

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

О.І. СКРОЦЬКА

ГЕНЕТИКА (ЧАСТИНА 2)

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ
до вивчення дисципліни
для студентів
напряму 6.051401 «Біотехнологія»
денної та заочної форм навчання

СХВАЛЕНО
на засіданні кафедри
біотехнології мікробного
синтезу
Протокол № 16
від 27.05.2010 р.

Київ НУХТ 2010

О.І. Скроцька. Генетика (Частина 2): Конспект лекцій до вивч. дисципліни для студ. напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання. – К.: НУХТ, 2010. — 98 с.

Рецензент **О.В. Карпов**, д-р біол. наук

О.І. СКРОЦЬКА, канд. біол. наук

Видання подається в авторській редакції

© **О.І. Скроцька, 2010**
© **НУХТ, 2010**

Зміст

	Стор.
1. Введення у генетику	5
1.1. Основні етапи розвитку генетики	6
1.2. Розвиток генетики в Україні	10
1.3. Методи генетики	14
1.4. Практичне значення генетики	15
Запитання до розділу	17
2. Генетичний аналіз мікроорганізмів	18
2.1. Уявлення про плазміди, епісоми та мігруючі елементи геному, їхня роль у перенесенні генетичної інформації	18
2.2. Кон'югація у бактерій	22
2.3. Трансформація	26
2.4. Трансдукція	29
2.4.1. Загальна трансдукція	30
2.4.2. Обмежена трансдукція	31
2.4.3. Абортивна трансдукція	33
Запитання до розділу	33
3. Генетичний код	34
Запитання до розділу	37
4. Генетика як теоретична основа біотехнології	37
4.1. Мета та методологія генної інженерії	38
4.2. Ферменти генної інженерії	40
4.2.1. Рестриктази	40
4.2.2. Метилази	43
4.2.3. Лігази	44
4.2.4. Полімерази	45
4.2.5. Зворотня транскриптаза	47
4.2.6. Нуклеази	48
4.3. Векторні молекули	49
4.4. ДНК-технології	51
4.4.1. Конструювання рекомбінантних ДНК	53
4.4.2. Перенесення генів у клітини організму-реципієнта	53
4.4.3. Скринінг і відбір рекомбінантних клітин	54
4.5. Основні напрями генної інженерії мікроорганізмів	55
4.5.1. Біосинтез інсуліну людини	56
4.5.2. Мікробний синтез гормону росту людини – соматотропіну	58
4.5.3. Виробництво рекомбінантних інтерферонів	60
4.6. Значення генної інженерії	61
4.7. Соціальні та етичні аспекти генної інженерії	64
Запитання до розділу	72
5. Генетичні основи селекції	73
5.1. Структура сучасної селекції	73
5.2. Методи селекції	74

5.3. Селекція мікроорганізмів	79
Запитання до розділу	81
6. Генетика розвитку	81
6.1. Роль клітинного ядра у процесі розвитку організму	82
6.2. Тотипотентність геному	84
6.3. Детермінація	87
6.4. Ранній ембріональний розвиток дрозофіли	89
Запитання до розділу	96
Література	97

1. ВВЕДЕННЯ У ГЕНЕТИКУ

Все більше сучасних дослідників визнають, що генетика – є основою сучасної біології. Життя неподільно пов'язане із розмноженням організмів. І в яких би формах воно не здійснювалось, від одного покоління до іншого завжди передаються характерні для даного виду ознаки і властивості. Тобто потомство в тій чи іншій мірі обов'язково схоже на своїх батьків. Властивість організмів зберігати і передавати наступним поколінням подібні ознаки та спадкову інформацію називається спадковістю. Вона проявляється у спільних ознаках, які є між спорідненими поколіннями організмів. Часто ознаки і властивості організмів при розмноженні відтворюються досить чітко (діти бувають дуже схожими на своїм батьків). Але абсолютної подібності між ними ніколи не буває. За певними ознаками діти одних і тих же батьків завжди відрізняються один від одного.

Спадковість характеризується не лише збереженням і відтворенням незмінних властивостей і ознак організмів. Вона завжди супроводжується їх мінливістю. При розмноженні організмів поруч із збереженням одних ознак змінюються інші. Спадковість і мінливість завжди супроводжують один одного і сумісно проявляються у процесі розмноження організмів як протилежні і одночасно неподільні процеси.

Наука про спадковість і мінливість організмів отримала назву генетика (від грецького *genesis* – походження). Основним поняттям генетики виступає ген як одиниця збереження, передачі і реалізації спадкової інформації. Активне вивчення генетичних механізмів призвело до розшифрування генетичного кода, відкриття процесів транскрипції, трансляції та функціонування білків, які кодуються певними генами.

Офіційна історія розвитку генетики як науки починається з 1900 року. У чому ж причина такої тривалої затримки розвитку генетики як самостійної науки? З однієї сторони, розвиток генетики залежить від стану суміжних біологічних дисциплін, таких як цитологія, ембріологія, фізіологія, імунологія, біохімія та ін. З другої сторони для вивчення складної багаторівневої організації генетичного матеріалу необхідні точні фізичні, хімічні та математичні методи. А їх поява стала можливою лише у ХХ столітті.

За століття свого розвитку генетика затвердилась як сучасна фундаментальна наука. Її досягнення використовуються у сільському господарстві, медицині, екології, біотехнології, генній інженерії та ін. Головною задачею генетики є розробка методів управління спадковістю і мінливістю для отримання корисних людству форм рослин, тварин і мікроорганізмів, а також керування індивідуальним розвитком організмів.

Отже **генетика** – це наука про спадковість і мінливість, а також матеріальні структури, що їх забезпечують. **Спадковість** – універсальна властивість організмів зберігати і передавати наступним поколінням подібні ознаки та спадкову інформацію. **Мінливість** – універсальна властивість організмів набувати нових ознак у процесі їх індивідуального розвитку.

Генетика, як і будь-яка інша наука, поділяється на фундаментальну і прикладну.

До фундаментальної генетики відносяться наступні розділи:

1. Класична генетика – наука про спадковість і мінливість організмів.
2. Цитогенетика – наука про закономірності спадкування і мінливості на клітинному рівні.
3. Молекулярна генетика – розділ генетики, який вивчає явища спадковості та мінливості на молекулярному рівні.
4. Генетика мутагенезу (в т. ч. радіаційна і хімічна генетика) – досліджує мутагенний вплив різноманітних сполук та випромінювань на організм.
5. Еволюційна генетика – вивчає механізми спадковості і мінливості в процесі історичного розвитку.
6. Популяційна генетика – вивчає частоту генів і генотипів у великих і малих популяціях, а також їхні зміни під дією елементарних еволюційних факторів: мутацій, дрейфу генів, міграцій, добору.
7. Медична генетика – вивчає питання спадково обумовлених морфологічних та функціональних порушень організму.
8. Математична генетика – досліджує математичні моделі явищ спадковості і мінливості.
9. Космічна генетика – вивчає дію на організм космічних факторів: космічних випромінювань, невагомості і т.д.

Прикладна генетика займається використанням знань і методів генетики в усіх галузях сільського господарства, медицини, екології та біотехнології. У прикладній генетиці, в залежності від об'єкта дослідження, виділяють наступні розділи:

1. Генетика мікроорганізмів;
2. Генетика рослин;
3. Генетика тварин;
4. Генетика людини.

