ ; для чого її використовують при конструюванні космід?
12. Які вектори називають космідами? У чому полягає їх особливість?
13. Чим відрізняються косміди і плазміди?
14. Які особливості має *YAC*-вектор? У чому переваги та недоліки їх використання?
15. Що таке транспозони і які особливості для них характерні?
16. Які види транспозиції існують і в чому їх різниця?

Лабораторна робота 5. Створення, ампліфікація і скринінг геномних бібліотек

Процес розподілення геномної ДНК на елементи для клонування, введення цих елементів у клітини-господарі має назву створення геномної бібліотеки. Повна бібліотека за визначенням містить увесь геном даного організму.

Один із способів створення бібліотеки ДНК полягає в обробці донорської ДНК рестриктазою в умовах, коли відбувається лише часткове розщеплення таким чином, що створюються фрагменти різних розмірів. Отримані фрагменти з'єднують з ДНК векторів за допомогою лігازی і, за можливістю, упаковують у підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом при $t = -70^{\circ} \text{C}$. Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років.

Для клонування еукаріотичних структурних генів необхідні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони з первинних РНК-транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК у бактеріальній клітині неможлива.

Саму мРНК не можна вмонтувати у ДНК-вектор, спочатку на ній необхідно синтезувати дволанцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотну транскриптазу й фрагменти Кленова ДНК-полімерази I. Матрицею в цьому синтезі слугує молекула зрілої мРНК, а каталізує його зворотна транскриптаза, що продується деякими ретровірусами.

У реакційну суміш додають фрагмент Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, що добудовує другий ланцюг ДНК, використовуючи перший ланцюг як матрицю. Він приєднує дезоксинуклеотиди до зростаючого ланцюга, внаслідок цього створюється безінтронна клонована ДНК, так звана кДНК.

Різні кДНК можна вбудовувати в плазмідний вектор і отримати кДНК-бібліотеку.

Ампліфікацію бібліотеки (розмноження) отриманих геномних клонів, а також розшук необхідного клону проводять при зараженні фаговою бібліотекою бактеріальні клітини, які потім висівають на чашках Петрі з агаризованим середовищем. Повний гаплоїдний набір клітин ссавців містить біля $3 \cdot 10^9$ пар основ. При ємності вектора 15 т.п.н. бібліотека може містити біля 1 млн. фагових часточок. Перевірка мільйона фагових пляшок дозволяє перевірити весь геном на наявність необхідного гена. Так можна ідентифікувати ті фагові часточки, які містять послідовність дослідженого гена, розмножити ДНК цієї послідовності і проводити з нею подальші маніпуляції.

Чисельні (ампліфіковані у мільйон разів) копії певних фрагментів ДНК отримують *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для здійснення ПЛР необхідно:

- два синтетичних олігонуклеотидних *праймери* (короткі олігонуклеотиди, що гібридизуються із матрицею і слугують запалом при її копіюванні), довжиною приблизно 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам

ДНК з протилежних ланцюгів, що *фланкують* (оточують) послідовність-мішень, яку розмножують;

- ДНК-мішень довжиною від 100 до ~ 35 000 п.н.;
- термостабільна ДНК-полімераза, яка не втрачає активність при температурі 95°C і вище;
- чотири дезоксирибонуклеотиди;
- іони Mg^{2+} , що необхідні для роботи полімерази.

Буферний розчин, що забезпечує відповідні умови реакції – рН, іонну силу розчину. Містить солі, бичачий сироватковий альбумін.

Типова ПЛР-ампліфікація складається з багаторазового повторення наступних реакцій.

1. *Денатурація*. Перший етап ПЛР полягає в тепловій денатурації зразка ДНК витримуванням його при температурі 95°C протягом мінімум 1 хв.

2. *Ренатурація (відпал)*. Температуру суміші повільно знижують ~ до 55°C, при цьому праймери спаровуються із комплементарними послідовностями ДНК.

3. *Синтез*. Температуру підвищують до ~ 75°C – величини, оптимальної для ДНК-полімерази *Taq*. Починається синтез комплементарного ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера.

Наступний після створення бібліотеки етап – це розшук клону (клонів), які містять необхідну послідовність ДНК. Для цього використовують такі методи: гібридизацію з міченим ДНК-зондом з наступним радіоавтографічним аналізом; імунологічний *скринінг* (ідентифікація одиничного об'єкта шляхом перевірки чисельних об'єктів); скринінг за активністю білку, який кодується геном – мішенню.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Один із способів створення _____ ДНК полягає в обробці донорської ДНК _____ в умовах, коли відбувається лише часткове розщеплення.

Б. Фрагменти, що отримані, з'єднують з ДНК _____ за допомогою _____ і, за можливістю, упаковують в підготовлені головки _____ часточок.

В. Фрагмент Кленова _____ *E. coli* приєднує _____ до зростаючого ланцюга, внаслідок цього створюється безінтронна _____ ДНК, так звана, кДНК.

Г. Два синтетичних олігонуклеотидних _____, довжиною приблизно 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів, що _____ послідовність-мішень, яку розмножують; їх 3'-гідроксильні кінці після _____ з ДНК повинні бути орієнтовані назустріч один одному;

Д. Перший етап ПЛР полягає у _____ зразка ДНК витримуванням його при температурі 95°C протягом як найменш 1 хв.

Е. В першому циклі після _____ ДНК і зв'язування із нею _____ ДНК-полімераза створює дволанцюгові структури, в яких батьківські ланцюги

ДНК поєднані із знов синтезованими _____ ланцюгами різної довжини;

Є. Використовуючи комплементарні до цих ділянок олігомери – _____, запускають _____ (процес збільшення копій гену).

Ж. Якщо нуклеотидні послідовності _____ і ДНК-мішені _____, то відбувається їх спарування (тобто _____).

З. Якщо ген, що розшукується, кодує продукт, без якого клітина-господаря не здатна рости на _____ середовищі, то бібліотеку можна створювати методом _____.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Прокаріоти здатні видаляти інтрони з первинних РНК- транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК у бактеріальній клітині можлива.

Б. Надлишкову кількість праймерів змішують з геномною ДНК, а потім послідовно здійснюють реакції денатурації, відпалу (ренатурації) і нарощування ланцюгу (подовження праймера). Теплова денатурація супроводжується створенням подвійної спіралі ДНК.

В. При зниженні температури має місце відпал олігонуклеотидів, тобто здійснюється гібридизація олігонуклеотидних праймерів зі своїми комплементарними послідовностями.

Г. При повторних циклах теплової денатурації, відпалу і синтезу нові ланцюги ДНК, що створилися, з'єднуються із праймерами і припиняють синтез.

Д. На перших етапах використовували в ПЛР так звані «фрагменти Кленова» ДНК-полімерази I *E.coli*, які виявилися термолабільними, і після кожного циклу денатурації необхідно було додавати нову порцію ферменту.

Е. Мічені ДНК-зонди для скринінгу бібліотеки можна отримати якнайменш двома способами. По-перше, можна використовувати клоновану ДНК близькоспорідненого організму (гетеролітичний зонд). По-друге, зонд можна створити з амінокислотної послідовності білкового продукту гена, який розшукується.

Є. При відсутності ДНК-зонду можна використовувати інші методи. Наприклад, якщо клонований ген здатний до експресії, то його продукт – весь білок, або його частину – можна виявити імунологічними методами.

3. У таблиці наведено результати індивідуального аналізу 9 мікросателітних локусів Y-хромосоми в групі з 16 чоловіків. Цифри свідчать про кількість мікросателітних повторів у певному локусі. Відомо, що у виборці вивчалися дід, батько та син. Вкажіть, які номери можуть їм відповідати (близькі родичі повинні мати однаковий набір алелів у досліджених мікросателітних локусів Y-хромосоми).

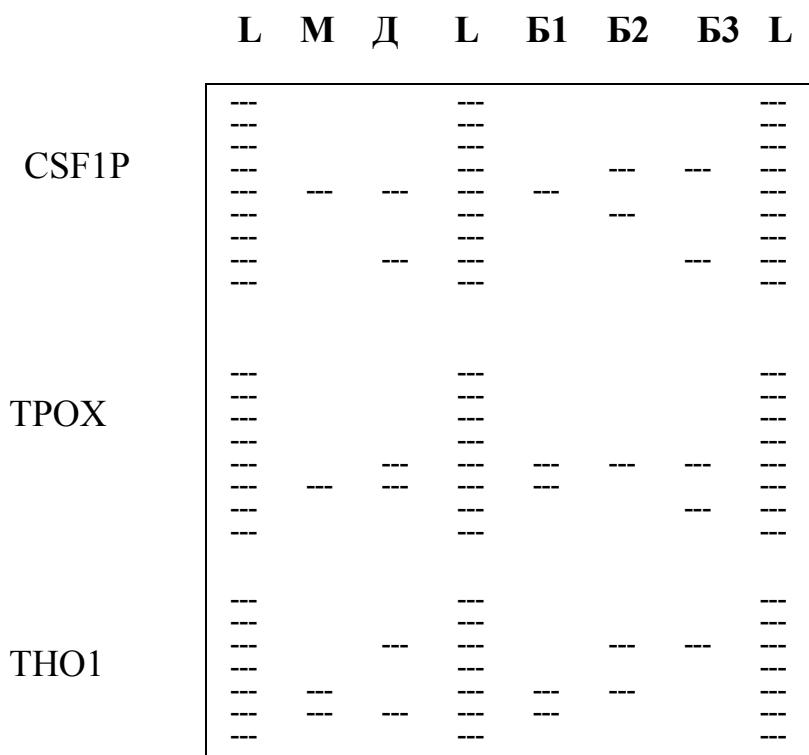
Номер зразка	Локус								
	DYS 391	DYS 91	DYS 49a	DYS 390	DYS 392	DYS 331	DYS 31	DYS 397	DYS 367
1	24	10	17	11	13	11	11	13	17
2	25	10	16	15	15	11	12	14	16
3	25	10	17	11	15	11	11	13	16
4	26	11	18	14	14	10	11	13	15
5	24	10	19	14	15	11	11	14	17
6	22	9	16	15	18	11	10	14	15
7	25	10	17	11	15	11	11	13	16
8	25	10	18	14	14	11	11	13	17
9	25	10	17	11	14	10	11	13	15
10	22	9	16	15	18	12	10	14	15
11	22	9	16	15	19	11	10	14	15
12	24	10	18	14	15	11	11	14	17
13	24	10	19	14	16	11	11	14	17
14	26	11	18	14	14	10	11	14	15
15	26	11	18	14	14	10	11	13	16
16	25	10	17	11	15	11	11	13	16

4. Результати аналізів 9 мікросателітних локусів Y-хромосоми в 6 зразках ДНК солдат, які загинули у військовому конфлікті (№ 1-6) надано в таблиці. Аналогічний аналіз проведено у 6 чоловіків з родин солдат, що зникли безвісті в тому самому конфлікті (№ 7-12). Цифри свідчать про кількість мікросателітних повторів у певному локусі. Вкажіть, які номери можуть відповідати близьким родичам (близькі родичі повинні мати однаковий набір алелів у досліджених мікросателітних локусів Y-хромосоми).

Номер зразка	Локус								
	DYS 391	DYS 91	DYS 49a	DYS 390	DYS 392	DYS 331	DYS 31	DYS 397	DYS 367
1	23	10	16	13	13	9	11	12	14
2	23	10	16	13	16	9	11	13	14
3	24	9	18	14	15	11	11	13	16
4	24	10	17	16	16	10	11	13	13
5	25	10	16	11	14	10	11	13	17
6	24	9	18	14	15	11	11	13	16
7	25	10	16	11	14	10	11	13	17
8	24	10	18	15	15	11	11	13	16
9	23	10	16	13	16	9	11	13	14
10	25	10	16	14	14	10	11	13	17
11	23	10	16	13	16	10	12	12	14
12	24	10	17	16	16	10	11	13	13

5. Надана електрофореграма, що отримана при забарвленні сріблом 4%-го денатуруючого поліакриламідного гелю, на який нанесено проби з продуктами ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (CSF1PO, TPOX і TNO1), які використовують для ідентифікації особистості у зразках ДНК матері (М), дитини (Д) і трьох передбачуваних батьків (Б1, Б2, Б3).

L – маркер, який складається з ампліфікованих фрагментів локусу, що вивчається, з різною кількістю повторів. Визначити генотипи і встановити, який з передбачуваних батьків може бути виключений на підставі цього аналізу.



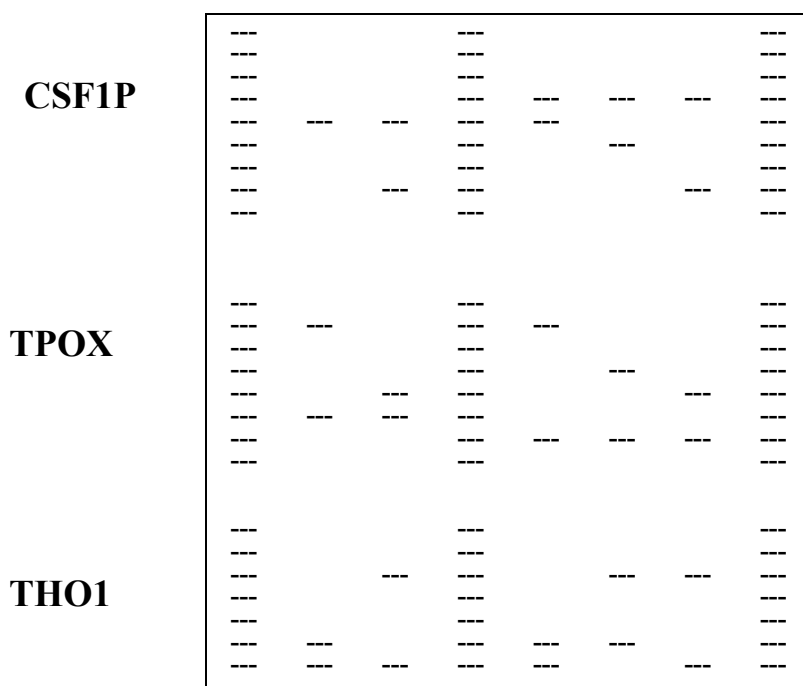
6. Надана електрофореграма, що отримана при забарвленні сріблом 4%-го денатуруючого поліакриламідного гелю, на який нанесено проби з продуктами ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (D16S539, D7S820, D13S317), які використовують для ідентифікації особистості, у зразках ДНК матері (М), двох її дітей (Д1 Д2) і двох передбачуваних батьків (Б1, Б2).

L – маркер, який складається з ампліфікованих фрагментів локусу, що вивчається, з різною кількістю повторів. Визначити генотипи і встановити, який з передбачуваних батьків може бути виключений на підставі цього аналізу.

L – маркер, який складається з ампліфікованих фрагментів локусу, що вивчається, з різною кількістю повторів. Визначити генотипи і встановити, хто з дітей не може бути дитиною цього батька.

8. Надана електрофореграма, що отримана при забарвленні сріблом 4%-го денатуруючого поліакриламідного гелю, на який нанесено проби з продуктами ПЛР-ампліфікації трьох тетрануклеотидних мікросателітних локусів (CSF1PO, TPOX і THO1), які використовують для ідентифікації особистості, у зразках ДНК матері (М), батька (Б) і трьох їх дітей (Д1, Д2, Д3). L – маркер, який складається з ампліфікованих фрагментів локусу, що вивчається, з різною кількістю повторів. Визначити генотипи і встановити, хто з дітей не може бути біологічною дитиною цих батьків.

L M Д1 L Д2 Д3 Б L



Слова для словника: κДНК, ПЛР, денатурація, ренатурація, скринінг.

Контрольні питання

1. Чим відрізняється клонована ДНК (κДНК) від звичайної ДНК еукаріот?
2. Яким чином зберігають бібліотеку генів?
3. З яких реакцій складається процес здійснення ПЛР?
4. Якою особливістю відрізняється ДНК-полімераза *Taq*?
5. Яку роль грають праймери у здійсненні ПЛР?
6. Які вимоги надаються до праймерів, що використовуються у ПЛР?
7. Які компоненти необхідні для здійснення ПЛР?
8. Вкажіть в яких галузях досліджень застосовується ПЛР?
9. Які методи використовують для розшуку клонів, що містять необхідну послідовність ДНК?

Лабораторна робота 6. Лікарські засоби проти ВІЛ

Вірус імунодефіциту людини відноситься до вірусів, генетична інформація яких представлена рибонуклеїновою кислотою (РНК) і належить до родини ретровірусів, до підродина лентівірусів, тобто вірусів повільних інфекцій. У зрілому стані ВІЛ являє собою сферичну частку діаметром близько 100 нм, яка має серцевину й оболонку. Генетичний апарат (геном) ВІЛ містить основні гени, що відповідають за будову вірусу (структурні), і регуляторні гени, що здійснюють контроль за його реплікацією.

ВІЛ має здатність з'єднуватися зі специфічною структурою на клітинній оболонці (рецепторною молекулою CD4), що й забезпечує його проникнення всередину: рецептор, зв'язаний вірусом як би всмоктується клітиною. Білок вірусу gp120, розташований на його поверхні, знаходить білок-рецептор CD4 на поверхні клітини і щільно зв'язується з ним за принципом "ключ-замок". Цьому сприяють додаткові білки - корецептор - CCR5 і CXCR4, для взаємодії клітин з ВІЛ вони грають роль помічників для основного рецептора CD4. Без цих білків-корецепторів, також як без CD4-рецептора, вірус проникнути в клітину не може. Після цього в цитоплазмі зараженої клітини відбувається звільнення його геному, ДНК транспортується в ядро, вбудовується у власну ДНК клітини, і в такий спосіб перетворюється на провірусну ДНК.

З цього моменту починається стадія латентної інфекції, при якій гени вірусу знаходяться в неактивному стані. Подібно іншим збудникам повільних вірусних інфекцій у неактивній клітині ВІЛ може тривалий час перебувати у стані спокою й ніяк себе не проявляти. Однак, при активації інфікованої клітини під дією різноманітних факторів – інфекційних, гормональних, стресових чи інших, разом із власними генами починають працювати й гени провірусу, і тоді разом із власними біологічними сполуками клітина розпочинає синтез окремих структурних компонентів ВІЛ.

Із синтезованих клітиною складових елементів ВІЛ збираються вірусні частинки, транспортуються до клітинної оболонки й виходять на поверхню та, при цьому, запозичають частину останньої.

Однією з найбільш характерних біологічних особливостей ВІЛ – є його винятково висока мінливість, тобто схильність вірусу до змін. Через це постійно з'являється величезна кількість нових груп і субтипів вірусів. Так, показано, що за 1 день в організмі інфікованої людини продукується й виділяється з клітин понад 10 млрд. віріонів (нових вірусних часток). Нові покоління вірусу з'являються кожні 2,6 дні (і це є тривалістю життєвого циклу ВІЛ – від початку його репродукції в клітині до виходу з неї нового потомства, яке вже інфікує наступні клітини), отже, за рік змінюється понад 140 поколінь, а за 10-річний період інфекції - 1400 поколінь. Крім того, через деякі обставини ця кількість може збільшуватися в 10-100 разів.

Саме мінливістю геному вірусу зумовлюється складність розробки профілактичної вакцини (створена із сьогоденних вірусів вона буде неспроможна захистити від тих ВІЛ, які можуть з'явитися завтра). Мінливість ВІЛ визначає і швидкість розвитку інфекції, і здатність цього вірусу вислизати з

під контролю імунної системи, а також призводить до швидкого утворення форм, опірних до препаратів. Поява нових різновидів ВІЛ небезпечна також через імовірність виникнення такої ситуації, коли існуючими діагностичними системами вже неможливо буде їх виявити через зміну їх складу.

Існує цілий ряд механізмів взаємодії ВІЛ з клітинами Т-хелперів, що доповнюють один одного. Останні стимулюють роботу Т-кілерів і макрофагів, індукують продукцію антитіл В-лімфоцитами.