1.1. Основні етапи розвитку генетики

Перші уявлення про спадковість відображені у працях античних вчених. Приблизно до V століття до н.е. сформувались дві основні теорії спадкування ознак – пряме і непряме спадкування.

Прихильники теорії прямого спадкування ознак (Гіпократ) вважали, що репродукційний матеріал збирається із всіх частин тіла і таким чином всі органи тіла безпосередньо впливають на ознаки потомства. Теорія прямого спадкування ознак проіснувала 23 століття.

Прихильники теорії непрямого спадкування ознак (Арістотель) вважали, що репродукційний матеріал не надходить із усіх частин тіла, а виробляється із поживних речовин, які за своєю природою призначені для побудови різних частин тіла.

У 1868 році була опублікована книга Чарльза Дарвіна “Зміни тварин і рослин в домашніх умовах”. У ній автор розвиває теорію прямого спадкування ознак під назвою теорії пангенезису. Згідно цієї теорії, усі клітини рослин або тварин відокремлюють від себе невеличкі частинки – гемули. Гемули потрапляють до репродукційних органів і таким чином ознаки передаються потомкам.

Вже у 1871 році дарвінівська теорія або гіпотеза пангенезису була експериментально перевірена Френсісом Гальтоном, двоюрідним братом Ч. Дарвіна. Ф. Гальтон переливав кров чорних кроликів білим, а потім схрещував реципієнтів. Дослід він проводив у трьох поколіннях кроликів. Зрозуміло, що від цієї процедури чорні кролики у білих не народжувались. Тому був зроблений висновок, що у крові кроликів гемули відсутні.

Ситуація стає драматичною, якщо згадати, що у 1865 році, ще до публікації дарвінівської гіпотези пангенезису, вийшла у світ праця Г. Менделя “Досліди над рослинними гібридами”, в якій були сформульовані закони непрямого спадкування ознак, що пізніше стали основою генетики. Експерименти Менделя не були відомі Дарвіну.

Сучасники не зрозуміли Менделя. Біологія того часу ще не була готовою до сприйняття його ідей, хоча Мендель не був єдиним, хто ставив досліди по гібридизації рослин. Але жоден із попередників Менделя (німецький учений І.Г. Кельрейтер (1733 – 1806), англійські науковці Т.Е. Найт (1759 – 1838) і Дж. Госс (1822), французький дослідник О. Сажре (1763 – 1851) навіть не намагались проаналізувати свої результати кількісно, тобто підрахувати співвідношення класів серед гібридів різних поколінь.

Головне досягнення Г. Менделя заключається у тому, що він сформулював і застосував принципи гібридологічного аналізу для перевірки конкретної гіпотези, а саме гіпотези про спадкову передачу дискретних факторів.

Виявлені Г. Менделем закономірності спадкування були оцінені лише у 1900 році, коли вони були знову відкриті незалежно один від одного трьома дослідниками: Гюго де Фрізом (1848 – 1935) у Голландії, Карлом Корренсом у Германії (1864 – 1933) і Еріхом Чермаком (1871 – 1962) у Австрії. К. Корренс та Е. Чермак ще раз продемонстрували справедливість менделівських законів для гороху, а Г. де Фріз підтвердив їх одразу для 16 видів рослин. Незабаром було доказано, що закони спадкування справджуються і для тварин.

Тому вважається, що офіційна історія розвитку генетики як науки починається з 1900 р. Але від 1965 і до 1900 року наука не стояла на місці. В загальних рисах була визначена поведінка хромосом у мітозі і мейозі, а також при заплідненні у рослин і тварин, встановлено сталість хромосомних наборів (табл. 1.1).

В історії генетики можна виділити три основних періоди. Перші два (1900 – 1953 рр.) складають епоху класичної генетики, третій період (з 1953 р.) відкрив еру молекулярної генетики.

Перший період – період менделізму (1900 – 1910 рр.). Він пов’язаний з роботами Г. Менделя (1822 – 1884), якого вважають засновником генетики. Г. Мендель увів гібридологічний метод, запропонував генетичну символіку, терміни,

поняття, висловив гіпотези та відкрив закони спадкування ознак. Чисельні дослідження по гібридизації, які були проведені у першому десятилітті ХХ ст. з різними рослинами і тваринами, показали, що встановлені Г. Менделем закони спадкування ознак носять універсальний характер і можуть бути застосовані до всіх організмів, які розмножуються статевим шляхом. Відповідно, закони спадковості єдині для всього органічного світу.

Таблиця 1.1

Розвиток генетики з 1965 до 1900 року.

№ п/п	Роки	Подія	Дослідники
1	1965	Вихід роботи “Досліди над рослинними гібридами”	Г. Мендель
2	1870	<i>Описано мітоз:</i> у рослин	Є. Страсбургер
	1879 – 1882	у тварин	В. Флеммінг
3	1875	<i>Відкрито злиття пронуклеусів при заплідненні:</i> у тварин	Е. Ван Бенеден О. Гертвінг
	1883	у рослин	Н.Н. Горожанкін
	1884		Є. Страсбургер
4	1883 – 1884	Виникнення ядерної теорії спадковості	В. Ру Є. Страсбургер О. Гертвіг
5	1883	Поява терміну “хромосоми”	В. Вальдеєр
6	1884 – 1887	Відкриття “розщеплення” хромосом	Л. Гейзер Л. Гін’яр Е. Ван Бенеден
7	1885	Встановлення постійності хромосомних наборів	К. Рабль
8	1887	Опис редукційного поділу	В. Флемінг Е. ван Бенеден
9	1900	Перевідкриття законів Г. Менделя	К. Корренс Е. Чермак Г. де Фриз

У цей період закономірності спадкування ознак вивчались на рівні всього організму і не пов’язувались з будь-якими матеріальними структурами клітини.

У 1901 році Гюго де Фризом була сформульована мутаційна теорія, згідно якої спадкові ознаки не є абсолютно сталими, а можуть змінюватись внаслідок мутацій.

У 1906 році англійський біолог Уільям Бетсон запропонував термін “генетика”. А у 1909 році датський генетик Вільгельм Йохансен увів у генетику поняття ген, генотип та фенотип.

Другий період (1911 – 1953 рр.) – пов’язаний із відкриттям матеріальних основ спадковості. Для вивчення явищ спадковості почали використовуватись цитологічні методи. Таким чином у генетиці виникає *цитогенетичний напрямок*. Було встановлено, що спадкові фактори знаходяться у клітині.

У цей період відбувається формування хромосомної теорії спадковості, яка пов’язана з іменем американського ембріолога і генетика Томаса Ханта Моргана (1866 – 1945). Він разом із своїми учнями А. Стертевантом (1891 – 1970), К. Бріджесом (1889 – 1938) та Г. Меллером (1890 – 1967) до середини 20-х років ХХ століття сформулював уявлення про лінійне розташування генів у хромосомах і створив перший варіант теорії гену, як елементарного носія спадкової інформації. Проблема гену стала центральною проблемою генетики, яка досліджується і в наш час.