1-й механізм. При продуктивному процесі відбувається репродукція і масовий (кілька тисяч віріонів в генерації однієї клітини) вихід ВІЛ з лімфоцитів при цьому Т-хелпери інтенсивно лізуються. Оскільки Т-хелпери становлять близько 60% циркулюючих Т-клітин, швидка їх загибель призводить до глибоких порушень імунної системи інфікованої людини. СНІД розвивається на тлі гострої недостатності CD4-лімфоцитів.

2-й механізм. На тлі загальної стимуляції метаболізму лімфоцитів після їх інфікування вірусом, що приводить їх до "загибелі від виснаження", відбувається інтеграція геномів вірусу і клітини. Дисемінація (*поширення мікробів або пухлинних клітин з первинного вогнища по організму людини й тварин; відбувається по кровоносних або лімфатичних судинах*) інфекції захоплює значне число хелперних Т-лімфоцитів фенотипу CD4.

3-й механізм. Частинки ВІЛ змінюють поверхню Т-хелперів, що призводить до утворення нежиттєздатних синцитіїв. Компоненти вірусної оболонки, що синтезовані у процесі репродукції вірусу, різко порушують цитоплазматичну мембрану клітини-господаря: внаслідок елімінації протоплазми клітини зливаються, утворюються нежиттєздатні багатоядерні структури – синцитії.

4-й механізм. ВІЛ не руйнує CD4-лімфоцити, а змінює і значно уповільнює їхній ріст у періодичній культурі, тоді як інші види Т-клітин продовжують розмножуватися нормально. Відзначено, що швидкість загибелі заражених клітин пропорційна кількості CD4-рецепторів на їх поверхні. З часом число CD4-клітин стає менше, хоча деяка їх частина виживає і зберігає вірус у латентному стані у вигляді провірусу.

5-й механізм. ВІЛ маскує CD4-маркер. Було показано, що в тих CD4-лімфоцитах, що вижили, вірус може маскувати CD4-маркер на поверхні клітин або запобігати його появі там. У результаті виходить, що число CD4-клітин ще менше, ніж насправді. З зникненням CD4-клітин падає рівень інтерлейкіну-2 і в результаті сповільнюється зростання клонів зрілих Т-клітин, індукованих лімфокінами. Через ослаблення синтезу інтерлейкіну та інтерферону падає активність Т-кілерів і макрофагів, які в нормі стимулюються цими білками, цей ефект перешкоджає розпізнаванню і руйнуванню інфікованих вірусом клітин. Таким шляхом ВІЛ уникає будь-яких впливів з боку імунної системи, тобто створюється ситуація "імунного паралічу".

6-й механізм. В інфікованих CD4-клітинах ВІЛ викликає секрецію розчинного фактора супресії. Ця речовина блокує імунні реакції, що залежать від Т-клітин як *in vitro*, так і *in vivo*. При цьому пригнічується утворення специфічних антитіл і проліферація Т-клітин.

7-й механізм. Вірус імунодефіциту людини викликає зміни поверхні CD4-лімфоцитів, що провокує їх знищення як чужих імунній системі. CD4-клітини, будучи інфікованими, гинуть від того, що на них нападають Т-лімфоцити-кілери. Таким шляхом йде безперервне зниження кількості Т-хелперів у крові, лімфовузлах, селезінці та інших тканинах.

8-й механізм. ВІЛ, що проник в лімфоцити, змінює геном Т-хелперів, в результаті чого вони позбавляються здатності до трансформації і нормальної відповіді на інтерлейкін та інтерферон.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

- А.** Білок вірусу _____, розташований на його поверхні, знаходить білок-рецептор _____ на поверхні клітини і щільно зв'язується з ним за принципом "ключ-замок".
- Б.** Однією з найбільш характерних біологічних особливостей ВІЛ - є його винятково висока _____, тобто схильність вірусу до змін.
- В.** При продуктивному процесі відбувається репродукція і масовий вихід ВІЛ з лімфоцитів при цьому _____ інтенсивно _____.
- Г.** За день в організмі інфікованої людини продукується й виділяється з клітин понад 10 млрд _____ (нових вірусних часток).

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

- А.** ВІЛ, що проник у лімфоцити, змінює геном Т-хелперів, в результаті чого вони стають здатними до трансформації і нормальної відповіді на інтерлейкін та інтерферон.
- Б.** З зникненням CD4-клітин падає рівень інтерлейкіну-2 і в результаті сповільнюється зростання клонів зрілих Т-клітин, індукованих лімфокінами.
- В.** Оскільки Т-хелпери становлять близько 60% циркулюючих Т-клітин, швидкий їх ріст і розвиток призводить до глибоких порушень імунної системи інфікованої людини.
- Г.** Вірус імунодефіциту людини викликає зміни поверхні CD4-лімфоцитів, що провокує їх знищення як чужих імунній системі. CD4-клітини, будучи інфікованими, гинуть від того, що на них нападають Т-лімфоцити-кілери.

3. Підготувати презентації на наступні теми:

- «Механізми розвитку та зараження клітин організму ВІЛ»
- «Цікаві факти про ВІЛ»
- «Сучасні методи боротьби з ВІЛ»
- «Розповсюдження ВІЛ у країні, та шляхи профілактики зараження»
- «Генно-інженерні методи боротьби з ВІЛ»

Слова для словника: помірний вірус, провірус, віріон, дисемінація, елімінація, синцитій.

Контрольні питання

1. У чому полягає особливість кодування генетичної інформації ВІЛ?
2. На які клітини лімфоцитарної системи ВІЛ впливає в першу чергу?
3. Які поверхневі ділянки лімфоцитів розпізнає ВІЛ?
4. Що є однією з найбільш характерних біологічних особливостей ВІЛ?
5. Які механізми взаємодії ВІЛ з клітинами Т-хелперів існують?

Лабораторна робота 7. Створення вакцин нового покоління

Як правило, сучасні вакцини створюють на основі вбитих (інактивованих) патогенних мікроорганізмів або живих, але *невірулентних* (не здатних руйнувати клітини організмів) штамів. Незважаючи на те, що в наш час досягли значних успіхів у створенні вакцин проти багатьох захворювань, виробництво вакцин зустрічається з певними обмеженнями.

В останнє десятиріччя, з розвитком технології рекомбінантних ДНК, з'явилася можливість створення нового покоління вакцин, які позбавлені недоліків традиційних вакцин. Для їх розробки використовують наступні методи генної інженерії.

1. *Модифікація патогенного мікроорганізму* за рахунок *делеції* (вилучення) з геному ділянки гена, що відповідає за вірулентність. Такий вірус можна використовувати в якості живої вакцини, оскільки вирощування в культурі виключає імовірність спонтанного відновлення цілого гена.

2. *Створення живої непатогенної системи*, що містить окремі антигенні детермінанти неспорідненого патогенного організму. Така система здатна викликати імунну відповідь на патогенний мікроорганізм.

3. *Створення субодиничних вакцин*, які використовують у тому випадку, коли патогенний мікроорганізм не здатний рости у культурі. Тоді ділянки генів цього мікроорганізму, що відповідають за синтез білків антигенних детермінант, вилучають, клонують і здійснюють їх експресію (процес реалізації генетичної інформації) у клітинах власника, наприклад, в *E.coli*.

4. *Створення системи специфічного руйнування клітин-мішеней*. Деякі патогенні мікроорганізми діють не безпосередньо на організм, а на окремі його клітини, які після інфікування починають виробляти речовини, що небезпечні для організму. Для таких захворювань можна сконструювати ген, який відповідає за синтез химерного білку, одна частина якого зв'язується з інфікованою клітиною, а друга – руйнує її. Ця система не є дійсною вакциною, хоча вона і діє лише на інфіковані клітини.

Як правило, вакцини містять непошкоджені патогенні мікроорганізми, але вони повинні бути неживі або *атенуйовані* (ослаблені, що містять ділянку гену між промотором і першим структурним геном, яка за певних умов

припиняє процес реалізації інформації). Антитіла, що виробляються у відповідь на їх уведення, зв'язуються з поверхневими білками патогенного організму і запускають імунну відповідь. Однак, стосовно вірусів було показано, що для здійснення синтезу антитіл в організмі-власнику достатньо очищених поверхневих білків вірусу (білків капсиду або зовнішньої оболонки).

Білки оболонки вірусу при потраплянні в організм тварини виконують роль антигенних детермінант, на які в організмі-власнику створюються антитіла.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Вакцини, що містять лише окремі компоненти патогенного організму, мають назву _____ і створюються за допомогою технології _____ ДНК.

Б. Стосовно вірусів було показано, що для здійснення синтезу антитіл в організмі-власнику достатньо очищених поверхневих білків вірусу, які мають назву _____.

В. Живі вакцини, як правило більш ефективні, ніж неживі або _____.

Г. _____, за допомогою яких відбувається доставка і експресія в організмі-власнику генів, що відповідають за вироблення антигенних білків.

Д. Речовина _____ людини стимулює клітинний імунітет і обмежує _____ вірусу.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Як правило, вакцини містять непошкоджені патогенні мікроорганізми, але вони повинні бути неживі або ампліфіковані за рахунок ПЛР.

Б. Переваги атенуйованих вакцин полягають у тому, що вони стабільні, безпечні, їх хімічні властивості відомі, в них відсутні додаткові білки і нуклеїнові кислоти, які можуть викликати непотрібні побічні ефекти в організмі-власнику.

В. Другий спосіб отримання непатогенних штамів пов'язаний з відділенням з геному бактерій хромосомних ділянок, які відповідають за незалежні життєво важливі функції. В цьому випадку кращою є делеція якнайменш двох таких ділянок, оскільки імовірність їх одночасного відновлення дуже незначна.

Г. Оскільки геном ВВВ має досить великий розмір в одну ДНК можна вбудовувати декілька чужорідних генів, під контролем загального ВВВ-промотору, для запобігання рекомбінації між різними ділянками вірусної ДНК.

Д. Інактивують вірус після вакцинації за рахунок створення ВВВ чутливого до інтерферону. При виникненні небажаних побічних ефектів

після вакцинації в організм тварини вводять інтерферон, що одразу пригнічує проліферацію вірусу.

3. Отримано ретровірус, який викликає сказ у диких тварин. Створіть на основі цього вірусу рекомбінантну вакцину для захисту тварин.

Слова для словника: делеція, атенуйований мікроорганізм, епітоп, антигенна детермінанта, капсид, проліферація

Контрольні запитання

1. Які існують способи створення вакцин?
2. Які вакцини мають назву "субодиничні"?
3. Що таке "атенуйована вакцина"?
5. Чому живі вакцини більш ефективні, ніж вбиті?
6. Що таке "векторні вакцини"? На основі чого їх створюють?
7. У чому полягає перевага векторних вакцин?
8. Яким чином можливо зменшити побічні ефекти при вакцинації векторними вакцинами?

Лабораторна робота 8. Отримання трансгенних тварин

Ідея генетичної зміни тварин шляхом введення генів у запліднену яйцеклітину була реалізована у 1980 р. Тварину, генотип якої був змінений за рахунок уведення чужорідної ДНК, назвали *трансгенною*, ДНК, що вводиться – *трансгеном*, а весь процес – трансгенною технологією, або *трансгенезом*.

Існує декілька методів за допомогою яких трансген вводять у геном тварини.

Метод мікроін'єкції ДНК. Отримання трансгенних тварин шляхом мікроін'єкцій гена включає вилучення ембріонів на стадії пронуклеуса хірургічним шляхом або після забою донорів. Для отримання запліднених яйцеклітин, необхідних для мікроін'єкції, у тварин гормональною обробкою викликають суперовуляцію за схемою визначеною для кожного виду тварин, а потім вилучають яйцеклітини при промиванні яйцепроводів. Для ін'єкції ембріони за необхідністю фіксують на столі мікроскопа за допомогою фіксуючої піпетки так, щоб пронуклеус, в який проводять ін'єкцію, було добре видно. Для ін'єкції піпетку через прозору оболонку і клітинну мембрану вводять у пронуклеус, після чого додають у нього 1-2 пкл розчину ДНК. Про точність операції свідчить набухання пронуклеусу. Лише візуальне збільшення об'єму ядра вказує, що розчин ДНК дійсно потрапив у пронуклеус. Після ін'єкції ембріони звільняють від фіксуючої піпетки і культивують до часу пересадки реципієнтам.

Проведення мікроін'єкцій трансгена у запліднені *in vitro*, а не лише в отриманні від донорів хірургічним шляхом, або після забою, ембріони великої рогатої худоби зробило цей метод доступним для більшості лабораторій. Однак

ефективність методу залишається дуже низькою. Необхідно якнайменш 100 вагітностей після пересадки ін'єктованих ембріонів, щоб отримати одну трансгенну тварину, в геном якої включений трансген, і він здатний передаватися спадково нащадкам.

На жаль інтеграція трансгена, як правило, носить випадковий характер:

- у деяких випадках чужорідна ДНК стимулює виникнення мутацій;
- не завжди трансгенна тварина характеризується експресією трансгена.

Наприклад, експерименти по введенню гена гормону росту людини сільськогосподарським тваринам дозволили отримати трансгенних кролів і свиней, однак ріст їх не відрізнявся від росту контрольних тварин;

- експресія трансгену в організмі трансгенної тварини крім позитивного ефекту, що очікується, може викликати і негативну реакцію. Збільшення рівня гормону росту в крові трансгенних овець у деяких випадках приводило до виникнення діабету і загибелі тварин;

- внесення трансгена в ембріон може викликати народження *мозаїків*.

Мозаїками вважаються тварини, які складаються з двох або декількох клітинних ліній, що походять з однієї зиготи, але мають різні генотипи. Трансгенні мозаїки крім клітинних ліній, що містять трансген, мають нетрансгенні лінії. При отриманні від таких тварин нащадків можуть виникнути певні труднощі. Так, якщо клітини гонад не містять трансгена, нащадки не можуть успадкувати ін'єкований ген від трансгенних батьків. Існуючі дані свідчать, що біля 30% первинних трансгенів, що отримані за рахунок методу мікроін'єкцій, є мозаїками. Частина мозаїків зовсім не здатна створити трансгенну лінію, оскільки в них відсутня передача трансгена спадково.

Незважаючи на досягнуті в сфері трансгенезу успіхи, ефективність (число отриманих трансгенних тварин від числа пересаджених ембріонів) класичного методу мікроін'єкції залишається дуже низькою і варіює від 0,5% у великої рогатої худоби до 1,0-2,0% у кролів. У свиней, овець і кіз результативність методу мікроін'єкції становить 0,5-1,0%.

Метод мікроін'єкції у пронуклеус залишався домінуючим при створенні трансгенних сільськогосподарських тварин до середини 90-х років ХХ століття і був практично повністю витіснений методом пересадки ядер соматичних клітин, генетично трансформованих *in vitro* (SCNT).

Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин.

Клітини, що отримані з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферувати в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь які типи клітин, у тому числі і в клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти. Такі клітини називають *тотипотентними ембріональними стовбуровими клітинами (ES)*.

ES-клітини у культурі легко модифікувати методами генної інженерії без руйнування їх тотипотентності. Наприклад, у певний сайт неістотного гена в їх геномі можна вбудовувати функціональний трансген. Потім можна відібрати клітини, що змінилися, культивувати їх і використовувати для отримання трансгенних тварин. Це дозволяє запобігти випадкового вбудовування, що властиве для методу мікроін'єкцій.

Ефективність трансгенезу становила 100%, в той час як застосування методу мікроін'єкції в тій же лабораторії дозволяло отримувати лише 4,35% трансгенних нащадків від числа народжених тварин. Для отримання одного трансгенного ягняти за допомогою SCNT в середньому потрібно 20,8 овець, у той час як при використанні методу мікроін'єкції - 51,4 вівці.

У специфічній хромосомній сайт ES-клітин можна не лише вбудувати трансген, який кодує нову функцію, але і спрямовано руйнувати цей сайт за рахунок інтеграції з його кодуючою областю специфічної послідовності (як правило, селективного маркерного гена). Одна з задач спрямованого руйнування ("нокаута") гена полягає в дослідженні впливу цього процесу на розвиток організму і фізіологічні функції, які в ньому здійснюються. Крім того, є надія, що трансгенні тварини з порушеннями в певному гені можна використовувати як модель для вивчення хвороб людини на молекулярному рівні.

Використання ретровірусних і лентівірусних векторів. Перевага цього методу полягає в його ефективності і відносній простоті виконання.

Принципові відмінності між двома вищезгаданими типами векторів полягають у тому, що ретровірусні вектори можуть інтегруватися лише у клітини, що активно діляться, в той час як лентівіруси здатні реплікуватися, як у клітинах, що діляться, так і в тих, що не діляться. Використання ретровірусів дозволяє вбудувати в РНК фага зрілу мРНК трансгена без створення на її основі ДНК. Літичний цикл розвитку фага дає можливість отримувати одразу до 100 копій вектора. Однак, існують і певні недоліки при використанні цього методу. Розмір трансгена не повинен перебільшувати 8 т.п.н., а це, у свою чергу, може позбавити його регуляторних послідовностей, які необхідні для експресії.

Крім того, незважаючи на те, що ретровірусні вектори створюють так, щоб вони були не здатні до реплікації, може виникнути ймовірність подвоєння вірусу в організмі тварини, що заборонено у випадку використання тварини для їжі, або отримання комерційного продукту.

Використання сперматозоїдів у якості векторів трансгена (SMGT).

Використання сперматозоїдів у якості носіїв для трансгена можливо здатне забезпечити інтродукцію їх у геном зародку у найбільш оптимальний для цього період. Однак, це залежить від місця, в яке потрапляє чужорідна ДНК. Встановлено, що для бугаїв і кнурів здатність до зв'язування трансгену обмежена головним чином екваторіальною зоною і постакросомальним районом головки сперматозоїда. Потраплення чужорідної ДНК у залишки цитоплазми в основі хвоста не призводить до трансгенезу.

Сперматозоїди мають спонтанну тенденцію до зв'язування трансгена, що присутній у культуральному середовищі. Експерименти показали, що з'єднання чужорідної ДНК і її проникнення в головку сперматозоїда можливе лише в тому випадку, коли сім'яна плазма ретельно відокремлена.

Недавні дослідження виявили, що переніс трансгенів за допомогою сперматозоїдів у геном зиготи може здійснюватися не лише в умовах *in vitro*, але і при заплідненні *in vivo*. В цих експериментах відмиті від сім'яної плазми

сперматозоїди кнура утримували в культуральному середовищі з плазмідною, яка містила трансген, протягом 30 хвилин, після чого оброблені сперматозоїди центрифугували до об'єму 1 мл і вносили в кожен ріг матки за допомогою ін'єкції по 0,5 мл трансформованих спермій. Відсоток запліднення свиноматок становив 73 (16 свиноматок з 22), і 10 з 48 (21%) поросят виявилися трансгенними.

Використання сперматозоїдів у якості носіїв трансгена при заплідненні *in vivo* значно спрощує технологію отримання трансгенних тварин і може значно збільшити частоту інтеграції чужорідних генів.

Технології активного трансгенезу. Прогрес у геномній інженерії сільськогосподарських тварин у даний час пов'язують із розвитком технологій так званого *активного трансгенезу*, які за допомогою екзогенних ферментів або ДНК, що їх кодують, забезпечують можливість спрямованої (сайт-специфічної) інтеграції з метою привнесення нових функцій (gain-of-function) або, навпаки, втрати функцій (loss-of-function). У якості інструментів у технологіях активного трансгенезу знаходять застосування системи ДНК-транспозонів і сайт-специфічних ендонуклеаз. ДНК-транспозони або транспозони другого типу – це мобільні генетичні елементи, які переміщуються по геному господаря, використовуючи механізм «вирізати-вставити». Основною перевагою використання транспозонів для трансгенезу є їх інтеграція в ділянки еухроматину, що запобігає *сайленсінгу* (процес відключення) трансгенів, що спостерігається при випадковій інтеграції в ділянки гетерохроматину.

Нову епоху в області трансгенеза тварин пов'язують із застосуванням для геномної інженерії ссавців системи CRISPR/Cas9.