Але мутації гена у той час уявлялись як результат самовільних і незалежних від зовнішніх умов змін спадковості. Багаточисельні спроби викликати мутації під впливом зовнішніх чинників на організм виявлялись безрезультатними. Лише у 1925 році російські учені Г.А. Надсон і Г.С. Філіпов під впливом променів радіації отримали мутації у дріжджових грибів. У 1927 році американський генетик Г.Меллер під впливом рентгенівських променів отримав чисельні мутації у мухи дрозофіли. У 1928 році американський генетик Л. Сталдер отримав мутації у ячменя та кукурудзи, застосувавши рентгенівське випромінювання. А протягом 1928 – 1932 років українські учені А.О. Сапегін та Л.М. Делоне отримали цілу низку корисних для сільського господарства мутацій у пшениці. Всі ці дослідження дали початок новому напрямку – *радіаційній генетиці*.

У 20 – 30-х роках ХХ століття роботами С. Райта, Дж. Холдена і Р. Фішера були закладені основи генетико-математичних методів вивчення процесів у популяціях. Нині положення і методи генетики популяцій складають основу сучасної генетичної теорії селекції.

Наприкінці 40-х років ХХ століття Джорж Уелс Бідл та Едуард Тейтум заклали основи *біохімічної генетики*. Вони висунули припущення, що гени контролюють біосинтез ферментів.

Таким чином методологія генетики сформувалась на базі гібридологічного аналізу, цитологічного методу і вивчення мутаційного процесу. Ці три підходи у вивченні спадковості і мінливості стали основою так званої *класичної генетики*.

У 1944 році американці О. Евері, К. Мак-Леод і М. Мак-Карті доказали генетичну роль нуклеїнових кислот в експериментах по трансформації ознак у мікроорганізмів – пневмококів. Вони ідентифікували природу трансформуючого агента як молекули ДНК. Це відкриття символізувало виникнення нового етапу в генетиці – народження молекулярної генетики.

1947 рік – американка Барбара МакКлінток досліджуючи геном кукурудзи відкрила транспозони – мобільні генетичні елементи або “пригаючі” гени.

Третій період (з 1953 року) – період молекулярної генетики, він розпочався з детального вивчення будови і хімічного складу хромосом. Доведено, що однією з основних складових частин хромосоми є ДНК і що саме ДНК відповідає за збереження і передачу спадкової інформації.

Приоритет у розшифровці структури молекули ДНК належить американському вірусологу Джоржу Уотсону і англійському фізику Френсісу Крику, які у 1953 році опублікували структурну модель цього полімера. Дослідження ДНК привело до відкриття молекулярного механізму, за допомогою якого в структурі нуклеїнових кислот записана програма розвитку організму з усіма властивими йому ознаками.

У 1956 р. було встановлено точне число хромосом (46) в ядрі людської клітини, а в 1959 р. відкриті хромосомні хвороби людини (одна з перших – хвороба Дауна, що характеризується наявністю у 21 парі зайвої хромосоми).

У 1957 році американський генетик А. Корнберг штучно створив вірусну частинку, яка була здатна до розмноження і володіла всіма властивостями природного віруса, а у 1958 році А. Корнберг здійснив штучний синтез ДНК. Протягом 1961 – 1962 років М. Ніренберг, Г. Матеї, С. Очоа та Ф. Крик розшифрували код спадковості і склад нуклеїнових триплетів для усіх 20 амінокислот, які входять до складу білкових молекул. На протязі цих же років французькі мікробіологи-генетики Ф. Жакоб та Ж. Моно розробили загальну теорію регуляції білкового синтезу і на її основі запропонували принципову схему механізму генетичного контролю синтезу ферментів.

У 1969 році Г. Хорана здійснив синтез гена клітини дріжджового гриба, а американський учений Д. Беквітс разом із співробітниками виділив у чистому вигляді ген бета-галактозидази із кишкової палички.

Важливою подією стало відкриття у 1970 році американськими ученими Хоуардом Мартіном Теміном і Девідом Балтімором ферменту зворотної транскриптази, яка здатна синтезувати ДНК на матриці РНК. У цьому ж році американці Гамільтон Сміт і Кент Уїлкокс відкрили рестрикційні ферменти, яким властиве розрізання ДНК. Ця подія стала початком розвитку *генної інженерії*.

У 1977 році уперше людські гени були вбудовані у геном бактерії. А у 1978 році дослідниками американської компанії “Генетек” вперше було синтезовано рекомбінантний людський інсулін. У 1979 році групою вчених Каліфорнійського університету був синтезований людський гормон росту. У 1983 році була синтезована перша штучна хромосома.

У 1989 році розпочався проект по вивченню геному рослин, а у 1990 році – проект по вивченню геному людини. У 2004 році учені, які були задіяні у цьому проекті оголосили, що у хромосомному наборі людського організму міститься біля 20 – 25тисяч генів.

1.2 Розвиток генетики в Україні

Перші генетичні дослідження в Україні були пов’язані з вивченням морфології хромосом рослин. Навашин Сергій Гаврилович (1857 – 1930) (рис. 1.1) та його учні започаткували в Україні розвиток цитогенетики. Навашин С.Г. відкрив процес подвійного запліднення у квіткових рослин (1898 р.), виявив супутників хромосом (1912 р.), встановив наявність перетяжок у хромосомах (1914 р.). Також Навашин С.Г. показав, що кожен вид рослин характеризується

специфічністю числа і морфології хромосом, заклавши таким чином основи вчення про каріологію.

Учень С.Г. Навашина Левітський Григорій Андрійович (1878 – 1942) (рис. 1.2) визначив число хромосом (1924 р.), а їхню морфологічну структуру назвав каріотипом. Монографія Левітського Г.А. “Матеріальні основи спадковості” (1924 р.) була першим у світі посібником з цитогенетики і сприяла подальшому розвитку генетики в Україні. Завдяки Левітському Г.А. українська школа з досліджень морфології хромосом стала всесвітньо відомою, отримавши назву “класичної”.

Цитологічні дослідження, присвячені мейозу, започаткував Модилевський Яків Самуїлович (1883 – 1968) (рис. 1.3). Він вивчав мікро- та макроспорогенез у низки рослин, у тому числі у гібридів, амфідиплоїдів і гаплоїдів тютюну. Модилевський Я.С. відкрив важливе явище відсутності мейотичної кон’югації хромосом у гаплоїдів.



Рис. 1.1. Навашин С.Г.

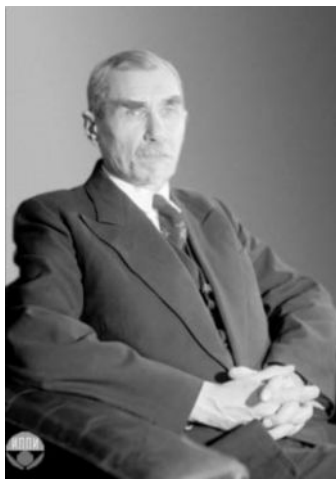


Рис. 1.2. Левітський Г.А.



Рис. 1.3. Модилевський Я.С.

Слід виділити дослідження Сапегіна Андрія Опанасовича (1883 – 1946) (рис. 1.4), який вперше застосував селекцію на науковій основі і розглядав її як прикладну генетику. Застосовуючи цитогенетичні методи, він удосконалив техніку селекції та використав цитогенетичний аналіз віддалених гібридів. У 1928 – 1935 рр. Сапегін А.О. уперше в світі застосував у селекції методи експериментального мутагенезу, індукуючи рентгенівськими променями спадкові зміни у рослин. Користуючись удосконаленими ним методами класичної селекції і точними математичними методами вивчення мінливості, А.О. Сапегін вивів унікальні сорти озимої і ярої пшениці та ячменю, які упродовж багатьох десятиріч культивувалися не лише в Україні, а й за її межами.

Величезне значення для генетики, селекції і рослинництва мали роботи Юр’єва Василя Яковича (1879 – 1962) (рис. 1.5) – одного із засновників селекційної науки в Україні. Він є автором близько 100 праць з питань методики й організації селекції сільськогосподарських культур. Ним показано переваги методу добору чистих ліній із місцевих популяцій пшениці порівняно з малоефективними методами масового добору. Методом добору чистих ліній під

керівництвом Юр'єва В.Я. було виведено багато цінних високоврожайних сортів озимої і ярої пшениці, жита, ячменю, проса, кукурудзи. Використовуючи індуковані рентгенівським опроміненням і спонтанні мутації він отримав цінні високоврожайні сорти і морозостійкі форми озимої пшениці. До речі Інституту рослинництва Української академії аграрних наук, який був заснований у 1908 році, у 1962 році присвоєно ім'я академіка АН України Василя Яковича Юр'єва.

Дослідження з генетики і цитогенетики, гібридизації і селекції проводив Фаворов Олексій Михайлович (1900 – 1981). Він досягнув значних успіхів у галузі селекції картоплі – створив низку цінних сортів для гірських умов Карпат і Прикарпаття.

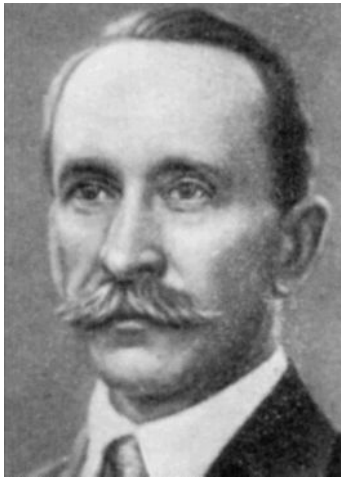


Рис. 1.4. Сапегін А.О.

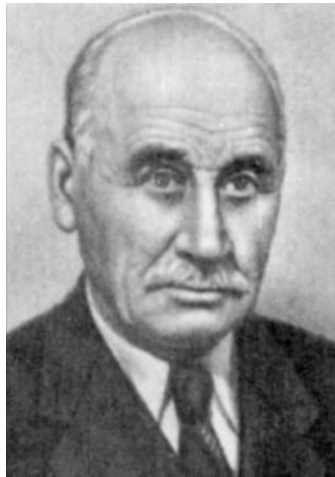


Рис. 1.5. Юр'єв В.Я.



Рис. 6. Гришко М.М.

Перший україномовний підручник з генетики був виданий у 1933 р. академіком Миколою Миколайовичем Гришком (1901 – 1964) (рис. 1.6) під назвою “Курс загальної генетики”. Гришко М.М. працював над розв'язанням проблеми коноплярства, а саме виведенням нових сортів конопель, які були б придатні для механізованого збирання. Виведений ним у 1937 р. сорт конопель “ОСО-72” за виходом волокна на 35-50% перевищував культивовані у ті роки сорти і давав можливість механізувати збирання конопель. Гришко М.М. був засновником Національного ботанічного саду України, який з 1991 року носить його ім'я.

Українськими вченими активно досліджувались еволюційно-генетичні проблеми. У 1929 р. вийшла книга Іллі Михайловича Полякова (1905 – 1976) (рис. 1.7) “Современная эволюционная теория”, у якій він показав тісний зв'язок дарвінізму і генетики, роль положень теорії Дарвіна у вивченні явищ спадковості і мінливості, а також значення генетики для обґрунтування і розвитку дарвінізму. Роль мутацій у генетиці і еволюції розглянуто в книзі Віталія Леонідовича Рижкова (1896 – 1977) “Роль мутацій у теперішній генетиці”, 1930 р. Важливі теоретичні узагальнення в галузі еволюційної генетики зроблено Єфимом Іудовичем Лукінім (1904 – 1999) у монографії “Дарвинизм і географические закономерности в изменении организмов”, 1940 р.

В Україні у 1927 – 1928 рр. уперше було застосовано рентгенівське випромінювання для експериментального отримання мутацій у сільськогосподарських рослин. Ці дослідження пов'язані з роботами Сапегіна А.О., розглянутими вище. Слід виділити і Льва Миколайовича Делоне (1891 – 1969), який встановив подібність форм природного і експериментального мутаційного процесу. Відкрив явище паралелізму у мінливості природних та експериментальних мутацій, детально вивчив хромосомні аберації у рослин.

Українські учені вели масштабні дослідження мутагенної дії різних хімічних речовин. У 1940 р. А.І. Супруненко опублікував результати робіт з отримання мутацій в озимого жита після дії хлороформу, ефіру, спирту, формаліну, аміаку, бензину та скипидару.



Рис. 1.7. Поляков І.М.



Рис. 1.8. Шмальгаузен І.І.

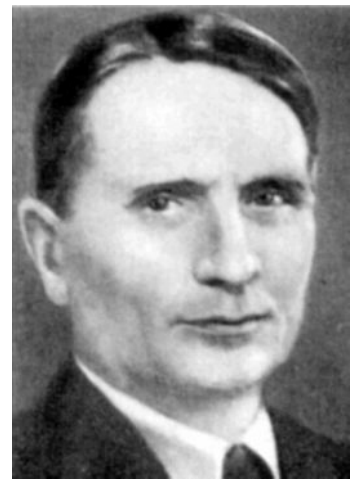


Рис. 1.9. Лисенко Т.Д.

У 1929 році у Києві при Всеукраїнській академії наук було створено комісію з експериментальної біології і генетики для координації генетичних і селекційних досліджень. Її очолив Іван Іванович Шмальгаузен (1884 – 1963) (рис. 1.8), якому належать великі заслуги у розвитку еволюційної генетики.

У 1938 –1939 рр. у відділі генетики Інституту зоології українськими ученими (Тарнавський М.Д., Сітько П.О., Гершензон С.М.) уперше в світі виявлено мутагенну дію ДНК. Їхніми дослідженнями було показано, що екзогенна ДНК, введена у організм дрозофіли, призводить до індукції численних мутацій певних генів.

Важкі часи для розвитку української генетики почалися наприкінці 30-х рр. ХХ ст., коли все чільніше місце у керівництві біологічними науками посідає Трохим Денисович Лисенко (1898 – 1976) (рис. 1.9). На спеціальній сесії Всесоюзної академії сільськогосподарських наук ім. В.І. Леніна (ВАСГНІЛ) у серпні 1948 року Лисенко Т.Д. виступив із доповіддю, в якій генетику було представлено як ідеалістичну науку, далеку від потреб і інтересів держави та народу, і шкідливу для суспільства. Після цієї сесії ВАСГНІЛ було здійснено радикальну реорганізацію усіх відділень біологічних наук, ліквідовано генетичні лабораторії і відділи, закрито кафедри генетики у вищих навчальних закладах,

звільнено з роботи багатьох учених-генетиків та були змінені програми з біології у шкільних навчальних закладах.