У даний час за допомогою CRISPR/Cas9 створені генетично модифіковані лінії фетальних фібробластів практично всіх основних видів сільськогосподарських тварин (великої рогатої худоби, свиней, кіз) з нокаутом і вставками цілого ряду генів.

Безперечно, технологія CRISPR/Cas9 найближчим часом стане домінуючою в створенні трансгенних сільськогосподарських тварин.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Експресія _____ в організмі _____ тварини крім позитивного ефекту, що очікується, може викликати і негативну реакцію.

Б. Трансгенні _____ крім клітинних ліній, що містять _____, мають _____ лінії. При отриманні від таких тварин нащадків можуть виникнути певні труднощі.

В. Клітини, що отримані з ембріонів на стадії _____, можуть _____ в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь які типи клітин, у тому числі і в клітини _____, при введенні в інший ембріон на стадії _____.

Г. У специфічний хромосомний сайт _____ можна не лише вбудувати _____, який кодує нову функцію, але і спрямовано руйнувати цей сайт за рахунок інтеграції з його кодуючою областю специфічної послідовності.

Д. Використання _____ дозволяє вбудувати в РНК ____ зрілу мРНК _____ без створення на її основі ДНК. _____ цикл розвитку _____ дає можливість отримувати одразу до 100 копій вектора.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Клітини, що отримані з ембріонів на стадії бластоцисти, не можуть проліферувати в культурі, і втрачають здатність до диференціації в будь які типи клітин, в тому числі і в клітини зародкової лінії.

Б. Одне із завдань спрямованого руйнування (“*нокаут*”) гена полягає в дослідженні впливу цього процесу на розвиток організму і фізіологічні функції, які в ньому здійснюються.

В. Сперматозоїди мають спонтанну тенденцію до зв’язування трансгена, що присутній у культуральному середовищі. Експерименти показали, що з’єднання чужорідної ДНК і її проникнення в головку сперматозоїда можливе лише в присутності сім’яної плазми.

Г. Як інструменти в технологіях активного трансгенезу знаходять застосування системи ДНК-транспозонів і сайт-специфічних ендонуклеаз. ДНК-транспозони або транспозони першого типу – це мобільні генетичні елементи, які переміщуються по геному господаря, використовуючи механізм «вирізати-копіювати».

3. Методи введення трансгена в геном тварини можна поділити на дві групи – прямі (без використання векторів) и непрямі (з використанням векторів). Пояснить, у чому полягають особливості отримання трансгенних тварин наступними способами і до якої групи методів вони належать:

- Ліпофекція;
- Балістична трансфекція (біобалістика або біолістика);
- Електропорація;
- За допомогою сперматозоїдів;
- Застосування системи ДНК-транспозонів;
- Використання ретровірусів і лентівірусів;
- Метод мікроін’єкції ДНК;
- Використання модифікованих ембріональних стовбурових клітин.

4. Скласти схеми отримання трансгенних тварин (рис. 4-7). На підставі рисунків пояснити різні способи отримання трансгенних тварин.

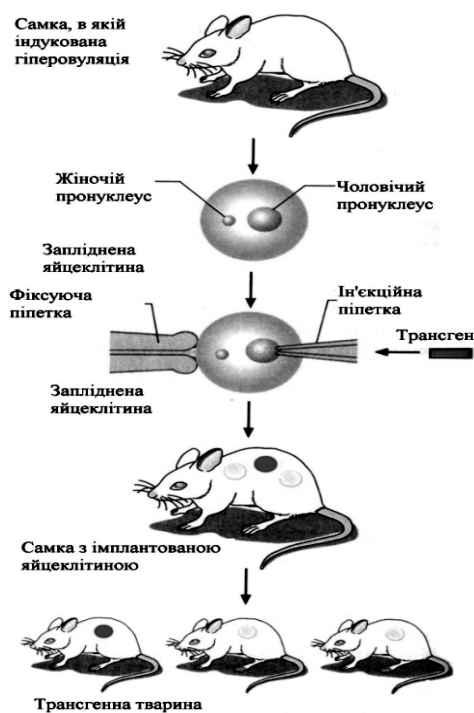


Рис. 4. Отримання трансгенних тварин ін'єкційним методом

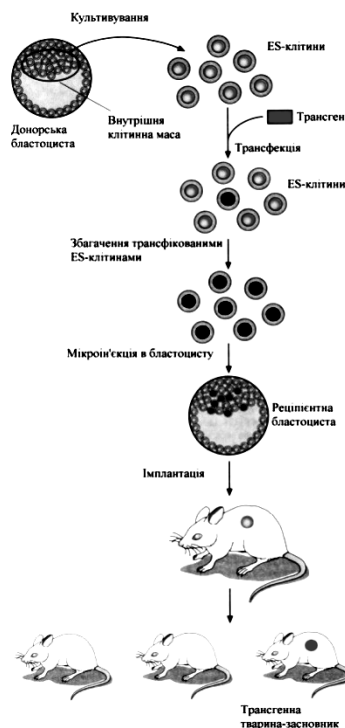


Рис. 5. Створення трансгенних тварин за допомогою ES-клітин

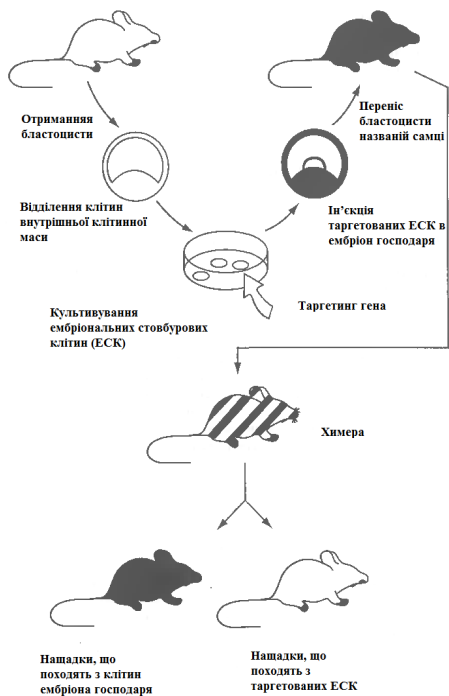


Рис. 6. Схема отримання трансгенних мишей шляхом спрямованої зміни (таргетування) гену в ЕСК

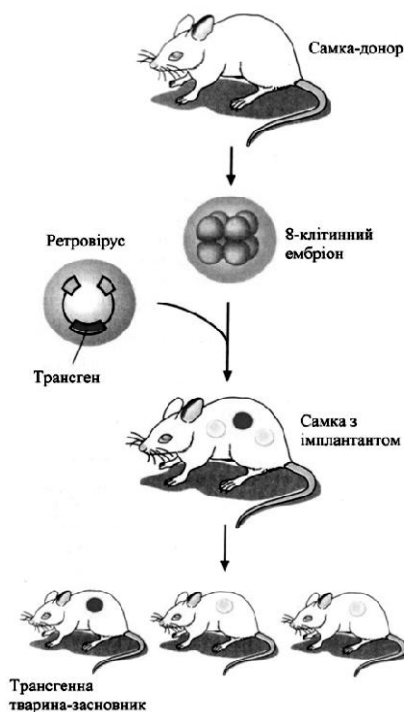


Рис. 7. Отримання трансгенних тварин за допомогою ретровірусних векторів

Слова для словника: трансгенез, трансген, мозаїк, ES-клітини, тотипотентність, генний нокаут, лентівірус, сайленсінг.

Контрольні запитання

1. Які тварини називаються трансгенними?
2. Що таке трансгенез?
3. Які існують способи введення трансгена в організм тварини?
4. Які переваги та недоліки існують при введенні трансгена за допомогою ретровірусів?
5. Чому мікроін'єкція трансгена робиться у чоловічий пронуклеус?
6. Яких тварин називають мозаїками, в чому особливості будови їх геному?
7. Що таке спрямований “нокаут” і для чого його використовують?
8. Які існують види клонування за допомогою пересадки ядер?
9. З яких стадій складається процес отримання трансгенних корів?
10. Які дослідження зробили метод мікроін'єкцій для В.Р.Х. більш ефективним і доступним?
11. Які існують особливості внесення трансгена при використанні в якості векторів сперматозоїдів?
12. У чому полягає суть методу створення трансгенних тварин *in vivo* за допомогою сперматозоїдів у якості векторів?

Лабораторна робота 9. Напрями використання сільськогосподарських ГМ-тварин

В наш час основними напрямками створення трансгенних тварин є:

- тварини зі зміненим обміном речовин для підвищення якості та ефективності виробництва продукції;
- тварини стійкі до захворювань;
- тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення;
- тварини – донори внутрішніх органів для пересадки людині (ксенотрансплантація);
- тварини – генетичні моделі захворювань людини.

Тварини зі зміненим обміном речовин для підвищення якості та ефективності виробництва продукції. Найбільш раннім напрямком стало отримання особин з генами, продукти експресії яких є регуляторами обміну речовин тварин, забезпечуючи досягнення високої продуктивності, економної витрати кормів і зміну якісних характеристик продукції. З генетичної точки зору найбільш цікаві гени, що кодують протеїни каскаду гормону росту, а саме,

безпосередньо гормон росту (ГР), рилізінг фактори гормону росту (РФ-ГР) і інсулінподібний фактор гормону росту (ІФ-ГР).

Перші трансгенні миші з геном ГР пацюка були отримані у 1982 р. В них спостерігалось підвищення швидкості росту (у чотири рази) і подвоєння живої маси.

Що стосується сільськогосподарських тварин, у трансгенних свиней і овець не спостерігалось відповідного прискорення росту, або підвищення його не перебільшувало 15-16% порівняно з контролем. Деякі дослідники пояснюють це тим, що піддослідні тварини походять з популяцій, в яких протягом десятиліть проводилася селекція за цією ознакою. Поряд з цим, відмічено збільшення вмісту білка і зменшення вмісту жиру у тканинах трансгенних тварин з додатковими генами гормону росту, що значно підвищує якість і товарну цінність отриманих м'ясопродуктів.

Наступні експерименти були спрямовані на підвищення бактеріцидних властивостей молока корів за допомогою додаткової експресії лізоциму. Синтез молочною залозою лізоциму не тільки здійснює антибактеріальний вплив, але і зменшує ймовірність захворювання на мастити, викликає специфічний пасивний імунітет у новонароджених. Крім того, він також сприяє збільшенню виходу сиру, оскільки пов'язаний з казеїнами. Ще один білок молока людини – лактоферин володіє бактеріостатичними властивостями і посилює адсорбцію заліза. Він міститься в молоці корів у незначній кількості і його збільшенням можна досягнути декілька цілей. Оскільки він покращує адсорбцію заліза, то за його рахунок можна підвищити збереженість нащадків, крім того, він контролює розмноження бактерій.

Зменшення кількості лактози в молоці також було б корисно і не лише для людей, які не здатні розщеплювати її із-за недостатнього синтезу ферменту лактази, а і для молочної промисловості, оскільки збільшило б ефективність виробництва сиру. Проблема була вирішена за рахунок створення трансгенних корів, у молочній залозі яких відбувалась експресія лактази, яка гідролізувала лактозу безпосередньо у тканинах вимені.

Можливо також зниження алергенних властивостей молока за допомогою нокауту основного алергену – β -лактоглобуліну.

Таким чином, внаслідок секреції білків людини в молоко корів можливо його зробити більш адекватним для використання людиною. Включення лактоферину, лізоциму і імуноглобулінів людини мають додаткову терапевтичну користь.

Тварини стійкі до захворювань. Підвищення генетичної стійкості тварин до інфекційних захворювань є одним з головних завдань сучасного тваринництва. Одним із шляхів вирішення проблеми може стати генетична модифікація тварин. Стратегії, що розробляються в зв'язку з цим, можуть бути глобально розподілені на два напрямки: (1) введення генів стійкості в геном господаря («gain-of-function») і (2) специфічний таргетинг ендогенних або екзогенних генів чутливості до захворювань («loss-of-function» або «exchange-of-function»).

Підхід, що дозволяє отримати стійких до захворювань тварин, полягає в інтеграції в їх геном генів імуноглобулінів, специфічних до тих чи інших збудників інфекційних захворювань. Експресія цих генів захистить тварин від хвороботворних мікроорганізмів. До захисних білків також відносяться інтерферони, вони захищають організм від вірусних захворювань. У зв'язку з цим можна очікувати, що трансгенні тварини з геном інтерферону будуть менш схильні до вірусних інфекцій, ніж нетрансгенні.

Ще один напрямок, який може підвищити стійкість тварин до вірусних захворювань, полягає у введенні в їх геном генів, що кодують антисмислового РНК. Експресія її у клітинах викликає наступну гібридизацію із смисловою РНК вірусу і, відповідно, інгібування реплікації вірусного геному. Створені трансгенні кролі, кури, велика рогата худоба з геном асРНК проти вірусу лейкозу, стійкі до зараження лейкозом.

Тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення. Для нормального функціонування білків людини дуже важливі ті зміни, що відбуваються на посттрансляційному рівні: глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування, карбоксилювання і деякі інші перетворення. Значна частина біохімічних механізмів, що забезпечують ці процеси, відсутня у прокариот, і білки, синтезовані ними з матриць генів людини, не повністю ідентичні білкам з клітин людського організму. Інша складність пов'язана з виділенням і очищенням лікарського білка – бактеріальні клітини йдуть у переробку цілком, і тому важко позбутися від усіх сторонніх домішок у кінцевому продукті. Трансгенні дріжджові культури і культури клітин людини не мають цих недоліків, але продуктивність таких систем у даний час нижча, ніж та, яка вже отримана у експериментальних трансгенних тварин.

Достатня кількість якісних і дешевих лікарських білків людини могла б врятувати багатьох пацієнтів. Це завдання і лягло в основу робіт по отриманню трансгенних тварин – продуцентів білків людини.

Стратегія цих робіт така: отримати трансгенну тварину, в якій чужий ген експресується в клітинах молочної залози і продукт роботи цього гена виділяється в молоко. Тоді отримання лікарського білка зведеться до процесу, що відомий людині вже багато тисяч років, – до доїння. Використання молока доцільно тому, що воно утворюється в організмі тварини у великої кількості і його можна надоювати за необхідністю без шкоди для тварини. Запропоновано новий термін “*біофармінг*”, який належить до процесу отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів.

Одним з основних етапів в отриманні трансгенних тварин, які продукують гетерогенний білок з молоком, є ідентифікація промотору, що буде спрямовувати експресію у секреторний епітелій молочної залози. В наш час виділені промотори α S1-казеїну, β -казеїну, α -лактоальбуміну, β -лактоглобуліну і сироваткового кислого протеїну (WAP).

Серед рекомбінантних білків, отриманих з молока трансгенних тварин, відомі наступні: білок С людини, який запобігає утворенню тромбів; VIII і IX фактори зсідання крові проти гемофілії; тканинний плазмінно-генний активатор,

який використовується для лікування венозних тромбів і емболії легеневої артерії; лактоферин; інтерлейкін-2; альфа-1-антитрипсин для лікування емфіземи легень; моноклональні антитіла для лікування різних форм раку.

Тварини – донори внутрішніх органів для пересадки людині (ксенотрансплантація). Найбільш придатним видом тварин – потенційних донорів є свині. Однак до останнього часу використання свиней в якості донорів розглядалося тільки теоретично, оскільки пересадка їх органів та тканин приматам супроводжувалася відторгненням протягом декількох днів або навіть годин після трансплантації (надгостра реакція відторгнення). Рішенням проблеми зняття такої надгострої реакції відторгнення може стати створення GAL-KO трансгенних свиней з нокаутом гена GGTA1.

Подальші модифікації свиней пов'язують із додатковою експресією генів, що перешкоджають процесу клітинного відторгнення. Незважаючи на те, що досягнення вищезгаданих цілей вимагає проведення нових широкомасштабних досліджень, досягнуті успіхи в нокауті GGTA1 дозволяють вже сьогодні говорити про потенційну значимість GAL-KO свиней у вирішенні деяких завдань трансплантаційної медицини. Зокрема, розглядається їх використання в якості джерела шкіри в терапії опікових ран і як донорів серцевих клапанів.

Тварини – генетичні моделі захворювань людини. Багато хвороб мають спадкову зумовленість. І це стосується не лише моногенних захворювань, що відбуваються внаслідок мутації в якомусь одному певному гені. Часто причиною захворювання є цілий комплекс порушень геному. Для вирішення цих питань все частіше залучаються трансгенні моделі спадкових захворювань людини.

Після того, як виявлений ген, імовірно відповідальний за дане захворювання, можуть бути створені два типи модельних тварин: миші з функціонуючим трансгеном і миші з втратою функції даного гена. Перший тип – це класичні трансгенні миші, в геном яких запроваджено ген людини, відповідальний за конкретне захворювання. Якщо схильність до захворювання залежить від наявності в геномі одного з алелів, то для перевірки цієї гіпотези створюються лінії трансгенних мишей, що несуть різні алелі даного гена. На цих моделях можна досліджувати вплив кількості копій гена і рівня його експресії на прояв захворювання, а також розробляти нові методи лікування. Другий тип модельних тварин – це миші, у яких вимкнений ген, аналогічний тому, що викликає це захворювання у людини. На цій моделі досліджують конкретні функції генів, що особливо важливо для аналізу причин мультигенних захворювань.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

A. Підхід, що дозволяє отримати стійких до захворювань тварин, полягає в _____ в їх геном генів _____, специфічних до тих чи інших збудників інфекційних захворювань. _____ цих генів захистить тварин від хвороботворних мікроорганізмів.

Б. Запропоновано новий термін _____, який належить до процесу отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів.

В. Подальші модифікації свиней пов'язують з додатковою _____ генів, що перешкоджають процесу клітинного _____.

Г. Після того як виявлений ген, імовірно відповідальний за дане захворювання, можуть бути створені два типи _____ тварин: миші з функціонуючим _____ і миші з втратою функції даного _____.

Д. В останні роки кількість господарств, які вирощують _____ самок, зростає. Створення таких самок проводять у два етапи – на першому отримують одностатевих _____, потім, при схрещуванні їх зі звичайними самками, – _____ самок.

Е. Тому в останні роки для прискореного виявлення _____ (з _____-генотипом) в багатьох країнах були розроблені молекулярно-біологічні методи, засновані на _____.

Є. Для збільшення ефективності переносу гена за допомогою _____ (*sperm-mediated gene transfer, SMGT*) запропоновано доповнити метод використанням _____ ферментів.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Підхід, що дозволяє отримати стійких до захворювань тварин, полягає у вилученні з їх геному генів імуноглобулінів, специфічних до тих чи інших збудників інфекційних захворювань. Термінація цих генів захистить тварин від хвороботворних мікроорганізмів.

Б. Складність пов'язана з виділенням і очищенням лікарського білка – бактеріальні клітини йдуть у переробку цілком, і тому важко позбутися від усіх сторонніх домішок у кінцевому продукті.

В. Трансгенна риба також може розглядатися як ефективна модель для вивчення регуляції генів та експресії генів і може в перспективі стати біокомбінатом з виробництва цінних лікарських препаратів.

Г. Антифризні протеїни специфічно адсорбуються усередині організму, де утворюються кристалики льоду, запобігаючи тим самим їх подальшому розростанню, взаємодіють з мембранами клітин, а також здатні пригнічувати процеси рекристалізації.

Д. Отримання трансгенної птиці методом безвірусного трансгенезу, традиційно і широко використовуюваного в птахівництві прийому, виглядає дуже перспективно.

3. Завдання для розрахунку. Існують трансгенні за геном хімозину кролики з промотором казеїну великої рогатої худоби, в молоці яких відзначений високий рівень хімозину і доведена його висока активність. У деяких кролиць в 1 л молока міститься до 15 мг хімозину, за рік від однієї кролиці можна отримати 25 л молока. Якщо врахувати, що з 1 тонни молока корів отримують 100 кг сиру й для

цього потрібно 1 г хімозину, а в Україні за рік вироблюють 80000 т сиру, визначити скільки необхідно утримувати трансгенних кролиць?