Генетику було “реабілітовано” лише у 1964 році на жовтневому пленумі Центрального комітету комуністичної партії Радянського Союзу (ЦК КПРС).

В наш час провідним науковим закладом з розвитку різноманітних наукових напрямів генетики є Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. Дослідженнями в області генетики займається Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Інститут фізіології рослин і генетики, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка, Інститут зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України та ін.

1.3. Методи генетики

Сукупність методів дослідження спадкових властивостей організму називається **генетичним аналізом**. В залежності від задачі і особливостей досліджуваного об’єкта генетичний аналіз проводять на популяційному, організменному, клітинному та молекулярному рівнях.

Основу генетичного аналізу складає **гібридологічний метод** дослідження. Суть методу полягає у використанні системи схрещувань для встановлення характеру спадкування ознак і генетичних відмінностей досліджуваних організмів.

Цитологічний метод дослідження застосовується для вивчення компонентів клітини у зв’язку з розмноженням організмів і передачею спадкової інформації (аналіз хромосомних і геномних мутацій, побудова цитологічних карт хромосом, цитохімічне вивчення активності генів та ін.). На основі цього методу при використанні новітніх способів вивчення хромосом виникла нова наука – цитогенетика.

Онтогенетичний метод дослідження використовується для вивчення дії генів та їх прояву під час індивідуального розвитку організмів (онтогенезі) у різних умовах зовнішнього середовища.

На основі **популяційного методу** вивчають генетичну структуру популяцій різних організмів: кількісно оцінюють розподіл особин різних генотипів у популяції, аналізують динаміку генетичної структури популяцій під дією різних факторів та ін.

Молекулярно-генетичний метод дослідження передбачає біохімічне і фізико-хімічне вивчення структури і функцій генетичного матеріалу та направлений на в’яснення етапів шляху “ген – ознака” і механізмів взаємодії різних молекул на цьому шляху.

Мутаційний метод (на основі різностороннього аналізу мутацій) дозволяє встановити особливості, закономірності і механізми мутагенезу, а також допомагає у вивченні структури і функції генів. Мутаційний метод має особливе значення при роботі з організмами, які розмножуються безстатевим шляхом.

Генеалогічний метод дослідження (метод аналізу родоводу) дозволяє прослідкувати спадкування ознак в сім'ях. Даний метод використовується для визначення спадкового чи неспадкового характеру ознаки, домінантності чи рецесивності, картування хромосом, для встановлення належності гену, який кодує дану ознаку, до певної групи зчеплення з X- чи Y-хромосоною. Як правило генеалогічний аналіз складає основу в медико-генетичному консультуванні.

Близнюковий метод дослідження полягає в аналізі і порівнянні мінливості ознак в межах різноманітних груп близнюків. Даний метод дозволяє оцінити роль генотипу і зовнішніх умов у спостерігаємій мінливості.

Народження генетики як точної науки стало можливим завдяки використанню **математичного методу** в аналізі біологічних явищ. Г. Мендель застосував кількісний підхід до вивчення результатів схрещування і для побудови гіпотез, які дали пояснення отриманим результатам. Математичний метод незамінний при вивченні спадкування кількісних ознак, а також при вивченні мінливості, особливо неспадкової або модифікаційної.

За допомогою **статистичного методу** дослідження вивчаються статистичні закономірності спадкування та мінливості організмів.

1.4. Практичне значення генетики

Сучасна генетика є важливою частиною біологічних наук. Її місце визначає предмет дослідження – спадковість і мінливість – універсальні властивості для всіх живих організмів.

Генетика є теоретичною основою селекції рослин, тварин і мікроорганізмів. Опираючись на окремі розділи генетики, селекціонери підбирають вихідний матеріал для створення нових тварин, сортів рослин і штамів мікроорганізмів. При цьому застосовуються різноманітні системи схрещувань, метод гібридологічного аналізу, індукування мутацій і т.д. Широке поширення отримали методи поліплоїдизації рослин – подвоєння числа хромосомних наборів. Людиною створені штучні поліпоїди жита, цукрового буряка, полуниці, кавуна та інших культур.

Методи генетики активно використовуються у рибному та птахо господарствах. Селекція на основі генетики кількісних ознак використовується для підвищення м'ясної і молочної продуктивності худоби, а також для підвищення врожайності рослин.

Велику роль у розвитку мікробіологічної промисловості відіграла мутаційна селекція, зокрема, при створенні штамів-продуцентів білків, вітамінів, антибіотиків, амінокислот та інших біологічно активних речовин. Вивчення генетики бактерій та інших мікроорганізмів має дуже важливе як теоретичне, так і практичне значення для спрямованої селекції високопродуктивних штамів, які останнім часом почали широко застосовуватися у різних галузях народного господарства. Використання в селекції мікроорганізмів методів природного добору, індукованого мутагенезу, популяційної мінливості, клонування, гібридизації соматичних клітин тощо дало можливість одержати високопродуктивні штами мікроорганізмів. Останні знайшли широке застосування

в мікробіологічній промисловості для виробництва кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів, антибіотиків, бактеріальних добрив, засобів захисту рослин, анатоксинів, лікувально-профілактичних препаратів – вакцин, інтерферонів, гормонів, інтерлейкінів та ін.

Багатонадійні перспективи для сільського господарства, біології та медицини й інших галузей народного господарства відкриваються у зв'язку з розробкою і вдосконаленням методів генної і клітинної інженерії, за допомогою яких експериментально доведено можливість передачі не тільки природних генів, а й штучно синтезованих, які кодують синтез різноманітних біологічно-активних сполук.

Новітні методи генної інженерії застосовуються для створення штамів мікроорганізмів здатних синтезувати людські гормони, інтерферони, вірусні антигени тощо. Активно розвивається клітинна і генна інженерія вищих рослин, яка дає можливість переносити гени одних видів і родів рослин у інші. Гібридизація соматичних клітин рослин дозволяє поєднати геноми, які ніколи не схрещуються в природі. Так отримані соматичні гібриди картоплі і томатів, різних декоративних рослин та ін.

Розвиток генетики людини дозволив виявити величезну кількість (близько 2500) спадкових хвороб. Генетична гетерогенність людської популяції включає цілий ряд аномалій обміну речовин, порушень конституції і психічних хвороб, причиною яких є генні мутації і хромосомні аберації. Рання діагностика деяких спадкових захворювань дозволяє попередити аномальний розвиток та смерть людини. Так можна уникнути трагічних наслідків і нормалізувати розвиток новонароджених, які хворі на галактоземію (нездатність засвоювати молочний цукор), або хворих на фенілкетонурію (чутливість до ароматичних амінокислот), якщо вчасно виключити із їх раціону небажані сполуки.

Рання діагностика спадкових хвороб до народження дитини або визначення гетерозиготного носійства генних та хромосомних аномалій дозволяє уникнути небажаних наслідків шляхом планування сім'ї. Велику роль при цьому відіграє медико-генетичне консультування населення.

До розвитку генної інженерії лікування спадкових хвороб було неможливим. Усі розроблені методи лише ліквідували симптоми захворювання. Нині бурхливий розвиток генної інженерії дав початок новій області медицини – генній терапії, завдяки якій можна буде виправити або замінити аномальні частини генетичного апарату.

Господарська діяльність людини часто пов'язана із втручанням у природні процеси, внаслідок чого скорочується площа лісів, змінюється водний баланс, з'являються забруднюючі речовини у річках, повітрі та ґрунті. Прогнозування і попередження можливих небажаних наслідків такого втручання неможливі без знання як екології, так і генетики, перед усім генетики популяцій, яка оперує великою чисельністю організмів, що обмінюються генами у природних умовах. При цьому необхідно передбачати збереження оптимальних розмірів і умов існування популяцій рослин, тварин і мікроорганізмів. Збереження їх генофонду – це збереження неоціненного природного багатства генів, які у подальшому можуть бути використані людиною у селекційному процесі.

Важливий аспект екологічної генетики – вивчення мутагенної активності різноманітних фізичних і хімічних агентів, що використовуються людиною. Поширення у нашому побуті мутагенів може підвищити частоту аномальних генів і збільшити вірогідність спадкових хвороб. Тому кожна нова сполука, яка призначена для медицини, сільського господарства або харчової промисловості повинна бути апробована на генетичну активність. Для цього генетики створюють спеціальні тест-системи: штами мікроорганізмів, культури дрозофіли, лінії мишей, культури клітин тварин і людини. І тільки впевнившись, що речовина не є мутагеном, її можна використовувати для тих чи інших цілей. Особлива важливість такої служби генетичної безпеки стає очевидною, якщо врахувати, що майже 90 % мутагенів є канцерогенами.

Особливої ваги набувають нині методи одержання енергії та переробки відходів промисловості і сільського господарства з метою одержання цінних біопродуктів і захисту біосфери від забруднення за допомогою мікроорганізмів. Мікробіологічна наука і мікробіологічна індустрія можуть зробити помітний внесок у розв'язання енергетичних проблем, які пов'язані зі значним зменшенням запасів нафти і вугілля на нашій планеті.

Не применшуючи значення класичної селекції та генної інженерії, необхідно зазначити, що народжується принципово новий перспективний напрямок повністю безклітинної біотехнології – використання в біотехнологічних процесах не живих клітин, а заміна їх біореакторами, в яких вибірково синтез будь-яких заданих продуктів здійснюється за допомогою безклітинних систем, які містять лише необхідний набір очищених клітинних компонентів.

Таким чином без перебільшення можна сказати, що генетика як наука про спадковість і мінливість знаходить своє застосування у всіх областях діяльності людини.

Запитання до розділу:

1. Що вивчає наука генетика?
2. Які розділи відносяться до фундаментальної та прикладної генетики?
3. Яке значення мають роботи Г. Менделя для генетики?
4. З якими роботами пов'язаний перший період розвитку генетики?
5. Чим характеризується другий період розвитку генетики?
6. Коли розпочався розвиток молекулярної генетики?
7. Охарактеризуйте праці українських учених-генетиків.
8. З чим пов'язаний майже двадцятирічний провал (1948 – 1964 рр.) розвитку української генетики?
9. Які є методи генетичних досліджень?
10. У чому полягає практичне значення генетики?
11. Яке значення генетики для екології?
12. Яким чином генетика допомагає у вирішенні проблем, пов'язаних із спадковими хворобами людини?

2. ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ МІКРООРГАНІЗМІВ

2.1. Уявлення про плазміди, епісоми та мігруючі елементи геному, їхня роль у перенесенні генетичної інформації

Плазміди – це кільцеві (дуже рідко лінійні) молекули нуклеїнових кислот (як правило, ДНК), які здатні до автономної реплікації. Деякі плазміди мають здатність до інтеграції у бактеріальну хромосому за допомогою сайт-специфічної рекомбінації – їх називають **епісомами**. Схематичне зображення механізму сайт-специфічної рекомбінації на прикладі фага λ (геном фага складається з кільцевої ДНК) показано на рис. 2.1.

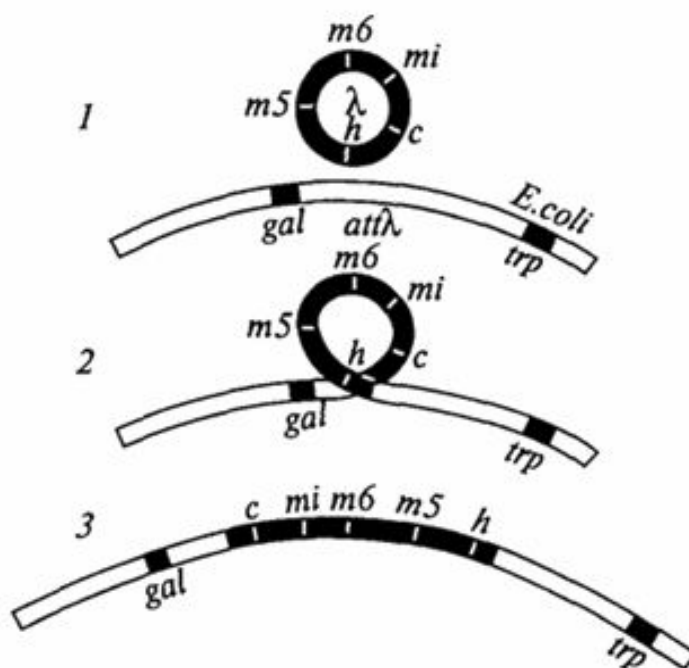


Рис. 2.1. Інтеграція кільцевої ДНК фага λ у хромосому *E. coli*.

Сайт-специфічна рекомбінація пов'язана з розрізом ДНК фага між генами *h* і *c* та розрізом бактеріальної хромосоми між генами *gal* (відповідає за утилізацію галактози) и *trp* (відповідає за синтез триптофана) у сайті *att* (сайт гомології з фаговою ДНК). Після цього фагова ДНК вбудовується у хромосомну ДНК бактерії.

Під впливом різних факторів плазміди можуть виходити із складу хромосоми. При цьому можливе правильне і неправильне вирізання плазміди. У другому випадку в хромосомі залишаються фрагменти плазмідного геному, а плазміда отримує окремі гени бактеріальної хромосоми.

Плазміди, які мають велику молекулярну масу (більше 100 тис. пар нуклеотидів (т.п.н.) знаходяться у бактеріальній клітині у невеликих кількостях (1 – 3), тому їх називають малокопійними плазмідами. Число невеликих плазмід (від 2 до 100 т.п.н.) може досягати кількох десятків копій, тобто вони є багатокопійними плазмідами. Невеликі багатокопійні плазміди є зручним

об'єктом для генної інженерії і їх часто використовують у якості векторів для перенесення певного генетичного матеріалу до клітини.