4. Головним критерієм при виборі відповідного виду тварин для «генних» ферм у більшості випадків повинен бути необхідний обсяг виробництва. Для виробництва протеїнів у молочній залозі в масштабах тонн доцільно використовувати корів, в сотнях кілограмів – овець і кіз, а в кілограмах – кроликів. На підставі даних таблиці 4 визначити необхідну кількість трансгенних тварин для отримання рекомбінантних білків (РБ).

Таблиця 4

Отримання рекомбінантних білків за допомогою трансгенних тварин

Рекомбінантний білок (РБ)	Трансгена тварина	Молочна продуктивність, кг/рік	Світова потреба у РБ, кг	Рівень експресії РБ у молоці, мг/л	Необхідна кількість трансгенних тварин, шт.
Альбумін	Корова	7000	100000	40,0	
Гормон росту	Коза	500	80	0,07	
Антитромбін	Коза	500	50	2,0	
Фактор зсідання крові ІХ	Миша	0,025	40	30,0	
Тканинний активатор плазмін	Коза	500	6000	3,0	
Фактор зсідання крові ІХ	Коза	700	40	0,0137	
Гормон росту	Корова	7000	80	5,0	
Еритропоетин	Миша	0,025	70	0,3	
Еритропоетин	Кролик	25	70	0,5	
Лізостафін	Корова	7000	500	0,14	
Лізостафін	Миша	0,025	500	1,3	
С1-інгібітор естерази	Кролик	25	3500	1,8	
Фактор зсідання крові ІХ	Свиня	700	40	375,0	
Фактор зсідання крові VIII	Кролик	25	550	0,1	

Слова для словника: біофармінг, таргетинг, ксенотрансплантація, антифризні протеїни, тканеспецифічний промотор, самці-реверсанти, ембріональні химери птахів.

Контрольні запитання

1. Які існують напрямки створення трансгенних тварин?
2. Чому ген гормону росту не виявив ефективність для сільськогосподарських тварин?
3. В яких напрямках змінюють властивості молока?
4. Що визначає поняття біофармінг?
5. Чому доцільно використовувати молоко тварин для створення білків людини або технологічного і фармацевтичного призначення?
6. Що необхідно зробити для того, щоб трансгенні продукти синтезувалися молочною залозою?
7. Які проблеми виникають при здійсненні ксенотрансплантації? В чому полягає значення трансгенних тварин для ксенотрансплантації?
8. Чому застосовують два типи тварин – генетичних моделей захворювань людини?
9. Які напрями створення трансгенних риб досліджуються в наш час?
10. В чому полягає особливість антифризних протеїнів риб? Чому корисно отримання трансгенних лососів з вбудованими генами антифризних протеїнів риб?
11. Які проблеми виникають при створенні трансгенних птахів?
12. Чому недоцільно створювати трансгенну птицю за допомогою ретровірусних векторів?

Лабораторна робота 10. Клітинна інженерія. Моноклональні антитіла

Під впливом на організм тварини антигена, що містить значну кількість *epitopes* (антигенних детермінант, ділянок поверхні антигена, до яких створюються антитіла), клітини імунної системи продукують антитіла до кожного з них, завдяки наявності величезної кількості клонів лімфоцитів, які виробляють антитіла одного типу з вузькою специфічністю. Створюється суміш антитіл, тобто поліклональна сироватка. Спектр антитіл, що виробляються, змінюється під час імунної відповіді, а також при використанні різних тварин.

У результаті соматичної гібридизації (злиття) мієломних клітин (пухлинних клітин лімфоцитарної системи) і В-лімфоцитів, які продукують антитіла після імунізації тварин відповідним антигеном, було отримано клони гібридних клітин – гібридами, які синтезують моноклональні антитіла (*моноАТ*, або *моноати*).

Передумовою для виникнення методу отримання гібридом, які синтезують моноклональні антитіла, була розробка двох методичних підходів:

1) отримання міелом, адаптація їх до умов культивування поза організмом і 2) метод соматичної гібридизації клітин.

Гібридами, що вирощують у судинах для культивування, синтезують 5-10 мкг антитіл на 1 мл середовища. При використанні спеціальних носіїв кількість антитіл можна збільшити до 100 мкг/мл.

Найважливішою властивістю гібридом, яку вони успадкували від міеломних клітин, є їх здатність створювати асцитні пухлини при введенні мишам і синтезувати при цьому до 15 мг антитіл на 1 мл асцитної рідини.

Часто ліки, які використовують при лікуванні певних захворювань, не виявляють необхідну ефективність, що може бути пов'язано з тим, що вони не доходять до органу чи клітини в необхідній концентрації. Для полегшення доставки лікарської речовини до місця дії можна приєднувати її молекули до моноклональних антитіл специфічних до певних ділянок поверхні визначених клітин, наприклад, пухлинних.

Для цього необхідно, щоб моноклональне антитіло було в необхідній кількості і в достатній мірі очищене, зв'язувалося з високоспецифічним білком клітини-мішені і при необхідності було здатне проникати всередину пухлини. У цьому випадку доза лікарської речовини, що необхідна для лікування, значно зменшується, порівняно з безпосереднім використанням.

Першою стадією при отриманні гібридних моноклональних антитіл, які містять два різних центри для зв'язку з антигенами, один з яких спрямований до певного антигену, а інший – до ферменту або лікарської речовини, є створення звичайної гібридом, що синтезує моноклональні антитіла. У подальшому гібридому, яка виконує роль міеломної клітини, зливають з лімфоцитами, що отримали при імунізації мишей другим антигеном (ферментом або лікарською речовиною). В результаті злиття і відбору створюється вторинна гібридома, яка здатна синтезувати антитіла подвійної специфічності (рис. 8).

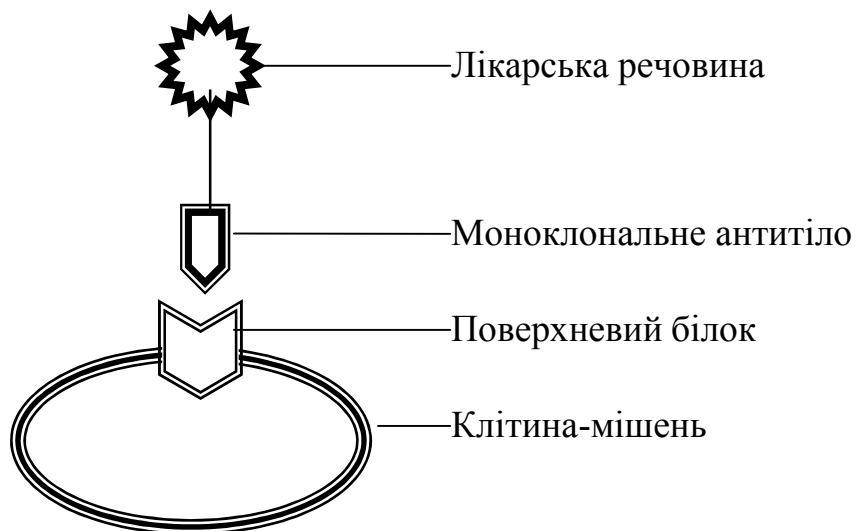


Рис. 8. Схематичне зображення системи цільової доставки лікарської речовини з використанням моноклональних антитіл

Поряд з безсумнівними перевагами, моноклональні антитіла мають і недоліки. Вони не стабільні при зберіганні у висушеному вигляді, в той час суміш звичайних (поліклональних) антитіл завжди містить групу антитіл стійких при обраних умовах. Моноклональні антитіла часто мають надто низьку спорідненість до антигена і надмірно вузьку специфічність, що перешкоджає їх використанню проти мінливих антигенів, які характерні для інфекційних агентів і пухлинних клітин.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Ділянки поверхні антигену, до яких створюються антитіла мають назву _____, або _____.

Б. В результаті _____ (злиття) _____ клітин (пухлинних клітин лімфоцитарної системи) і В-лімфоцитів, які продукують антитіла після імунізації тварин відповідним антигеном, були отримані клони гібридних клітин – _____.

В. Найважливішою властивістю гібридом, яку вони успадкували від _____ клітин, є їх здатність створювати _____ пухлини при введенні мишам.

Г. _____, яка виконує роль _____ клітини, зливаються з лімфоцитами, що отримали при імунізації мишей другим антигеном (ферментом або лікарською речовиною). В результаті злиття і відбору створюється _____, яка здатна синтезувати антитіла подвійної специфічності.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. У мишей достатньо легко можна отримати міеломи. Ці пухлини є нащадками однієї клітини (тобто мають моноклональне походження). Пухлини індукують у тварин шляхом внутрішньочеревного введення мінеральних олій або інертного твердого пластику. Однак необхідні міеломи вдалося отримати лише в двох лініях мишей.

Б. Міеломні клітини здатні розмножуватися на поживному середовищі, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (ГАТ – середовище). Тобто міеломні клітини є ауксотрофами – клітинами-мутантами, які мають певну ділянку гена, що відповідає за синтез ферменту необхідного для підтримки процесів життєдіяльності клітини у селективному середовищі.

В. Важливою особливістю клонування є те, що воно дозволяє не лише позбавитися від клітин, що втратили здатність синтезувати антитіла, але і дозволяє відібрати клони необхідної специфічності зі стабільними спадковими властивостями.

Г. Першою стадією отримання гібридних моноклональних антитіл, що поєднують властивості різних міелом, наприклад, здатність синтезувати

ферменти або лікарські речовини, є створення мієломи, що синтезує моноклональні антитіла.

Д. Найбільш широко використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Якщо до антитіл приєднати радіоактивні або магнітоактивні матеріали й увести їх у живий організм, то можна виявити в ньому патологічні зони.

Е. Для визначення структури вірусних геномів використовують моноанти. Певне антитіло здатне зв'язуватися з певною антигенною детермінантою, або певною речовиною, яку синтезує вірус. Знаючи структуру антитіла, можна з'ясувати фізико-хімічні властивості антигена і на підставі цього вилучити ділянку гена, що відповідає за синтез антигена.

3. Вам необхідно отримати достатню кількість плазміну – лікарського засобу для руйнування фібриногену і запобігання виникнення захворювання тромбоемболія (закупорка артерій), однак треба враховувати, що плазмін може руйнувати і фібрин, а це може викликати внутрішню кровотечу. Яку стратегію створення і використання плазміну Ви будете вибирати? Вкажіть стадії процесу.

Слова для словника: проліферація, пасирування, тотипотентність, контактне гальмування, адгезія, міогени, халогени, межа Хейфліка, гібридизація соматичних клітин, полікаріони, гомокаріони, гетерокаріони, синкаріони, клітини – ауксотрофи, антигенні детермінанти, мієлома, гібридома, моноклональне антитіло.

Контрольні запитання

1. Яким чином ініціюють злиття клітин тваринного походження?
2. Які клітини називають гетерокаріонами, гомокаріонами, синкаріонами?
3. Які існують середовища для культивування клітин тваринного походження?
4. Параметри, що характеризують поведінку клітин у культурі?
5. Які існують гіпотези, що пояснюють загибель клітин тваринного походження?
6. Що таке гібридома? З яких клітин вона побудована?
7. В чому перевага моноклональних антитіл перед поліклональними сироватками?
8. Які клітини називають ауксотрофами? Чому мієломні клітини повинні бути ауксотрофами?
9. Що таке епітоп?
10. З яких етапів складається схема отримання гібридом?
11. Які гібридоми називають вторинними?
12. У чому полягає особливість моноатів подвійної специфічності?

Лабораторна робота 11. Ембріоінженерія. Кріоконсервація ембріонів

Нині трансплантація є ефективним методом створення високопродуктивних стад сільськогосподарських тварин. Використовуючи трансплантацію зигот від високопродуктивних корів протягом року можна одержувати понад 60 телят. У США цим методом одержують від 100 до 500 тисяч телят щорічно. Виробничим методом стала трансплантація зигот у тваринництві ряду європейських країн. Трансплантація ембріонів у тваринництві дозволяє підвищити рівень інтенсивності використання видатних маток, інтенсифікувати використання їх генетичного потенціалу, як штучне осіменіння забезпечує підвищення інтенсивності використання цінних плідників, їх генетичних ресурсів. Трансплантація ембріонів є біотехнічним методом інтенсифікації відтворення високопродуктивних тварин.

Метод трансплантації ембріонів дозволяє отримувати більшу кількість однорідного потомства від високопродуктивних тварин та цінних генотипів, швидко і широко розповсюджувати рідкісні та зникаючі породи, прискорено створювати високопродуктивні селекційні стада, інтенсифікувати розмноження маточного поголів'я шляхом пересадки зародків відомої статі, збільшувати вихід телят шляхом пересадки двох ембріонів з метою отримання близнюків, створювати банк ембріонів і накопичувати генетичний матеріал з метою наступного транспортування і трансплантації у заплановані стада тощо.

Основні етапи проведення трансплантації ембріонів з метою одержання якнайбільше нащадків під однієї тварини такі: підбір донорів статевих клітин; суперовуляція; запліднення, виймання і оцінка ембріонів; культивування та зберігання ембріонів; пересадка ембріонів реципієнтам.

З погляду селекціонера **відбір донорів** – це цілеспрямований вибір корів, які характеризуються високими показниками молочної продуктивності. Але для біотехнолога такі особини повинні позитивно реагувати на гормональну обробку й давати біологічно повноцінні ембріони. Найважливішим критерієм при доборі є висока племінна цінність тварини. Критерій для корів молочних порід – 7-12 тис. кг молока в рік жирністю 3,6-4,3%.

Оцінка корів-донорів за власною продуктивністю охоплює 2 лактації, що підвищує міру її надійності. Крім того, враховують результати оцінки за продуктивністю батька і матері донора.

Добір донорів-матерів майбутніх бугаїв проводять ще більш ретельно. Крім рівня молочної продуктивності і жирномолочності, використовують ряд додаткових ознак: властивості молоковіддачі, форму вимені і сосків, спадкоємну схильність до маститу, вміст білка в молоці, показники відтворної функції за кілька отелень, міцність кістяка і копит.

Щодо **вибору реципієнтів**, яким трансплантують ембріони, одержані від донорів, використовують гінекологічно здорових корів після двох-трьох нормальних статевих циклів. При цьому їх племінні й породні якості вирішального значення не мають. Як правило, це телиці 16-18-місячного віку живою масою 360-380 кг.

Стимуляція суперовуляції. Самки ссавців народжуються з великою (кілька десятків і навіть сотень тисяч) кількістю статевих клітин. Більшість з них поступово гинуть. Однак, практично всі фолікули, що ростуть, реагують на гонадотропну стимуляцію, яка створює умови для їх дозрівання. Обробка самок гонадотропінами у фолікулярній фазі статевого циклу або в лютеїновій фазі циклу в сполученні з індукуванням регресії жовтого тіла простагландином Φ_2 (ПГ Φ_2) або його аналогами викликає численну овуляцію або так звану *суперовуляцію*.

Для стимуляції поліовуляції у корів поряд з сироваткою жеребних кобил (СЖК), тривалість впливу якої складає до 100 год., застосовують гіпофізарні гонадотропіни. З цією метою використовують очищений фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) окремо або разом з лютеїнізуючим гормоном (ЛГ). На відміну від СЖК препарати ФСГ і ЛГ вводять двічі на день протягом 4-5 діб.

Для *штучного осіменіння* корів-донорів використовують тільки сперму від видатних бугаїв-плідників, оцінених за якістю нащадків, дочка яких на 1,5-2,0% перевищують за продуктивністю середню по популяції. Запліднювальна здатність сперми таких бугаїв повинна бути не менше 70% при високій точності її оцінки. Осіменяють корів-донорів подвійною порцією сперми.

У зв'язку з тим, що терміни овуляції гормонально оброблених тварин збільшуються, змінюється і технологія їх запліднення. Спочатку рекомендувалося багаторазове запліднення корів з використанням декількох доз сперми. Звичайно вводять 50 млн живих сперматозоїдів з початку охоти і через 12-20 годин осіменіння повторюють.

Можливі три способи *вилучення ембріонів* – після забою корови-донора, хірургічним і нехірургічним шляхом.

Хірургічний спосіб полягає в лапаротомії по білій лінії черева з використанням загальної анестезії. Ембріони вилучають, вимиваючи їх з матки. Нині цим способом користуються з науковою метою для одержання та пересадки ембріонів на дуже ранніх стадіях розвитку.

Вилучення ембріонів нехірургічним шляхом – найбільш поширений у практиці спосіб. Основна його перевага – це простота виконання. Ембріони вилучають переважно на 7-8-у добу після осіменіння донора.

В овець і свиней нехірургічне вилучення ембріонів неможливе внаслідок труднощів при проходженні катетера через шийку в роги матки. Однак, хірургічна операція для цих видів тварин відносно проста і нетривала.

Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для трансплантації. Тому їх необхідно *оцінити* за деякими морфологічними ознаками.

Морфологічну якість ембріонів визначають під мікроскопом при 100-160-кратному збільшенні. Встановлюють стадії їхнього розвитку (ранні та пізні морули і бластоцисти), а також оцінюють якість (відмінну, добру, задовільну). Розрізняють умовно придатні та непридатні до трансплантації ембріони. В промивальній рідині можуть виявитися і яйцеклітини, що свідчить про відсутність запліднення.

Морула – це скупчення бластомерів, які не завжди однакові за розмірами через асинхронність дроблення. Цитоплазма бластоцитів гомогенна, вони мають полігональний зв'язок. Перивітеліновий простір вільний від гранул і включень. Товщина прозорої оболонки 15 мк.

У ранньої бластоцисти (6,5-7 діб) добре видно бластопорожнину, реєструється диференціювання клітин на трофобластичні та ембріобластичні. Перивітеліновий простір вузький, а прозора оболонка має товщину 15 мк.

Пізня бластоциста (8 діб) відрізняється від ранньої тим, що вона має суцільні клітини трофобласта і велику порожнину, яка займає майже всю площу перивітелінового простору. Прозора оболонка витончена і розтягнута. З 9-го дня у бластоцист прозора оболонка відсутня і добре виражена порожнина.

Ембріони з частковою дегенерацією характеризуються несиметричним розміщенням і різними розмірами бластомерів. У бластомерів може виявитися частковий розпад, порушення зв'язку, відсутність ділення у двох або трьох.

У бластоцист часто реєструється збільшення об'єму перивітелінового простору, стискування бластопорожнини, частковий розпад клітин трофобласта. Прозора оболонка має невеликі тріщини. Такі ембріони умовно придатні до трансплантації.

Дегенеровані ембріони на 3-4 ділення дроблення відстають від нормального розвитку. Вони характеризуються розпадом бластомерів, зміщенням і фрагментацією цитоплазми, яка виявляється у перивітеліновому просторі. Прозора оболонка має значні дефекти: тріщини, розшарування, розриви. Такі ембріони вибраковують (табл. 5).

Таблиця 5

Шкала оцінки якості морул і бластоцист

Стадія розвитку	Морфологічна характеристика	Оцінка	Бали
Морула рання (Мо I), Морула пізня (Мо II)	Округла форма, прозора оболонка ціла, перивітеліновий простір прозорий, бластомери чіткі, однакових розмірів з полігональним зв'язком, цитоплазма має дрібнозернистий вигляд, рівномірно заповнює цитоплазматичну оболонку.	Відмінно	5
	У перивітеліновому просторі є гранули, включення, бластомери неоднакових розмірів, розміщені не симетрично, дещо стиснуті.	Добре	4
	У перивітеліновому просторі – гранули, включення, незначне стискання бластомерів, руйнування окремих бластомерів, “частковий зародок.”	Задовільно	3
	Деформація прозорої оболонки, часткове руйнування бластомерів, порушення зв'язків між ними, фрагментація цитоплазми, стискування бластомерів.	Умовне придатні	2
	Невідповідність стадії розвитку, віку ембріона, дефекти прозорої оболонки (тріщини, відколки),	Не	1

	розпад бластомерів, сильне їхнє стискування.	придатні	
Бластоциста рання (Бл I), Пізня (Бл II)	Округла форма, прозора оболонка має однакову товщину на всьому протязі, перивітеліновий простір вузький, прозорий, чітко диференційовані клітини трофобласта і ембріобласта, з добре вираженою бластопорожниною.	Відмінно	5
	Зона пелюцида сплющена, перивітеліновий простір відсутній, порожнина бластоцисти велика, має гладеньку поверхню, чітку диференціацію клітин.	Добре	4
	Порожнина бластоцисти не виражена, в перивітеліновому просторі – гранули, включення, клітини трофобласта дещо стиснуті. Перивітеліновий простір – збільшений, має включення, гранули; бластопорожнина не виражена, немає диференціації між клітинами трофобласта і ембріобласта.	Задовільно	3
	Дефект прозорої оболонки (тріщини), гранули, клітинні ферменти в перивітеліновому просторі, часткове руйнування клітин, стиснуті бластомери.	Умовно придатні	2
	Значний дефект прозорої оболонки, руйнування бластомерів.	Непридатні	1

На сучасному рівні техніки трансплантації рекомендують **пересаджувати ембріони** одразу після вилучення їх з рогів матки донора й оцінки. При цьому також використовують методи хірургічної і нехірургічної пересадок.