Як і ДНК бактеріальної хромосоми, плазміди знаходяться в клітині у компактній суперспіралізованій формі. При ферментативній обробці плазмідних ДНК, виділених з бактеріальної клітини, отримують відкриті кільцеві варіанти цих молекул, які дуже зручні для вивчення і визначення їх лінійних розмірів (рис. 2.2)

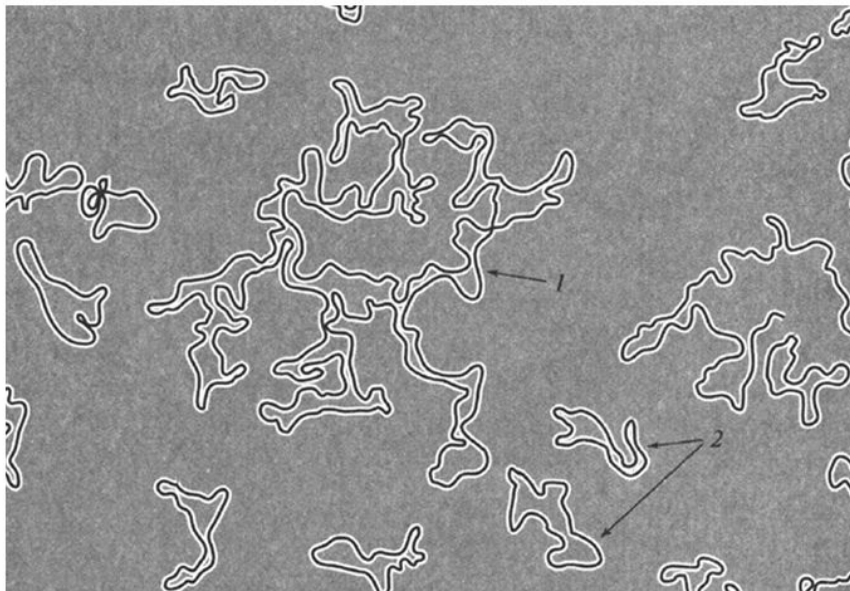


Рис. 2.2. Електронна мікрофотографія відкритих кільцевих молекул ДНК двох плазмід: 1 – *pAP20* (велика малокопійна плазміда), 2 – *R-SmSu* (мала багатокопійна плазміда)

Клітини, які отримують плазміди, як правило, отримують і нові ознаки. Ці ознаки лягли в основу назв вперше виявлених плазмід, а саме: *F*-плазмід (фактор статі), які надають клітинам донорних властивостей; *Col*-плазмід, які сприяють синтезу коліцинів; *R*-плазмід, що визначають стійкість клітин до антибіотиків.

Плазміди надають клітинам різноманітні фенотипові ознаки, зокрема, стійкість до антибіотиків (ампіциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та ін.), катіонів (вісмута, кадмія, кобальта, ртуті, свинцю), аніонів (арсенату, арсеніту), мутагенів (акридинів, етидіум-броміду, УФ-хвилям), бактеріоцинів. Отримавши певні плазміди, клітини здатні викликати біодеградацію камфори, ксилолу, нафталіну, *n*-алканів, толуолу; можуть синтезувати антибіотики, бактеріоцини, гемолізін, інсектециди, пігменти, поверхневі антигени, токсини; використовувати у якості джерела вуглецю різноманітні цукри і незвичні амінокислоти; здатні кон'югувати з реципієнтними штамами бактерій; можуть індукувати пухлини у рослин, а також здійснювати рестрикцію і модифікацію ДНК.

Основними біологічними властивостями плазмід є здатність до реплікації, кон'югативність, інтегративність, несумісність (неможливість спільного існування у клітині з іншою плазмідною), стабільність і фенотипові ознаки, які вони надають бактеріям.

Плазмиди відіграють роль своєрідних посередників (векторів) при міжклітинному обміні генами. Більшість таких генів, зокрема, гени стійкості до антибіотиків, попадають до плазмід за допомогою транспозонів і інтегронів. Цей процес сприяє швидкій адаптації клітин до факторів зовнішнього середовища. Частота таких явищ в природі порівняно невисока. Але на протязі останніх десятиліть вона суттєво виросла у зв'язку з неконтрольованим використанням антибактеріальних препаратів і забрудненням навколишнього середовища промисловими відходами.

Крім плазмід генетичну інформацію можуть переносити мігруючі (транспозуємі) генетичні елементи. Їх відкриття належить американці Барбарі МакКлінток, яка у 1947 році, досліджуючи геном кукурудзи, виявила транспозони – мобільні (мігруючі) генетичні елементи. **Мігруючі генетичні елементи** – це окремі ділянки ДНК, які здатні до переміщення (транспозиції) всередині геному. Транспозиція пов'язана із здатністю мігруючих елементів кодувати специфічний фермент рекомбінації – транспозазу. Такі мобільні структури були виявлені у геномах про- та еукаріот.

У бактерій транспозуємі генетичні елементи представлені сегментами ДНК двох типів: інсерційними (вставочними) послідовностями або *IS*-елементами (від англійського *insertion sequences* – вставочні послідовності) і транспозонами.

***IS*-елементи** – найпростіший тип мігруючих елементів геному (рис. 2.3). Їх розміри не перевищують 1500 пар нуклеотидів (в середньому 800 – 1400). Кінцеві ділянки *IS*-елементів мають однакові або дуже подібні короткі нуклеотидні послідовності (20 – 40 пар нуклеотидів), які розміщені у зворотньому порядку (інвертовані повтори). Інвертовані кінцеві ділянки *IS*-елементів відіграють важливу роль у процесех переміщення мігруючих елементів геному. *IS*-елементи не здатні до самостійної реплікації і не кодують розпізнавальних фенотипових ознак. Гени, які знаходяться у *IS*-елементах забезпечують лише їх переміщення із однієї ділянки у іншу.

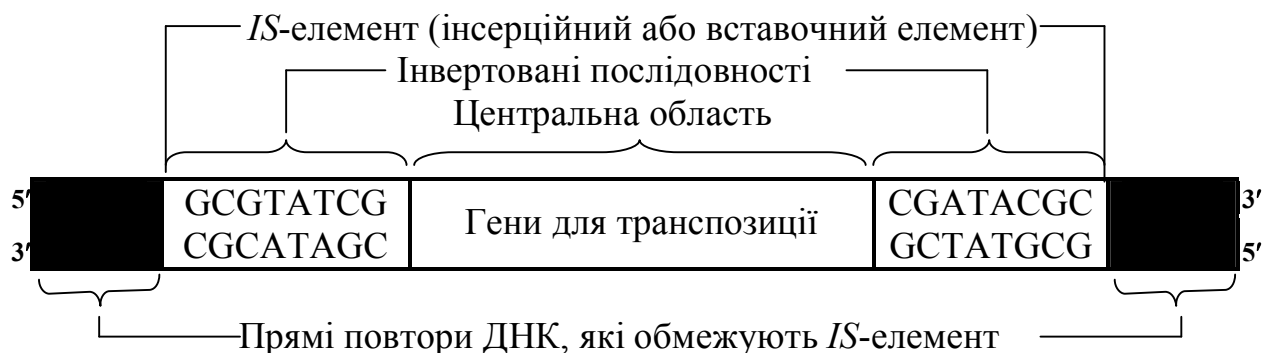


Рис. 2.3. Схема будови інсерційного елемента геному (*IS*-елементу).

Функції *IS*-елементів полягають у регуляції активності генів бактеріальної клітини (можуть активувати або інактивувати транскрипцію певних генів); індукції мутацій типу делецій або інверсій при переміщенні всередині геному або дуплікацій при вбудовуванні у хромосому (при транспозиції *IS*-елементу послідовність ДНК хромосоми у сайті вбудовування дублюється); координації взаємодій плазмід, транспозонів і профагів.