Ефективність пересадки ембріонів у значній мірі визначається синхронністю прояву охоти донора і реципієнта. У великої рогатої худоби максимальне число вагітностей одержують після синхронного пересадження.

Уведення ембріонів в обидва роги матки забезпечує високу ефективність пересадження.

Нехірургічне пересадження ембріонів розроблене також для кобил. Висока ефективність нехірургічного пересадження ембріонів у коней була досягнута між 6-м і 8-м днями після овуляції.

У овець і свиней пересадження ембріонів проводять тільки хірургічним способом. У реципієнтів використовується аналогічний хірургічний підхід, як і в донорів. Ембріони пересаджують у яйцепровід або матку, залежно від стадії розвитку.

На 60-ту добу після пересадки ембріонів реципієнтів досліджують на тільність ректально. При правильному використанні метод нехірургічної пересадки забезпечує тільність у 50-60% реципієнтів. Деякі спеціалісти досягають 50-70% тільності при пересадці свіжоотриманих ембріонів.

Глибоке заморожування або **кріоконсервація ембріонів** у рідкому азоті має велике практичне значення. При цьому немає необхідності утримувати велику кількість телиць-реципієнтів та синхронізувати у них охоту. Спрощується транспортування ембріонів на будь-які відстані та торгівля цінним генетичним матеріалом, зникає необхідність здійснення карантинних заходів на кордоні, оскільки інфекційні хвороби не передаються через ембріони, не витрачається час для адаптації тварини, яка була перевезена з іншої країни, тому що „адаптаційні процеси” відбуваються протягом розвитку трансплантованого ембріона під час вагітності тварини-реципієнта. Виникають умови для створення банків ембріонів, у тому числі і для зберігання генофонду зникаючих видів тварин.

Для тривалого збереження ембріонів необхідно не тільки загальмувати їх розвиток, але і значно знизити або цілком зупинити обмінні процеси. Такий стан ембріонів досягається при температурі -195°C або нижче.

Але при заморожуванні ембріонів нижче 0°C в них можуть виникати наступні пошкодження:

- створюватися кришталіки льоду;
- зникати вода;
- збільшуватися концентрація розчинених речовин у клітині (тобто осмотичний шок).

При дуже повільному заморожуванні кристали льоду не утворюються, але спостерігається зневожування клітини, швидке заморожування викликає утворення кристалів. Для вирішення цієї проблеми використовують кріопротектори, які поділяють на дві групи:

- внутрішні – це ті, які вводять усередину клітини для запобігання створення льоду. В якості таких кріопротекторів використовують диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь, етанол та ін.
- зовнішні кріопротектори нездатні потрапляти всередину ембріона, але вони запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє всередину клітини, а внутрішній кріопротектор виходить назовні повільно, що викликає набухання і пошкодження ембріона. В якості зовнішніх кріопротекторів використовують полівінілпірралідон (ПВП), а в основному – розчин сахарози.

Вітрифікація. Значним спрощенням процедури кріоконсервації ембріонів ссавців є метод вітрифікації, який є легким у застосуванні, швидким у виконанні, не потребує контролю зміни температур. Головною властивістю вітрифікаційної суміші є висока концентрація проникаючих (внутрішніх) кріопротекторів, які при низьких температурах стають желеподібними і в результаті застигають у склоподібній формі.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

A. Метод _____ дозволяє отримувати більшу кількість однорідного потомства від високопродуктивних тварин та цінних генотипів.

- Б.** Обробка самок _____ у фолікулярній фазі статевого циклу або в лютеїновій фазі циклу в сполученні з індукуванням регресії жовтого тіла простагландином Φ_2 (ПГ Φ_2) або його аналогами викликає численну овуляцію або так звану _____.
- В.** Вилучення ембріонів _____ шляхом – найбільш поширений у практиці спосіб.
- Г.** Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для _____. Тому їх необхідно оцінити за деякими морфологічними ознаками.
- Д.** Ефективність пересадки ембріонів значною мірою визначається _____ прояву охоти донора і реципієнта.
- Е.** Глибоке заморожування або _____ у рідкому азоті має велике практичне значення.
- Є.** _____ нездатні потрапляти всередину ембріона, але вони запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє всередину клітини.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

- А.** Вилучення ембріонів нехірургічним шляхом – найбільш поширений у практиці спосіб. Основна його перевага – це простота виконання. Ембріони вилучають переважно на 10-12-у добу після осіменіння донора.
- Б.** У овець і свиней пересадження ембріонів проводять тільки нехірургічним способом. У реципієнтів використовується аналогічний нехірургічний підхід, як і в донорів. Ембріони пересаджують у яйцепровід або матку в залежності від стадії розвитку.
- В.** Для тривалого збереження ембріонів необхідно не тільки загальмувати їх розвиток, але і значно знизити або цілком зупинити обмінні процеси. Такий стан ембріонів досягається при температурі -195°C або нижче.
- Г.** При дуже повільному заморожуванні утворюються кристали льоду, спостерігається зневожування клітини, швидке заморожування не зумовлює утворення кристалів.
- Д.** Головною властивістю вітрифікаційної суміші є висока концентрація проникаючих (внутрішніх) кріопротекторів, які при низьких температурах стають желеподібними і в результаті застигають у склоподібній формі.

Завдання 3. За допомогою схем, що наведені на рис. 9, підпишіть біля фотографій ембріонів відповідний номер опису ембріонів: стадію розвитку, вік і оцінку за морфологічною шкалою оцінки якості (табл. 6).



Схема ранньої морули

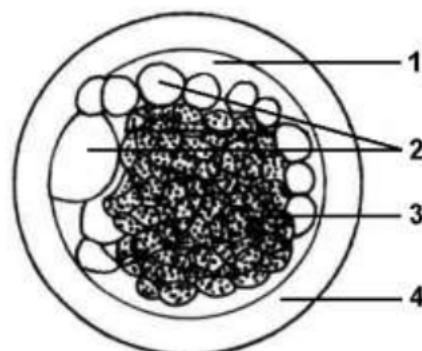


Схема пізньої морули

1. Перивітеліновий простір;
2. Екстра-ембріональний клітинний матеріал;
3. Бластомери;
4. Зона пеллюціда

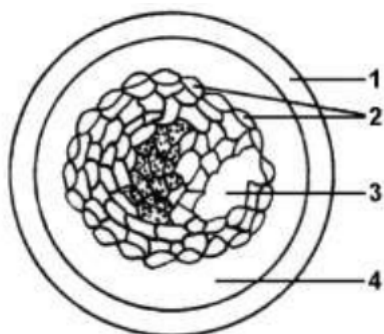


Схема ранньої бластоцисти

1. Зона пеллюціда
2. Клітини трофобласта
3. Бластоціль
4. Перивітеліновий простір

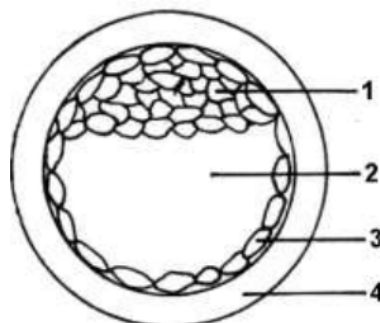


Схема експандованої бластоцисти (Бл III)

1. Клітини ембріобласта
2. Бластоціль
3. Клітини трофобласта
4. Зона пеллюціда

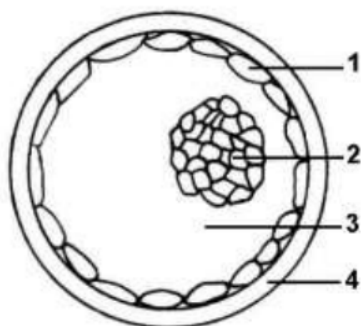


Схема повністю експандованої бластоцисти (Бл IV)

1. Клітини трофобласта
2. Клітини ембріобласта
3. Бластоціль
4. Зона пеллюціда

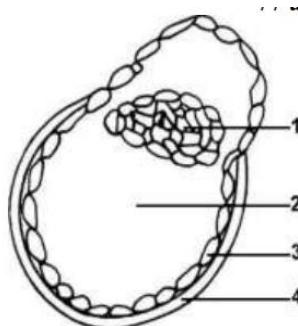
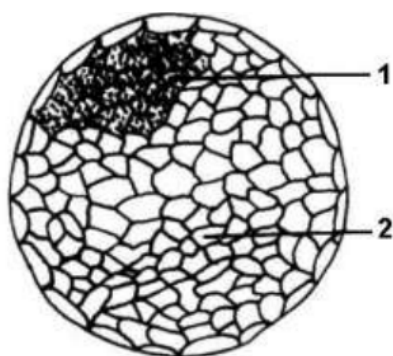


Схема бластоцисти, що виходить з зони пеллюціда (Бл V)

1. Клітини ембріобласта
2. Бластоціль
3. Клітини трофобласта
4. Зона пеллюціда



**Схема експандованої бластоцисти,
що вийшла з зони пеллюціда (Бл VI)**



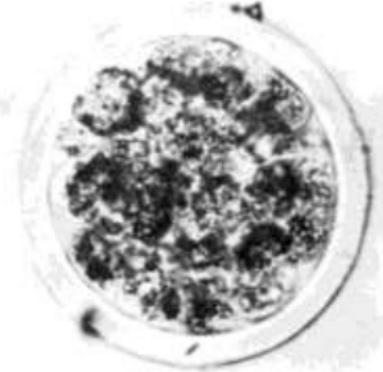

1. Клітини ембріобласта
2. Клітини трофобласта

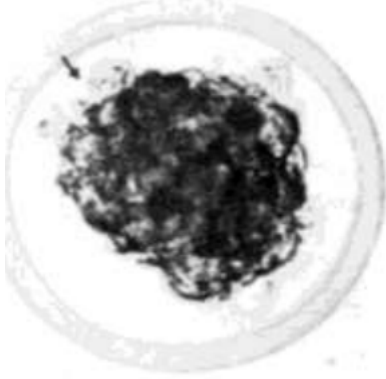
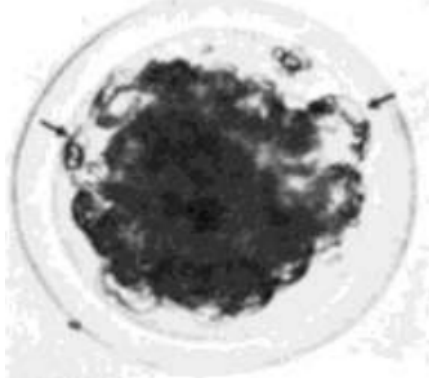
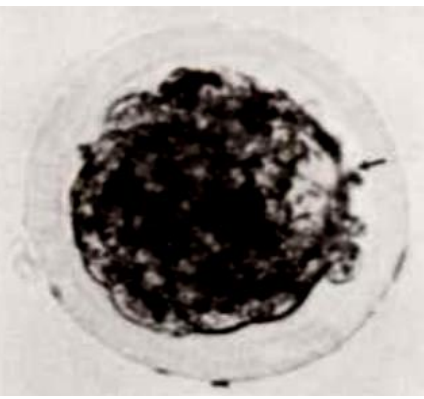

Рис. 9. Схеми стадій розвитку ембріонів



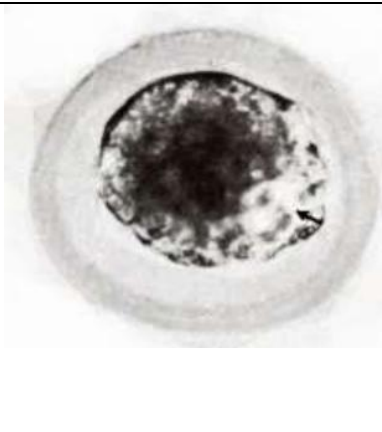
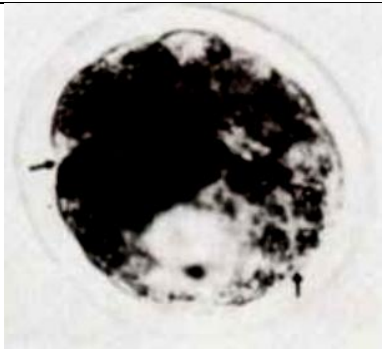
Таблиця 6

Фотографії з оцінки якості ембріонів великої рогатої худоби

Фотографії ембріонів	Відповідний № опису ембріонів	Описання ембріонів
1.		1. 7 день Пізня морула (Мо II) Близько 15% дефектних бластомерів (вказано стрілкою) Компактизація закінчена Бластомери однакові за величиною Чіткі клітинні межі Ембріон доброї якості, придатний для трансплантації
2.		2. 7 день Експандована бластоциста (Бл III) Спадається клітинний матеріал Близько 10% пошкоджених бластомерів (вказано стрілкою) Ембріон доброї якості, придатний для кріоконсервації
3.		3. 7 день Рання бластоциста (Бл I) Утворення трофобласта по периферії крайніх бластомерів Виникнення бластоцілі (вказано стрілкою) Перивітеліновий простір вільний від окремих бластомерів, плазми та інших включень Ембріон відмінної якості, придатний для трансплантації

<p>4</p> 		<p>4. 7 день Пізня бластоциста (Бл II) Близько 50% дефектних бластомерів Ембріобласт чітко виражений (вказано стрілкою) Бластоциль збільшується Клітинні межі виразні Ембріон задовільної якості, придатний для трансплантації</p>
<p>5</p> 		<p>5. 6 день Рання морула (Mo I) Компактизація ще не закінчена, міжклітинні зв'язки добрі, Перивітеліновий простір вільний від окремих бластомерів і плазми, бластомери однакові за величиною, клітинні межі виразні, рівномірний розподіл цитоплазматичних гранул. Ембріон відмінної якості, придатний для трансплантації</p>
<p>6</p> 		<p>6. 6-7 день Пізня морула (Mo II) Процес компактизації завершений Скупчення клітин рівномірне Крайні бластомери однакові за величиною і наповненням Перивітеліновий простір вільний від окремих бластомерів, плазми та інших включень Ембріон відмінної якості, придатний для трансплантації</p>
<p>7</p> 		<p>7. 8 день Бластоциста, що виходить з зони пеллюціда (Бл V) Ембріобласт чітко виділяється Трофобласт правильної форми Клітинні зв'язки хороші Клітинні межі виразні Ембріон відмінної якості, але в такому стані для трансплантації придатний умовно</p>

<p>8.</p> 		<p>8. 8 день Повністю експандована бластоциста (Бл IV) Ембріобласт локалізований і чітко відмежований Ембріон відмінної якості, придатний для трансплантації</p>
<p>9.</p> 		<p>9. 7 день Пізня бластоциста (Бл II) Утворення трофобласта Бластоциль збільшена Перивітеліновий простір ще не помітний і вільний від окремих бластомерів, плазми та інших включень Ембріон відмінної якості, придатний для трансплантації</p>
<p>10.</p> 		<p>10. 6 день Рання морула (Мо I) Міжклітинні зв'язки порушені Ембріон задовільної якості, умовно придатний для трансплантації</p>
<p>11.</p> 		<p>11. 7 день Рання бластоциста (Бл I) Близько 50% дефектних бластомерів різного розміру, Спостерігається перетяжка (вказано стрілкою) Трофобласт добрий Ембріон задовільної якості, придатний для трансплантації</p>

<p>12.</p> 		<p>12. 7 день Рання бластоциста (Бл I) Збільшення бластоцїлі (вказано стрїлкою) Ембріон відмінної якості, придатний для кріоконсервації</p>
<p>13.</p> 		<p>13. 7 день Рання морула (Мо I) Порушення міжклїтинних зв'язків (вказано стрїлкою) У перивїтелїновому просторї є окремі бластомери Ембріон задовільної якості, придатний для трансплантації</p>
<p>14.</p> 		<p>14. 8 день Експандована бластоциста (Бл III) Сталося стиснення клїтинного матеріалу, загальний стан незадовільний Трїщина в зонї пеллюїда Ослаблення клїтинних зв'язків Клїтинні межї не виразні Ембріон незадовільної якості, що не придатний для трансплантації</p>
<p>15.</p> 		<p>15. 1-2 день Ембріон in vitro на 2-х клїтинній стадїї Численні спермії на зовнішній поверхні зони пеллюїда (видно різницю в розмірах ембріона і сперміїв)</p>

Слова для словника: суперовуляція, кріоконсервація ембріонів, кріопротектори, вітрифікація.

Контрольні запитання

1. Перерахуйте основні етапи трансплантації ембріонів.
2. Які основні вимоги висуваються до корів-донорів ембріонів?
3. Які основні вимоги висуваються до корів-реципієнтів ембріонів?

4. Вкажіть препарати, за допомогою яких викликають суперовуляцію у корів. У чому полягає різниця їх застосування?
5. Які існують способи вилучення ембріонів?
6. Вкажіть показники, за якими здійснюють оцінку життєздатності вилучених ембріонів,
7. Які існують методи пересадки ембріонів?
8. У чому полягає значення кріоконсервації ембріонів?
9. Для вирішення яких проблем при кріоконсервації ембріонів застосовують внутрішні та зовнішні кріопротектори?
10. У чому полягає особливість процесу вітрифікації при кріоконсервації ембріонів?

Лабораторна робота 12. Отримання монозиготних близнюків. Культивування ембріонів *in vitro*

Одним із перспективних прийомів клітинної інженерії у тваринництві є отримання генетично ідентичних близнюків. Ідентичні або монозиготні, близнюки, отримані з однієї заплідненої яйцеклітини – зиготи, мають однаковий генотип.

Одержання однойцевих близнюків має велике значення для тваринництва:

- збільшується вихід телят від одного донора,
- з'являються генетично ідентичні двійні,
- полегшується оцінка бугаїв за якістю нащадків,
- зменшується вартість спермопродукції,
- генетично ідентичні копії ембріонів і телят можна успішно застосовувати у дослідженнях з вивчення взаємодії «генотип-середовище»,
- використання монозиготних близнюків для оцінки м'ясних якостей шляхом забою одного близнюка і переносу отриманих даних на іншого,
- після розподілу ембріона одну половинку можна кріоконсервувати, а іншу – пересадити реципієнтові. При позитивних результатах оцінки отриманих нащадків половинку, що залишилася, можна буде використовувати у селекційному процесі.

У практиці використовують два способи розділення ембріонів – перев'язуванням і розрізанням. У першому випадку зародки відбирають за допомогою мікроманіпулятора, не порушуючи прозорі оболонки, потім перев'язують їх синтетичною ниткою діаметром 15 мкм посередині. Розподілені половини окремо дробляться, утворюючи зародки.

Ембріони також розрізають скляною мікроголкою діаметром 10-15 мкм навпіл або на більшу кількість частин.

Розподілення ембріонів мікроголкою, на відміну від мікроскальпеля, дає змогу одержувати частини зародків із найменшою кількістю пошкоджень. Це зумовлено тим, що голка не має гострих та ріжучих боків і під час розділення зародка на частини вона лише розриває зв'язки між бластомерами, а не розрізає їх як лезо.

Після розподілу ембріона на дві частини одержані половинки переносять у термостат і культивують протягом 3-х год. Якщо за цей час половинки зародків *компактизувалися* (набули кулькоподібну форму), їх пересаджують реципієнтам без попереднього внесення у *зону пелюціда* (прозора оболонка, що вкриває ооцит, на поверхні якої розташовані рецептори для розпізнавання сперміями; після запліднення сприяє процесу прикріплення ембріона у статевих шляхах самки).

Нещодавно розроблено новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що розширюється, (поблизу від внутрішньоклітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася.

Дослідженнями встановлено, що для розподілу ембріонів найбільш придатні пізні морули і ранні бластоцисти або бластоцисти, що розширюються. Ембріони даних стадій розвитку вимивають із рогів матки на 6-8-у добу після запліднення донорів.

При визначенні якості половинок враховують їх розміри, ступінь компактизації і формування бластоцілі.

1. До відмінних половинок відносять рівні за розмірами частини ($1/2 + 1/2$) і половинки, що мають великі розміри ($2/3$, $3/4$), що цілком компактизувалися протягом 30-хвилинного культивування. Через 3 години культивування такі половинки мали виражену бластоціль.

2. У гарних половинок також є бластоціль, але вони незначно відрізняються своїми розмірами ($<1/2$) і мають ще не цілком округлу форму.

3. Задовільні половинки значно відрізняються за своїми розмірами ($1/3$, $1/4$), характеризуються слабо вираженою компактизацією і відсутністю бластоцілі.

4. Дегенеровані половинки не компактизуються, мають багато зруйнованих клітин і виглядають пухкими через руйнування міжклітинних зв'язків між бластомерами.

Отримані дані свідчать, що у порівнянні з пересадженням цілих ембріонів, трансплантація свіжоотриманих половинок сприяє збільшенню кількості народжених телят на 40-60%.

Для одержання четвертинок ембріонів компактизовані половинки поділяють ще раз на дві частини.

Після оцінки стану четвертинки ембріонів, які визнані придатними для подальшого розвитку, пересаджують до порожніх зон пелюціда.

Як показали дослідження, наявність прозорої оболонки не є необхідною для подальшого розвитку половинок пізньої морули або бластоцисти. Значення прозорої оболонки для подальшого розвитку розділеного ембріона зростає при трансплантації чверті ембріона.

Важлива роль прозорої оболонки відзначена в дослідах, що продемонстрували можливість кріоконсервування половинок 7-денних ембріонів великої рогатої худоби. Половинки пізніх морул або бластоцист великої рогатої худоби, кріоконсервованих без оболонки, були непридатні для

пересадження. Пересадження заморожено-відтаяних половинок відмінної і гарної якості, що знаходилися в одній оболонці, індукувало тільність у 25,0% реципієнтів, поміщення ж половинок у додаткову прозору оболонку бластоцист, що вилупилися, призвело до тільності 46,2% реципієнтів. Таким чином, поміщення напівембріонів у додаткову оболонку є ефективним методом збереження їхньої життєздатності при кріоконсервуванні.

Альтернативою суперовуляції у корів-донорів є методи **культивування *in vitro***, що дозволяють отримувати значну кількість дешевих ембріонів. Методи дозрівання ооцитів і запліднення яйцеклітин сільськогосподарських тварин *in vitro* дають змогу отримувати зиготи та ембріони на різних стадіях їх розвитку (від 2-х клітинних до бластоцисти).

В Україні перші телята-трансплантанти з ембріонів, вирощених *in vitro* були одержані в результаті спільних досліджень науковців Інституту тваринництва НААН та Інституту розведення та генетики тварин НААН.

Технологія культивування ембріонів *in vitro* включає збір яєчників від вибракуваних корів при забої, їх перевезення в лабораторію, відбирання ооцитів, дозрівання, запліднення, забезпечення раннього розвитку в спеціальних культурних середовищах, заморожування й створення банків цінних генотипів.

Однією із перспективних методик у скотарстві щодо ефективнішого використання величезного запасу гамет самок, закладеного в яєчниках, є багаторазова нехірургічна трансвагінальна аспірація незрілих ооцитів (OPU – ovum pick-up). Цей біотехнологічний метод має низку переваг, а саме дає можливість одержання ооцитів від нестатевозрілих телиць, починаючи з 5-6-місячного віку, що істотно скорочує генераційний інтервал, від так званих «проблемних донорів» – генетично цінних тварин, які з різних причин не можуть бути використані для відтворення та від тільних тварин без загрози втрати плода; він дешевший і має вищу повторюваність порівняно з суперовуляцією, дає можливість від однієї тварини-донора одержати в 4 рази більше придатних ембріонів для нехірургічної трансплантації.

Хоча більшість ооцитів, вилучених з фолікулів яєчників, відновлюють мейоз і досягають метафази II, їх запліднення часто не забезпечує повноцінного розвитку зародків. Припускають, що основною причиною цього є неповноцінне дозрівання ооцитів.

У зв'язку з тим, що стероїдні гормони й інші фактори, що продукуються фолікулярними клітинами, впливають на дозрівання ооцитів, було зроблено припущення, що культивування ооцитів з фолікулярними клітинами може підвищити їх здатність до нормального запліднення і наступного ембріонального розвитку. Багато явищ усередині фолікула, включаючи біосинтез стероїдів і синтез білків, регулюють гонадотропні гормони. Тому при культивуванні ооцитів усередині фолікулів або з фолікулярними клітинами вони повинні бути обов'язковою складовою частиною середовища.

Важливим етапом у розробці методу запліднення *in vitro* в ссавців було відкриття явища капацитації спермій. Термін *капацитация* означає, що в

спермії повинні відбутися деякі фізіологічні зміни до того, як сперматозоїд набуде здатність до запліднення.

Капацитація включає початкову зміну мембрани спермія, що дозволяє йому пройти другу фазу (акросомну реакцію).

Розроблено кілька методів капацитації еякуйованих сперміїв домашніх тварин. Для видалення білків з поверхні сперміїв, які, очевидно, гальмують їх капацитацію, було використано:

- середовище з високою іонною силою;
- центрифугування,
- метод *swim-up*, що полягає у спливанні сперміїв з активним поступальним рухом із дна пробірки у поверхневий шар чистого середовища і дозволяє відбирати найбільш життєздатні гамети,
- Іонофор А23187 є ефективним індуктором капацитації й акросомної реакції сперматозоїдів ссавців,
- фолікулярна рідина корів,
- розчин гепарину.

При проведенні досвідів по заплідненню *in vitro* велике значення має:

- концентрація сперматозоїдів під час запліднення, найбільша кількість пенетрованих ооцитів спостерігалось при концентрації $1 \cdot 10^6$ Сп/мол.
- тривалість спільної інкубації зі сперматозоїдами. Найвищий відсоток дроблення був отриманий після 24-годинного запліднення.

Пенетрація (проникнення через оболонку) яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них сперматозоїдів за допомогою заточеної мікропіпетки. Цей спосіб запліднення жіночих гамет, при якому капацитація й акросомна реакція сперматозоїдів не є необхідними, має ту перевагу, що дозволяє використовувати для запліднення не тільки нормальні, але і нерухомі, мертві, дефектні сперматозоїди або їх голівки.

Є також методи мікрomanipуляцій з дозрілими ооцитами тварин, засновані на порушенні цілісності їх прозорої оболонки з наступним перенесенням жіночих гамет у суспензію капацитованих сперматозоїдів. Вони полягають у проколюванні (або просвердлюванні) прозорої оболонки або її механічному «частковому розсіченні» (*partial zona dissection – PZD*). Проколювання оболонки здійснюють за допомогою мікроголки, просвердлювання – під впливом кислого розчину (наприклад, розчину Тирорде, рН 2-3), що виділяється з кінчика мікропіпетки.

Метод часткового розсічення прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів може бути використаний для подолання незапліднюваності яйцеклітин. Недоліком цього методу є явище поліспермії.

Культивування ембріонів in vitro. Для культивування зародків великої рогатої худоби застосовують різні середовища: Ham F-10, 199, Тирорде та ін., до складу яких повинні входити енергетичні компоненти – піруват натрію, лактат натрію і глюкоза.

Однак численні експерименти показали, що культивування ембріонів великої рогатої худоби в культуральних середовищах, як правило, приводить до зупинки дроблення ембріонів на 8-16-клітинній стадії їх розвитку. Спроби

удосконалення середовищ і методики культивування ранніх ембріонів, починаючи з одноклітинної стадії, не привели до рішення цієї проблеми.

Подолання блокування дроблення можливо шляхом пересадження ембріонів у яйцепровід проміжного реципієнта. Як проміжних реципієнтів, що забезпечують розвиток ранніх ембріонів великої рогатої худоби *in vivo* до морули-бластоцисти, використовують кролиць. До недоліків цього способу, що обмежують його масове застосування, відносяться не тільки використання в дослідах живих реципієнтів і необхідність проведення хірургічної трансплантації, але і можливі втрати ембріонів при їхньому вилученні з реципієнтів.

Імовірно, ефективним способом розвитку ембріонів сільськогосподарських тварин може стати їхнє культивування в ізольованих яйцепроводах.

Встановлено, що система моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів добре підходить для культивування розділених ембріонів великої рогатої худоби.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Ідентичні, або _____, отримані з однієї заплідненої яйцеклітини – _____, мають однаковий генотип.

Б. Після розподілу ембріона одну половинку можна _____, а іншу пересадити _____.

В. Якщо протягом 3-х годин половинки зародків _____ (набули кулькоподібну форму), їх пересаджують _____ без попереднього внесення у _____ (прозора оболонка, що вкриває ооцит).

Г. Термін _____ означає, що в спермії повинні відбутися деякі фізіологічні зміни до того, як сперматозоїд набуде здатність до _____.

Д. _____ (проникнення через оболонку) яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них _____ за допомогою заточеної мікропіпетки.

Е. Метод _____ прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів може бути використаний для подолання _____ яйцеклітин.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Розподілення ембріонів мікроскальпелем, на відміну від мікроголки, дає змогу одержувати частини зародків із найменшою кількістю пошкоджень.

Б. Як показали дослідження, наявність прозорої оболонки є необхідною для подальшого розвитку половинок пізньої морули або бластоцисти.

В. Поміщення напівембріонів у додаткову оболонку є ефективним методом збереження їхньої життєздатності при кріоконсервуванні.

Г. Багато явищ усередині фолікула, включаючи біосинтез стероїдів і синтез білків, регулюють гонадотропні гормони. Тому при культивуванні ооцитів усередині фолікулів або з фолікулярними клітинами вони повинні бути обов'язковою складовою частиною середовища.

Д. Встановлено, що для культивування розділених ембріонів великої рогатої худоби добре підходять різні середовища: Nam F-10, 199, Тироде та ін.

3. Наведіть схему етапів, з яких складається технологія культивування ембріонів *in vitro*.

Слова для словника: монозиготні близнюки, компактизація, зона пелюціда, капацитація, пенетрація, поліспермія, моношар епітеліальних клітин.

Контрольні запитання

1. У чому полягає значення для тваринництва одержання однойцевих близнюків?
2. Які способи розділення ембріонів використовують?
3. Які показники враховують при визначенні якості половинок ембріонів?
4. У чому полягає роль прозорої оболонки?
5. У чому полягає перевага технології нехірургічної трансвагінальної аспірації незрілих ооцитів (OPU – ovum pick-up)?
6. Які методи капацитації еякулованих сперміїв існують?
7. Якими методами може бути полегшена пенетрація яйцеклітин?
8. Що таке поліспермія, коли вона виникає?
9. Які існують методи культивування ембріонів *in vitro*?

Лабораторна робота 13. Клонування тварин. Методи регулювання статі тварин, визначення статі ранніх ембріонів

Суть клонування полягає у принципово новому методі відтворення тварин, коли ембріон утворюється не шляхом запліднення жіночої статевої клітини чоловічою, а в результаті пересадки ядра з диплоїдним набором хромосом у яйцеклітину, з якої вилучено власний генетичний матеріал.

Є дві великі сфери застосування клонування в житті сучасного суспільства: наукова – вивчення фундаментальних принципів функціонування живої матерії, і виробнича – копіювання і тиражування ссавців з унікальними властивостями.

Застосування клонування у виробничих процесах:

- нащадки, що є точними генетичними копіями донорського матеріалу;
- велика кількість генетично ідентичних особин;
- відтворення існуючих у природі або створених людиною тварин з унікальними властивостями;
- клонування трансгенних тварин;

- комбінування трансгенезу і клонування дозволить розробити новітню, екологічно абсолютно чисту біотехнологію виробництва біологічно активних речовин (ліків, стимуляторів і та ін.).

Застосування клонування в науці:

- засіб вивчення властивостей тваринного світу на клітинному і субклітинному рівні;
- визначення ролі позаядерної спадковості у формуванні фенотипових ознак;
- дослідження взаємодії ядра і цитоплазми;
- диференціація геному протягом онтогенезу, в тому числі строки та механізми активізації або інактивізації окремих генів та їх комбінацій;
- можливість втручатися в процес диференціації та ін.;
- вирішення багатьох актуальних біологічних проблем, таких як вплив різноманітних факторів зовнішнього середовища на організм тварини;
- реалізація генотипу залежно від умов навколишнього середовища та ін.

Залежно від типу клітин-донорів генетичного матеріалу можна умовно виділити декілька типів клонування. Якщо донорами ядер є ранні зародки, то ми маємо так зване *ембріональне клонування*. До ембріонального клонування можна віднести і таке, коли донорами ядер є ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), але цей тип відрізняється від першого можливістю маніпулювати з великою кількістю клітин, які, крім того, можна розмножувати шляхом культивування поза організмом. І "*соматичне*" клонування, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму.

Клонування ембріонів шляхом пересадження ядра включає три основних етапи: отримання клітин-реципієнтів, виділення інтактного ядра донора, пересадження ядра в енукейовану яйцеклітину. На відміну від амфібій, пересадження ядра в ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібний четвертий етап – активація ооциту і злиття мембран ядра й ооциту. Під дією електричного імпульсу відбувається активація ооциту і злиття мембран між ядром клітини донора і енукейованим ооцитом-реципієнтом.

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

Технологія *отримання клітин-реципієнтів* полягає у наступному: після розрізу скляною голкою прозорої оболонки дозрілих до метафази II незапліднених яйцеклітин в ділянці полярного тільця, ооцити поміщали в розчин з цитохалазином. Приблизно через годину експозиції в середовищі з

цитохалазином В полярне тільце з прилягаючою ділянкою ооплазми видаляли всмоктуванням за допомогою піпетки для мікроманіпуляцій.

Для полегшення *введення бластомерів* у перивітеліновий простір ооцитів жіночі гамети можна попередньо поміщати в гіпертонічне середовище.

Уведення ядра або пронуклеусу під прозору оболонку в перивітеліновий простір, як правило, не приводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму.

Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можна здійснювати серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко змінні залежно від бажання експериментатора параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

Додатковим джерелом ядер можуть стати ембріональні стовбурові клітини (ЕС-клітини). Модифіковані ембріональні стовбурові клітини виділені з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть проліферуватися (проліферація – ріст і розмноження) в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь-які типи клітин, в тому числі і в клітини зародкової лінії, при введенні в інший ембріон на стадії бластоцисти. Такі клітини називаються плюрипотентними ембріональними стовбуровими клітинами. У ЕС-клітини в культурі можна ввести цільові трансгени різними методами (трансфекція, електропорація, ретровірусна інфекція і т.і.) без порушення їх плюрипотентності (рис. 9).

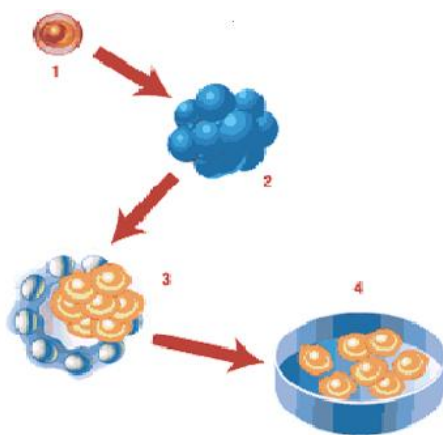


Рис. 9. Вирощування стовбурових клітин. 1 – запліднена яйцеклітина, 2- п'яти-семиденний ембріон, 3 – внутрішньоклітинна маса, 4 – культивування недиференційованих стовбурових клітин

ЕС-клітини мають нормальний каріотип, лінії цих клітин можна зберігати в недиференційованому стані в культурі від 3-х місяців до року, заморожувати і відтаювати кілька разів без істотного зниження їх здатності до розвитку. Оскільки ЕС-клітини можна генетично трансформувати, з їх допомогою можливе створення трансгенних тварин.

Принципово вищим ступенем клонування є так зване *соматичне клонування*, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму. Якщо в перших двох типах клонування можливо отримати копії ембріона і невідомо, які властивості матимуть тварини з цих зародків, то в останньому – копіюється існуючий дорослий організм. Отримання генетичних копій тварин відкриває неймовірні перспективи як для науки, так і для виробництва, але й реалізація соматичного клонування набагато складніша. Це викликано ступенем диференціації генетичного матеріалу клітин, що є донорами ядер для пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріона (2-4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо.

Виникає проблема активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому випадку, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто, певною мірою, схожа на ембріональну клітину.

Генетичний *механізм визначення статі* забезпечує розділення нащадків за статтю у співвідношенні 1 : 1. Популяція чоловічих гамет має гетерогенність (XY), а жіночих – гомогенність (XX). На підставі цього можуть бути розроблені методи розділення сперми самців на гамети, що містять X- і Y-хромосоми і, таким чином, з'явиться можливість штучно регулювати співвідношення статі у сільськогосподарських тварин. У цьому випадку запліднення яйцеклітин сперматозоїдами з X-хромосомами зумовлює появу самок, а сперматозоїдами з Y-хромосомами – самців.

Диморфізм сперміїв самців, що містять різні статеві хромосоми, полягає в тому, що спермії з Y-хромосомами мають меншу масу і величину. У свавців розміри X-хромосоми звичайно більші порівняно з розмірами Y-хромосоми. Так, середній розмір X-хромосоми великої рогатої худоби складає 6,17 мкм, а Y-хромосоми – 2,22 мкм. На підставі цього були розроблені різні методи: центрифугування, седиментації (осадження), електрофорезу, фільтрації, цитофлуорометрії, імунологічні та ін.

Суперечливість результатів експериментів стосовно регулювання співвідношення статі у нащадків, заснованих на розділенні сперміїв по їх масі, пояснюється тим, що маса сперміїв характеризується значною варіабельністю і не має достатнього вірогідного зв'язку з X- і Y-хромосомами. В більшості випадків спермії з Y-хромосомою були легшими за спермії з X-хромосомою всього на 2-4%.

Використання лазера. Встановлено, що спермії з X-хромосомами містять більше ДНК, ніж спермії з Y-хромосомами, ця різниця для сперми кнурів складає 3,4%, бугаїв – 3,8%, баранів – 4,2%, а позитивні або негативні заряди клітин залежать від кількості ДНК. При використанні лазера спермії спочатку проходили флуоресцентну обробку, після чого їх пропускали через лазерний промінь і під впливом негативно і позитивно заряджених пластин вони відхилялися у відповідний бік.

З розвитком методів трансплантації і клонування ембріонів все більшого значення набуває *попередній відбір ембріонів за статтю* і особливостями каріотипу.

З цією метою використовують методи визначення каріотипу зародка (наявність X і Y хромосом) або імуногенетичне визначення наявності спеціальних H-U антигенів, які містяться в зародках чоловічої статі.

У наш час стать ембріонів великої рогатої худоби, які знаходяться на стадії доімплантаційного розвитку, визначають за допомогою цитогенетичного і імунологічного методів.

Імунологічні методи. Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією H-U антигена за допомогою антитіл до H-U. Використовують наступні методи:

- культивування клітин ембріонів у середовищі з комплементом, що приводить до лізису клітин ембріонів чоловічої статі;
- одержання і використання вторинних флуоресцентних антитіл до антигена H-U;
- створення специфічного для ДНК Y-хромосоми молекулярного зонда;
- культивування *in vitro* 2-5 клітин компактизованих ембріонів. Цей метод заснований на тому, що у спеціальному середовищі клітини ембріонів чоловічої статі, на відміну від ембріонів жіночої статі, добре розмножуються, що дозволяє вже через 3 години після початку аналізу зробити висновок про стать ембріона. Ефективність цього методу складає 90-95%;
- застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що забезпечує ампліфікацію специфічних повторюваних послідовностей ДНК Y-хромосоми. ПЛР дозволяє по єдиному бластомеру, взятому шляхом біопсії, встановити стать доімплантаційного ембріона з дуже високою точністю (95,4%).

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Якщо донорами ядер є ранні зародки, то ми маємо так зване _____.

Б. Введення _____ під прозору оболонку в перивітеліновий простір, як правило, не приводить до злиття _____ з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних _____ — інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму.

В. Клонування, коли донорами ядер є _____ клітини дорослого організму, називається _____.

Г. Модифіковані _____ клітини виділені з ембріонів на стадії бластоцисти, можуть _____ в культурі, зберігаючи здатність до диференціації в будь-які типи клітин.

Д. _____ сперміїв самців, що містять різні статеві хромосоми, полягає в тому, що спермії з Y-хромосомами мають меншу масу і величину.

Е. Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією _____ за допомогою _____ до НУ.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати зиготи, ніж яйцеклітини.

Б. Уведення ядра або пронуклеусу під прозору оболонку в перивітеліновий простір, як правило, приводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів.

В. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріона (2-4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо.

Г. Застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що забезпечує ампліфікацію специфічних повторюваних послідовностей ДНК Y-хромосоми дозволяє по єдиному бластомеру, взятому шляхом біопсії, встановити стать доімплантаційного ембріона з дуже високою точністю (95,4%).

4. На підставі рис. 10 вказати основні етапи отримання клонованих тварин:

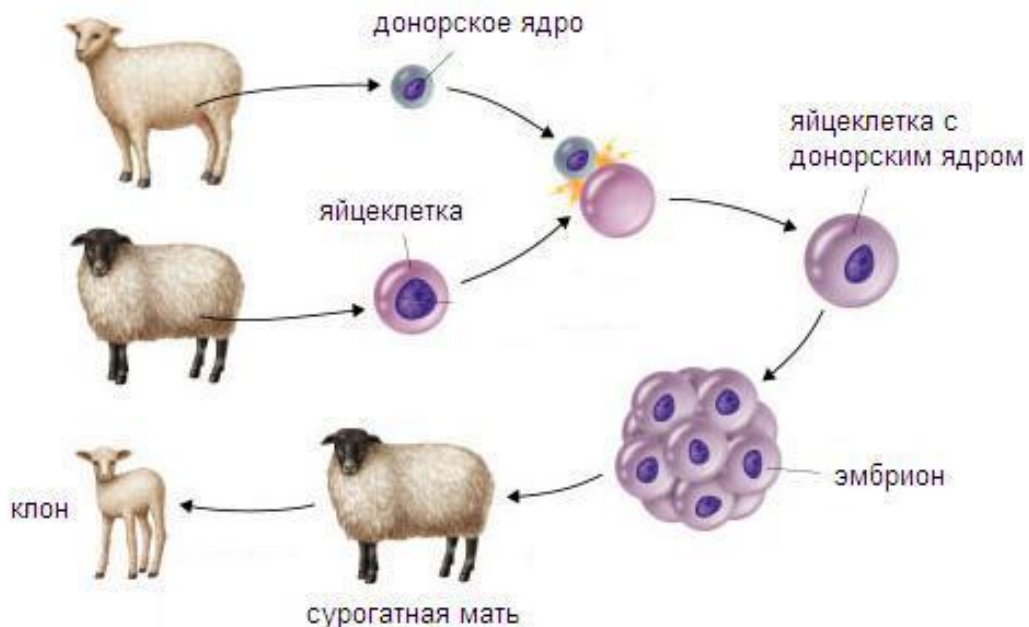


Рис. 10. Схема клонування вівці Доллі

Слова для словника: клонування, ембріональні стовбурові клітини, фузогени, плюрипотентність, проліферація, тотипотентність.

Контрольні запитання

1. Які розрізняють сфери застосування клонування?
2. Які існують типи клонування тварин?
3. Вкажіть основні етапи клонування ембріонів шляхом пересадження ядра.
4. Які клітини використовують в якості клітин-реципієнтів ядер?
5. Чому для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи?
6. Які фузогени використовують для злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи?
7. У чому полягають переваги використання ЕС-клітин в якості донорів ядер?
8. Проблеми, що виникають при соматичному клонуванні.
9. Які існують методи попереднього відбору гамет за статтю?
10. На чому засновані імунологічні методи визначення статі?

Лабораторна робота 14. Партеногенез, його види. Отримання химерних тварин

Партеногенез (Parthenogenesis – від грец. Parthenos – дівчина, незаймана + genesis-зародження) – форма статевого розмноження, при якому розвиток організму відбувається з жіночої статевої клітини (яйцеклітини) без запліднення її чоловічою (сперматозоїд).

Партеногенез слід відрізнити від безстатевого розмноження, коли розвиток відбувається не зі статевих клітин, а із соматичних клітин або органів поділом, брунькуванням.

Це статеве, але одностатеве розмноження, яке виникло у процесі еволюції організмів у роздільностатевих форм. У тих випадках, коли партеногенетичні види представлені лише самками, одна з головних біологічних переваг партеногенезу полягає у прискоренні темпу розмноження виду, оскільки всі особини подібних видів здатні залишити потомство. У разі якщо із запліднених яйцеклітин розвивається самка, а з незапліднених самець, партеногенез сприяє регуляції чисельності і співвідношення статей (наприклад, у бджіл партеногенетично розвиваються самці – трутні, а з запліднених – самки – матки і робочі бджоли).

Партеногенез – природний нормальний спосіб розмноження деяких видів тварин і рослин. Повний природний партеногенез зустрічається у безхребетних тварин усіх типів, але найчастіше – членистоногих. З хребетних це – риби деяких видів, амфібії, рептилії, окремі види птахів (індички) розмножуються партеногенетично. У ссавців відомі тільки випадки зародкового партеногенезу.

У біології розмноження тварин розмежовують два різновиди партеногенезу – гіногенез і андрогенез. При *гіногенезі* спермії проникає в яйцеклітину, але функція його полягає лише в її активації, ембріон же розвивається без участі хромосом спермія.

При *андрогенезі*, на відміну від справжнього партеногенезу, після активації жіночої гамети спермієм весь генетичний матеріал заплідненої яйцеклітини елімінується, і тому ембріон містить лише батьківський набір хромосом. У цьому випадку зигота, а потім і ембріон розвиваються тільки за участю набору хромосом чоловічого ядра.

У сучасній науковій літературі тварин, отриманих за рахунок партеногенезу, називають *партеногенами*.

На базі сучасної біотехнології можуть бути розроблені ефективні методи, що викликають штучний партеногенез шляхом стимуляції партеногенетичного розвитку яйцеклітини. Як стимулятори використовують механічні, фізичні, хімічні й біологічні фактори.

У теперішній час випробувано багато агентів, здатних активувати яйцеклітини ссавців до партеногенетичного розвитку. Використовують механічні впливи, тепловий, електричний або осмотичний шок, ферменти (гіалуронідаза, трипсин, проназа), двовалентні катіони, антисептики (етанол, дибукаїн, тетракаїн, лигнокаїн, прокаїн), фенотіазинові транквілізатори, інгібітори синтезу білків.

Шляхом аналізу динаміки розвитку партеногенетичних зародків було виявлено, що вже на самих ранніх стадіях ембріогенезу партеногени розвиваються слабкіше, ніж запліднені яйцеклітини. Ця різниця зростає й далі аж до імплантації. Причому така закономірність характерна для всіх типів партеногенетичних зародків.

Класичні досліди М. Сурани зі співавторами, проведені на мишах, показали, що ні подвійна доза материнських генів (гіногенетичні ембріони), ні подвійна доза батьківських генів (андрогенетичні ембріони), ні наявність у ембріоні диплоїдних одноматеринських і одnobатьківських клітин не достатні для нормального ембріонального розвитку, що для завершення ембріогенезу клітина повинна мати і материнські, і батьківські хромосоми.

Було показано, що чоловічий геном необхідний для утворення позазародкових тканин, а жіночий – для проходження визначених стадій ембріогенезу. У роботі, проведеній також на мишах, показано, що чоловічий геном необхідний для розвитку трофектодерми (ТЕ) і надалі – плаценти, але до 8-клітинної стадії участь батьківського геному у повноцінному розвитку мишачих ембріонів не обов'язкова. Гаплоїдний набір не достатній для проліферації клітин, тому виживають тільки диплоїдизовані клітини. Нормальний розвиток ембріонів можливий лише в тому випадку, якщо бластоцисти містять як клітини внутрішньої клітинної маси (ВКМ), так і клітини трофектодерми. Це пояснюється тим, що клітини ВКМ і ТЕ відрізняються рядом властивостей. Клітини ТЕ під індукційним впливом ВКМ проліферують і з них утворюються позазародкові тканини, клітини ВКМ не утворюють зародкових оболонок, але формують тіло зародка, тобто його тканини й органи.

Поняття *химера* (гречок. *Chimaira*) означає складена тварина. У сучасному розумінні термін химера використовується головним чином при

одержанні складених організмів, у яких генетично різні клітинні популяції походять більше, ніж від однієї зиготи або зародка.

У наш час одним із перспективних напрямків біотехнології є штучне одержання химер або генетичних мозаїків. Сутність такого біотехнічного методу, заснованого на досягненнях клітинної інженерії й мікроманіпуляцій на ранніх ембріонах, полягає у штучному об'єднанні ембріональних клітин двох і більше тварин, що належать не тільки до однієї породи, але й до різних порід і навіть видів. Отримані тварини – химери несуть ознаки різних генотипів. Сучасна мікрохірургія дозволяє одержувати химер, що мають чотирьох і більше батьків.

В останні роки велика увага приділяється одержанню міжвидових і міжпородних химер ссавців. Це особливо важливо в селекції сільськогосподарських тварин, тому що міжвидові або міжпородні химери в одному організмі можуть поєднувати різні господарсько важливі ознаки.

Всі дотепер відомі в науці експериментальні химери ссавців створені методами агрегації двох (або більше) генотипове різнорідних зародків або шляхом мікроін'єкції клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоциль ембріона-реципієнта. Перший метод отримав назву агрегаційний, другий – ін'єкційний.

Агрегаційний метод. Сутність методу полягає в наступному. Два ембріони, що розрізняються генотипами, на стадії 8-12 бластомерів оброблюють протеолітичним ферментом проназою, звільняють від зони пелюціда й зближують один з одним у культуральному середовищі. З'єднані ембріони культивують протягом 24-48 год. до завершення агрегації, тобто до утворення бластоцисти. Отримані таким чином химерні ембріони трансплантують реципієнтній самці. Агрегаційні химери можна одержувати не тільки між двома ембріонами, але й між різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів. Перевага агрегаційного методу полягає в тому, що він не вимагає втручання мікрохірургічної техніки, що дозволяє широко застосовувати його в ембріогенетиці.

Ін'єкційний метод вимагає застосування мікроманіпуляційної техніки й мікрохірургічного втручання. При ін'єкційному методі використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Бластоцисту утримують всмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікроманіпулятори, у трофобласті шляхом проколів голками зони пелюціда роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Цим методом можна ін'єкувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, але й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують самці-реципієнтови. Ін'єкційний метод знайшов застосування при одержанні міжвидових химер.

Химерні тварини не передають нащадкам характерну для них генетичну мозаїчність. Подібно гетерозиготним або гібридним тваринам у нащадків відбувається розщеплення, у результаті чого порушуються цінні генетичні комбінації. Хоча химерні тварини підтримують господарсько важливі ознаки лише протягом одного покоління, у розведенні великої рогатої худоби вони можуть представляти великий практичний інтерес. Наприклад, можна створити

химерних тварин, що поєднують такі ознаки, як молочна й м'ясна продуктивність, які є антагоністами й несумісні в одному організмі. Створення ін'єкційних химер шляхом уведення в ембріон певних ліній клітин дозволить поліпшити імунну систему й підвищити резистентність до ряду хвороб.

Метод одержання експериментальних химер становить великий інтерес для створення ліній (клонів) тварин шляхом партеногенезу. Ембріони ссавців, що розвиваються з партеногенетично активованих яйцеклітин, як показано, гинуть. Однак, при агрегації з біологічно повноцінними ембріонами, клітини ранніх партеногенетичних зародків впливають на побудову тканин химерної тварини. Якщо з партеногенетичних клонів клітин будуть формуватися гамети химерної особини, то її генотип можна закріпити в наступному поколінні. Гаплоїдний набір не достатній для проліферації клітин, тому виживають тільки диплоїдизовані клітини. Становить інтерес вивчення можливості клонування тварин-донорів ооцитів шляхом трансплантації реципієнтам химерних зародків, що складаються з клітин звичайних і партеногенетичних ембріонів. Такий химерний ембріон може бути отриманий методами мікрomanipуляції шляхом заміни клітин ВКМ звичайної бластоцисти на ВКМ бластоцисти партеногенетичного походження, тобто химерна бластоциста буде складатися з клітин ТЕ звичайної бластоцисти і ВКМ бластоцисти-партеногена. Присутність батьківських хромосом у трофектодермі химерної бластоцисти, імовірно, забезпечить імплантацію і формування позазародкових тканин, що дозволяє здійснити розвиток ембріона з генотипом партеногена.

Важливою особливістю химерних ембріонів є їх здатність підтримувати життєздатність клітин зародків летальних генотипів. Наприклад, химери, отримані від нормальних і нежиттєздатних зародків-трисомиків по хромосомах 17, 15 і 12, нормально розвивалися і давали нащадків, що не мають трисомиків.

Нові можливості в селекції тварин відкриваються з використанням у дослідах по одержанню трансгенних тварин бластоцист, у порожнину яких ін'єктовані генетично трансформовані ембріональні стовбурові клітини. Пересадження таких химерних бластоцист може привести до народження химерних тварин, у яких частина клітин різних органів, у тому числі гонад, буде походити від ембріональних стовбурових клітин. В останньому випадку частина нащадків може виявитися трансгенною. Вважається, що такий метод одержання трансгенних тварин є більш ефективним, ніж ін'єкція чДНК (чужорідної ДНК) у чоловічий пронуклеус, тому що дозволяє оцінити трансформацію генома ЕС-клітин до їх уведення в ембріон.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. У біології розмноження тварин виділяють два різновиди партеногенезу – _____ і _____.

Б. При _____ і на відміну від справжнього _____ після активації жіночої гаметі спермієм весь генетичний матеріал заплідненої яйцеклітини _____.

В. Всі дотепер відомі в науці експериментальні _____ ссавців створені методами _____ двох (або більше) генотипово різнорідних зародків або шляхом _____ клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоціль ембріона-реципієнта.

Г. В останні роки велика увага приділяється одержанню _____ і _____ ссавців. Це особливо важливо в селекції сільськогосподарських тварин, тому що _____ або _____ в одному організмі можуть поєднувати різні господарсько важливі ознаки.

Д. _____ набір не достатній для проліферації клітин, тому виживають тільки _____ клітини. Становить інтерес вивчення можливості клонування тварин-донорів ооцитів шляхом трансплантації реципієнтам _____ зародків, що складаються з клітин звичайних і _____ ембріонів.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, пояснить чому?

А. Коли партеногенетичні види представлені лише самками, одна з головних біологічних проблем партеногенезу полягає в уповільненні темпу розмноження виду, оскільки не всі особини подібних видів здатні залишити потомство.

Б. У теперішній час випробувано багато агентів, здатних активувати яйцеклітини ссавців до партеногенетичного розвитку. Як стимулятори використовують механічні впливи, тепловий, електричний або осмотичний шок, ферменти (гіалуронідаза, трипсин, проназа), двовалентні катіони, антисептики (етанол, дибукаїн, тетракаїн, лигнокаїн, прокаїн), фенотіазинові транквілізатори, інгібітори синтезу білків.

В. Партеногенез – природний нормальний спосіб розмноження деяких видів тварин і рослин. Повний природний партеногенез зустрічається у безхребетних тварин усіх типів, але найчастіше – членистоногих. З хребетних це – риби деяких видів, амфібії, рептилії, окремі види птахів (індикки) розмножуються партеногенетично.

Г. Агрегаційні химери можна одержувати тільки між двома ембріонами, застосування різного числа ізольованих бластомерів або окремих частин ембріонів не можливо.

Д. Химерні тварини передають нащадкам характерну для них генетичну мозаїчність. Подібно гетерозиготним або гібридним тваринам, у нащадків відбувається кросинговер, у результаті чого зберігаються цінні генетичні комбінації.

5. На підставі рис. 11 вказати основні етапи отримання різних типів партеногенетичних тварин.

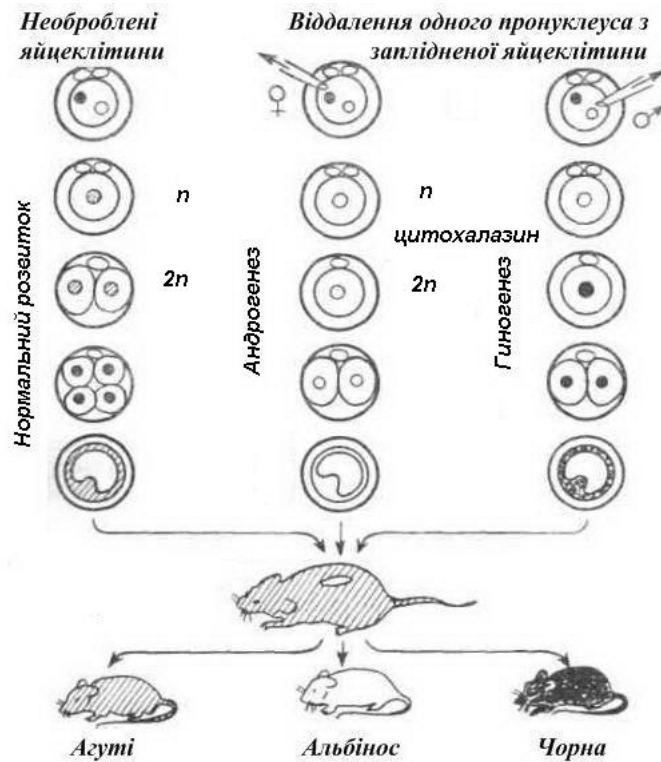


Рис. 11. Схема отримання різних типів партеногенетичних тварин

6. На підставі рис. 12 вказати основні етапи отримання химерних мишей агрегаційним (А) та ін'єкційним (Б) методами

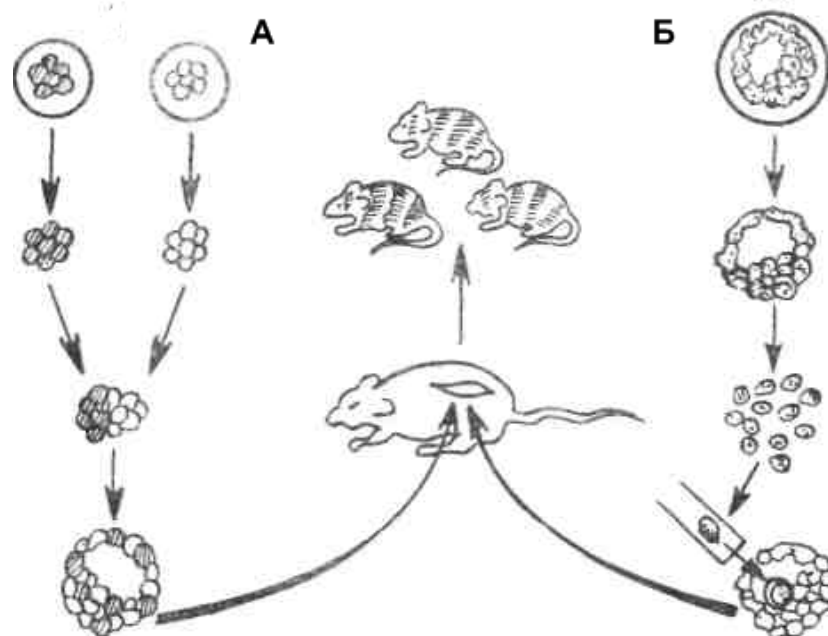


Рис. 12. Схема отримання химерних мишей агрегаційним (А) та ін'єкційним (Б) методами

Слова для словника: партеногенез, андрогенез, гіногенез, партеноген, химера, агрегаційний метод, ін'єкційний метод.

Контрольні запитання

1. Чим відрізняється андрогенез від справжнього партеногенезу?
2. Яким тваринам властивий природний партеногенез?
3. Які агенти здатні активувати яйцеклітини ссавців до партеногенетичного розвитку?
4. Чому гинуть партеногенетичні ембріони ссавців?
5. Які існують способи створення химер?
6. У чому полягає особливість трансплантації химерних ембріонів, отриманих ін'єкційним шляхом?
7. Яким чином створення химерних ембріонів може покращити процес отримання трансгенних тварин?

Лабораторна робота 15. Біоконверсійні технології

Основними стадіями біотехнологічного виробництва можна вважати п'ять операцій: підготовка продуцента, підготовка сировини, стадія ферментації, виділення й очищення цільового продукту, приготування товарних форм продуктів.

Здатність синтезувати цільовий продукт є головним критерієм при відборі продуцентів. Однак мікробіологічне виробництво висуває до продуцентів ще ряд вимог. Мікроорганізми повинні:

- володіти високою швидкістю росту;
- використовувати для життєдіяльності дешеві нехарчові субстрати;
- бути стійкими до зараження сторонньою мікрофлорою.

Після відбору штама-продуцента проводяться дослідження з оптимізації поживного середовища і умов його вирощування.

Основу поживних середовищ для культивування мікроорганізмів складають джерела вуглецю.

Джерелами вуглецю у промисловому мікробіологічному синтезі є:

- продукти переробки нафти, в першу чергу нормальні парафінові вуглеводні, структура і молекулярна маса яких оптимальна з точки зору їх використання дріжджами;
- метан, метанол, формальдегід, етанол та ін.

Однак, потреба тваринництва в кормовому білку не може бути забезпечена за рахунок використання вуглеводнів нафти і газу. В якості джерел сировини для біотехнології все більшого значення набувають відновлювані ресурси рослинних матеріалів, відходи сільського господарства:

- різноманітна рослинна біомаса;
- відходи рослинництва і лісного господарства. Для цього сировину (солону, тверду фракцію гною, деревинні тирси та ін.), що містить лігнін і целюлозу, оброблюють при підвищеній температурі лугом або використовують інші способи руйнування лігноцелюлозних надмолекулярних структур, для полегшення доступу ферментів до полісахаридів (механічне руйнування, фізичний вплив);

- відходи тваринницьких комплексів, насамперед, свинарських;
- можна використовувати безбілкову сироватку. Лактоза, що залишається у сироватці, може виконувати роль вуглеводного компонента для отримання дріжджової біомаси.

Крім вуглецю клітини мікроорганізмів у процесі росту потребують джерела азоту, фосфору, макро- та мікроелементів. Всі ці речовини містяться в поживних середовищах у вигляді солей. Живильні солі зберігаються, як правило, у твердому вигляді, а їх розчинення відбувається у спеціальних апаратах безпосередньо перед ферментацією.

Три основні типи ферментації використовуються у біотехнологічному виробництві:

1. *Поверхнева твердофазна ферментація* (так званий „тонкий шар”), при якій культура мікроорганізмів росте у шарі субстрату товщиною 3-7 см у камері, де підтримується необхідна температура і вологість повітря.
 - *глибинна твердофазна ферментація* в непереміщуваному шарі (так званий „високий шар”), при якій культура росте по всій масі субстрату, що досягається відповідними методами аерації (вентиляції) цієї маси;
 - *твердофазна ферментація в переміщуваній масі субстрату*, що аерується, для чого в якості ферментерів використовують барабани, що обертаються, шнекові мішалки або інші перемішувачі прилади.
2. *Анаеробна глибинна ферментація* (тобто без доступу повітря), вона слугує основою для виробництва такої продукції як етанол і молочна кислота. Цей шлях забезпечує найбільший об’єм продукції і переважає у бродильних виробництвах.
3. *Аеробна глибинна ферментація*, за допомогою якої отримують основну масу білкових продуктів, амінокислот, вітамінів, антибіотиків та ін.

Наступні за культивуванням процеси отримання біопрепаратів можна віднести до пасивних стадій, оскільки на цих етапах не здійснюється приросту цільового продукту, а лише проводиться його обробка з метою отримання необхідної товарної форми. Основною ціллю всіх наступних стадій обробки є максимальне збереження цільового продукту.

Всі товарні форми біопрепаратів можна поділити на три основні групи.

Перша група – біопрепарати, що містять у товарному продукті в якості основного компонента життєздатні мікроорганізми. До цієї групи належать засоби захисту рослин, бактеріальні добрива, закваски для силосування кормів, інші активні засоби біотрансформації.

Друга група – біопрепарати, у склад яких входять інактивована біомаса клітин і продукти її переробки. Це кормові дріжджі, грибний міцелій та ін.

Третя група – біопрепарати на основі очищених продуктів метаболізму мікроорганізмів. До них належать вітаміни, амінокислоти, ферменти, антибіотики, біоліпіди, полісахариди, продукти комплексної переробки мікробних біомас і метаболітів.

Отримання кормового білка. Найбільш дефіцитним компонентом їжі є

білок, особливо з високою біологічною цінністю, тобто тваринного походження. Світова потреба у білку нині задовольняється лише на 40%. Із зростанням населення потреба в протеїні збільшиться, при цьому дефіцит кормового білка зросте до 150%. Тому дослідження ефективних способів збільшення ресурсів білка для прямого або непрямого (через організм сільськогосподарських тварин) поповнення необхідних харчових речовин є одним з основних завдань науково-технічного прогресу.

Нетрадиційним і принципово новим способом отримання білкових речовин є мікробіологічний синтез. За швидкістю росту мікроорганізми перевершують сільськогосподарські культури в сотні, а тварин – у тисячі разів. Тому мікробіологічний синтез більш ефективно використовує матеріальні й енергетичні ресурси, не потребує великих земельних площ і не залежить від погодних та кліматичних умов, не забруднює навколишнє середовище отрутохімікатами, оскільки не використовує пестициди.

Мікроорганізми, як джерела кормового білка, мають ряд переваг порівняно з рослинними і навіть тваринними організмами. Вони відрізняються високим (до 60% сухої маси) і стійким вмістом білків, у той час як у рослинах концентрація білкових речовин значно змінюється залежно від умов вирощування, клімату, погоди, типу ґрунту, агротехніки та ін.

Якість мікробних білків близька до білків тваринного походження. Застосування мікробних білків у кормовиробництві поліпшує якість і засвоюваність традиційних рослинних кормів. Наприклад, 1 т кормових дріжджів забезпечує економію 5 т зерна і збільшує продуктивність у тваринництві на 15-30%. Сучасний середній завод з виробництва мікробного білка потужністю 50 т/рік, що займає площу 0,2 га, може забезпечити потребу в протеїні до 10 млн чоловік. Сільськогосподарські технології для таких масштабів виробництва повинні мати до 16 тис. га, засіяних пшеницею, або утримувати ферму з продуктивністю 400 порослят/день.

Максимальні швидкості синтезу білкових речовин мікробними клітинами реалізуються за оптимальних умов середовища, коли питома швидкість росту близька до максимальної. Тому для отримання білка одноклітинних біотехнологічні процеси реалізують в проточному режимі, що дозволяє стабілізувати практично всі параметри стадії ферментації на рівнях, оптимальних для розмноження клітин з швидкостями росту, близькими до максимальних, тобто в режимі білкової спрямованості біосинтезу. За виробництва біомаси як кормового білкового продукту, як правило, здійснюється режим незахищеної ферментації, тобто без дотримання правил стерильності.

Виробництво незамінних амінокислот. Амінокислоти з кожним роком знаходять все більше застосування як кормові і харчові добавки та приправи, сировина фармацевтичної і парфумерної промисловості. Всі амінокислоти, з яких складаються білки, є L-формами. Із 20 амінокислот – 8 (ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін) незамінні для людини. Для сільськогосподарських тварин цей список доповнюють гістидин і аргінін, а для молодняку птиці – ще і пролін. Тому у великих кількостях амінокислоти

використовують для балансування кормів. Уведення до складу комбикормів амінокислот скорочує витрати дефіцитних білків тваринного походження.

Серед продуцентів амінокислот – різні мікроорганізми, представники родів *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Використовувані в промисловості мікроорганізми можна підрозділити на декілька класів: дикі штами, ауксотрофні мутанти, конститутивні мутанти і ауксотрофні конститутивні мутанти. Промислові штами, як правило, несуть декілька мутацій, що торкаються механізмів регуляції цільової амінокислоти та її попередників.

Останніми роками для отримання нових ефективних штамів-продуцентів амінокислот почали застосовувати новітні методи біотехнології. Методи генетичної інженерії дозволяють підвищувати кількість генів біосинтезу шляхом їх клонування у плазмідах. Це приводить до збільшення кількості ферментів, відповідальних за синтез амінокислот, отже, підвищує вихід цільового продукту. Клонування генів системи синтезу амінокислот у клітинах мікроорганізмів з іншим, порівняно з донорським організмом, типом живлення дозволяє розширювати сировинну базу і замінювати дорогі цукровмісні субстрати дешевшими.

Виробничі біотехнологічні процеси отримання амінокислот реалізуються в умовах глибинної періодичної аеробної ферментації. Максимальна продукція амінокислоти настає, як правило, коли приріст біомаси практично припиняється. Тому поживне середовище на першому етапі ферментації повинно забезпечувати збалансований ріст клітин, а на другому – умови для надсинтезу цільової амінокислоти.

Після стадії ферментації в процесі обробки культуральної рідини клітини відокремлюють від розчину, який далі піддають очищенню від забарвлених домішок і зважених часток за допомогою сорбційних методів. Далі процес проводиться з використанням різних методів виділення і очищення залежно від сфери застосування кінцевого продукту. Для фармакології і харчової промисловості амінокислоти випускають у вигляді висушених чистих кристалічних препаратів; для кормових і технічних цілей – використовують стабілізовану і сконцентровану культуральну рідину.

Одним з найважливіших **способів консервування кормів** є силосування. При цьому рослинна маса зберігається у вологому стані в спеціальних ємкостях. Корм, більш-менш спресований, при ускладненому доступі повітря підлягає бродінню. Він набуває кислий присмак, стає м'якше, змінює колір, набуває бурий відтінок і зберігає соковитість. Контроль за процесами ферментації – основна умова зменшення витрат поживних речовин під час консервування.

При силосуванні накопичуються кислоти, що створюються в результаті бродіння вуглеводів рослин під дією мікробів. Цей процес можна поділити на декілька фаз.

Перша – фаза розвитку змішаної мікрофлори – характеризується бурхливим розвитком різноманітних груп мікробів, що внесені з кормами у силосну ємкість. Звичайно ця фаза короткочасна, і з її закінченням середовище

підкислюється, створюються анаеробні умови, пригнічується діяльність більшої частини мікроорганізмів, в тому числі гнилisних.

Під час другої фази – фази головного бродіння – основну роль грають молочнокислі бактерії, що продукують з вуглеводів молочну і в меншому ступені оцтову кислоту.

Третя фаза – кінцева – характеризується поступовим відмиранням збудників молочнокислого бродіння, молочна кислота, що накопичується в силосі, починає пригнічувати самі молочнокислі бактерії. Таким чином, силосування завершується.

В силосі можуть також розвиватися і кислотостійкі дріжджі, які суттєво не знижують якість корму. Однак масове розмноження дріжджів в силосі небажано, оскільки вони споживають цукор і не створюють кислих продуктів.

Важливим завданням біотехнології в галузі кормовиробництва є регулювання мікробіологічних процесів, що здійснюються при приготуванні кормів. Найбільш ефективний спосіб підвищення якості силосування – використання спеціальних заквасок з чистих культур молочнокислих бактерій. Внесена закваска інтенсифікує процес силосування, пригнічує розвиток гнилisної мікрофлори, підвищує якість силосу, сприяє зберіганню в ньому поживних речовин. На жаль, цей прийом виявляється малоефективним у тому випадку, коли рослинна культура містить недостатню для підтримки росту бактерій і створення молочної кислоти кількість водорозчинних вуглеводів.

Якість вихідного матеріалу можна покращити шляхом додавання у силосну масу цукрів, крохмалю, сухих компонентів, уведення інших культур, зменшення рН за рахунок неорганічних і органічних кислот, створення умов для розвитку корисних бактерій за рахунок бактеріостатичних речовин – мурашиної і бензойної кислот, нітритів. Повне хімічне консервування і захист білка від розщеплення досягаються при використанні формальдегіду. Одночасне використання формальдегіду і мурашиної кислоти пригнічують процеси розщеплення білка в рубці, але збільшують відтік амінокислот у тонку кишку. Мурашина кислота, ймовірно, не покращує перетравність білка, однак у випадку її суміші з формальдегідом спостерігається тенденція до збільшення засвоєння азотовмісних сполук.

Завдання

1. Заповніть пропуски у наступних твердженнях:

А. Здатність синтезувати _____ продукт є головним критерієм при відборі _____. Однак мікробіологічне виробництво надає до _____ ще ряд вимог.

Б. В якості джерел _____ для біотехнології все більше значення набувають _____ ресурси рослинних матеріалів, відходи сільського господарства.

В. _____ як джерела кормового _____ мають ряд переваг порівняно з рослинними і навіть тваринними організмами.

Г. Для отримання _____ біотехнологічні процеси реалізують у _____ режимі, що дозволяє стабілізувати практично всі параметри стадії _____ на рівнях, оптимальних для розмноження

клітин з швидкостями росту, близькими до максимальних, тобто в режимі білкової спрямованості _____.

Д. Для отримання нових ефективних _____ амінокислот почали застосовувати новітні методи біотехнології. Методи _____ дозволяють підвищувати кількість генів біосинтезу шляхом їх клонування у _____.

Е. Контроль за процесами _____ – основна умова зменшення витрат поживних речовин під час _____.

Є. Найбільш ефективний спосіб підвищення якості _____ - використання спеціальних заквасок з чистих культур _____ бактерій.

2. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, поясніть чому?

А. Наступні за культивуванням процеси отримання біопрепаратів можна віднести до пасивних стадій, оскільки на цих етапах не здійснюється приросту цільового продукту, а лише проводиться його обробка з метою отримання необхідної товарної форми. Основною ціллю всіх наступних стадій обробки є максимальне збереження цільового продукту.

Б. Якість мікробних білків нижча порівняно з білками тваринного походження. Застосування мікробних білків у кормовиробництві пригнічує засвоюваність традиційних рослинних кормів.

В. За виробництва біомаси як кормового білкового продукту, як правило, здійснюється режим захищеної ферментації, тобто з дотриманням правил стерильності.

Г. Клонування генів системи синтезу амінокислот у клітинах мікроорганізмів з іншим, порівняно з донорським організмом, типом живлення дозволяє розширювати сировинну базу і замінювати дорогі цукровмісні субстрати дешевшими.

Д. При силосуванні накопичуються солі, що створюються в результаті бродіння вуглеводів рослин під дією мікробів. Цей процес можна поділити на декілька фаз.

Е. Під час другої фази – фази головного бродіння – основну роль грають целюлозолітичні бактерії, що продукують з вуглеводів глюкозу і в меншому ступені галактозу.

Є. Досягнення мікробіології відкривають нові перспективи для використання культур бактерій. Стало можливим створення більш підходящих штамів молочнокислих бактерій, які в процесі консервування добре виживають і перебільшують в загальній масі. Крім того, ці види бактерій здатні пригнічувати ріст дріжджів. Вся сукупність перелічених факторів забезпечує більшу стабільність силосу до аеробних умов.

3. Запропонуйте заходи для покращення процесу силосування на підставі технології створення рекомбінантних мікроорганізмів. Які нові властивості

можна надати мікроорганізмам? Вкажіть способи створення таких мікроорганізмів.

Слова для словника: продуцент, субстрат, ферментація, культуральна рідина, хімічне консервування кормів.

Контрольні запитання

1. З яких стадій складається процес біотехнологічного виробництва?
2. Які існують джерела вуглецю у промисловому мікробіологічному синтезі?
3. Які вимоги надаються до продуцентів у мікробіологічному виробництві?
4. Які основні типи ферментації використовуються у біотехнологічному виробництві?
5. Які існують товарні форми біопрепаратів?
6. Які переваги мають мікроорганізми в якості джерел кормового білка порівняно з рослинами?
7. У чому полягає важливість застосування амінокислот у складі комбікормів?
8. Які біотехнологічні процеси покладені в основу силосування кормів?
9. Яку роль у процесі силосування виконує закваска культур молочнокислих бактерій?
10. Як впливають на процеси силосування використання формальдегіду та мурашиної кислоти?

Список використаної літератури

1. Андреева Л. Е. Трансгенные животные : фундаментальные и прикладные аспекты / Л. Е. Андреева, В. З. Тарантул; [в кн. Проблемы и перспективы молекулярной генетики. Том 1]; отв. ред. Е. Д. Свердлов. – М. : Наука, 2003. – 372 с.
2. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию / М. Е. Бекер ; [пер. с лат.]. – Рига : Пищевая промышленность, 1978. – 232 с.
3. Біотехнологія: підруч. / [В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.] ; за заг. ред. В. Г. Герасименка. – К. : Фірма «ІНКОС», 2006. – 647 с.
4. Биотехнология: учебное пособие для вузов. В 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – М. : Высш. шк., 1987.
5. Буркат В. П. Сучасна біотехнологія у тваринництві / В. П. Буркат, С. І. Ковтун // Біотехнологія. – 2008. – т. 1, № 3. – С. 7-12.
6. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : изд-во Сибир. отдел. РАН, 1999. – 252 с.
7. Глик Б. Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
8. Зиновьева Н. А. Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы / Н. А. Зиновьева, Н. А. Волкова, В. А. Багиров // Экологическая генетика. - 2015. – т. XIII, № 2. – С. 58-76.
9. Основы генетической инженерии и биотехнологии : учеб.-метод. пособие / А. В. Вишневец [и др.]. – Витебск : УО «ВГАВМ», 2010. – 76 с.
10. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко и др. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.
11. Оценка качества ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота : учеб.-метод. пособие / Л. В. Голубец и др. – Гродно : ГГАУ, 2011 – 68 с.
12. Патрушев Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2000. – 830 с.
13. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник для вузов / В. Н. Рыбчин. – 2-е изд. перераб. и доп. – СПб. : изд-во СПбГТУ. 2003. – 522 с.
14. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон ; под ред. В. Г. Дебабова ; [пер. с англ.]. – М. : Мир, 1987. – 411 с.
15. Утко Н. А. Трансгенные мыши в медико-биологических исследованиях / Н. А. Утко, И. Ф. Лабунец, Г. М. Бутенко // Журн. НАМН України. – 2014. – т. 20, № 1. – С. 11-24.
16. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха. – М. : Высш. шк., 2003. – 470 с.
17. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособ. / С. Н. Щелкунов. – 2-е изд. испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. унив., 2004. – 496 с.

18. Эрнст Л. К. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева // Вестник РФФИ. – 2002. – № 3. – С.12-24.
19. Эрнст Л. К. Современное состояние и перспективы использования трансгенных технологий в животноводстве / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева, Г. Брем. – М. : РАСХН, 2002. – 341 с.
20. Юлевич О. І. Біотехнологія : курс лекцій / О. І. Юлевич – Миколаїв : МДАУ, 2007. – 156 с.
21. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Методичні рекомендації

Укладач: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.5,63

Тираж 30 прим. Зам.№ _____

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м.Миколаїв, вул. Георгія Гангадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.