Транспозони – це більш складно організовані мобільні елементи геному. Вони складаються із 2000 – 25000 пар нуклеотидів, містять фрагмент ДНК із специфічним геном, а також два кінцевих *IS*-елемента (рис. 2.4). При включенні у геном бактерій транспозони викликають дуплікації, при виході із певної ділянки ДНК – делеції, при виході і наступній інтеграції у ДНК з поворотом фрагменту на 180° градусів – інверсії. Транспозони не здатні до самостійної реплікації і відтворюються лише у складі бактеріальної хромосоми.

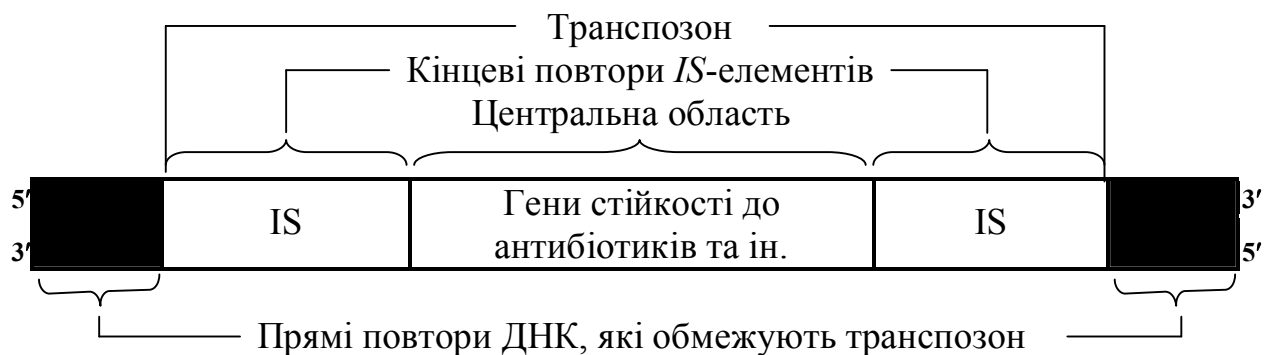


Рис. 2.4. Схема будови транспозона.

У складі деяких транспозонів виявлені гени, що кодують синтез ферментів транспозаз і резолваз, які відповідають за процеси транспозування. Крім того транспозони можуть мати гени, які надають бактеріям ряд нових ознак (стійкість до антибіотиків та ін.). Оскільки транспозони містять гени, які надають бактеріям фенотипово виражені ознаки, то їх легше виявити, ніж *IS*-елементи. Загалом для транспозонів характерні ті ж гени, що і для плазмід (гени стійкості до антибіотиків, бактеріоцинів, мутагенів та ін.). У деяких випадках у якості гігантських транспозонів можна розглядати ДНК фагів, які здатні інтегрувати у бактеріальну ДНК.

Щодо кінцевих *IS*-елементів, то вважається, що вони відіграють ключову роль у процесах транспозиції, оскільки можуть розпізнаватись ферментами, які здійснюють сайт-специфічну рекомбінацію. Разом із цим при транспозиції може спрацьовувати механізм, пов'язаний із процесом неповного вирізання усієї структури транспозона із одного сайту і переміщення її у інший сайт. При цьому відбувається подвоєння (реплікація) мобільного елемента геному, одна копія якого залишається у вихідному сайті, а друга переміщується у новий сайт. Тобто така транспозиція полягає у збільшенні числа копій відповідного транспозона.

Транспозони відіграють важливу роль у процесах еволюції мікроорганізмів, забезпечуючи специфічну форму їх внутрішньовидового і міжвидового генетичного обміну (так зване горизонтальне перенесення генів). Також відомо,

що при інтеграції мобільних елементів геному у відповідні сайти хромосом і плазмід та при їх вирізанні можуть відбуватись мутаційні перебудови генетичного матеріалу (інверсії, делеції, дуплікації, транс локації та ін.), тобто у цьому випадку транспозони виступають у ролі біологічних мутагенів.

2.2. Кон'югація у бактерій

Кон'югацією називається безпосередній контакт між клітинами бактерій, що супроводжується переносом генетичного матеріалу з клітини-донора до клітини-реципієнта (рис. 2.5).

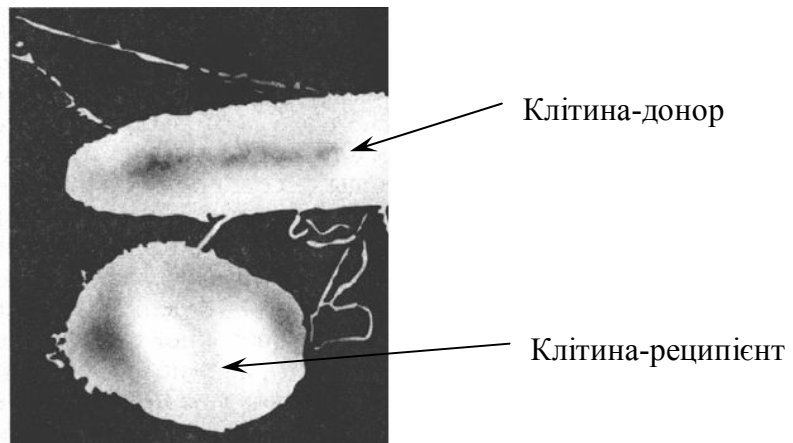


Рис. 2.5. Електронна мікрофотографія двох кон'югуючих бактерій.

Процес кон'югації у бактерій *Escherichia coli* був відкритий у 1946 р. Дж. Ледербергом і Е. Тейтумом.

У бактерій *E. coli* клітина-донор (чоловіча клітина) має продовгувату форму, а клітина-реципієнт (жіноча клітина) – заокруглену. Клітина-донор утворює статеві ворсинки (пілі), які притягують її до клітини-реципієнта і створюють цитоплазматичний канал, через який ДНК із клітини-донора переходить у клітину-реципієнт.

Існує три типи клітин-донорів: F^+ (еф-плюс), *Hfr* (ейч-еф-а) и F' (еф-прім). Клітини F^+ мають у цитоплазмі статевий фактор – специфічну *F*-плазмиду (фактор фертильності, фактор переносу або *F*-фактор). Клітини *Hfr* – мають інтегровану у бактеріальну хромосому *F*-плазмиду. F' -клітини мають *F*-плазмиду, яка містить частину хромосомних генів.

Клітина-реципієнт не містить *F*-плазмиди і її позначають як F^- -клітина.

F-плазмиди має довжину біля 100 т.п.н. На даний момент вивчено більше 60 генів *F*-плазмиди, зокрема таких, які відповідають за її автономну реплікацію (гени *rep*), здатність забезпечувати перенесення генетичного матеріалу в процесі кон'югації (гени *trp*), несумісність з іншими плазмидами (гени *inc*) та ін. (рис. 2.6).

Одна із основних властивостей *F*-плазмиди полягає у тому, що вона забезпечує бактеріальні клітини здатністю бути донорами генетичного матеріалу (кон'югативність), тобто можливість вступати у кон'югацію з безплазмідними

(реципієнтними) клітинами і передавати їм певну генетичну інформацію. Ця властивість *F*-плазмиди детермінується генетичною областю *tra* (від англійського *transfer* – перенесення), яка містить більше 20 *tra*-генів. В залежності від контролюємих ними функцій *tra*-гени *F*-плазмиди класифікують на кілька груп.

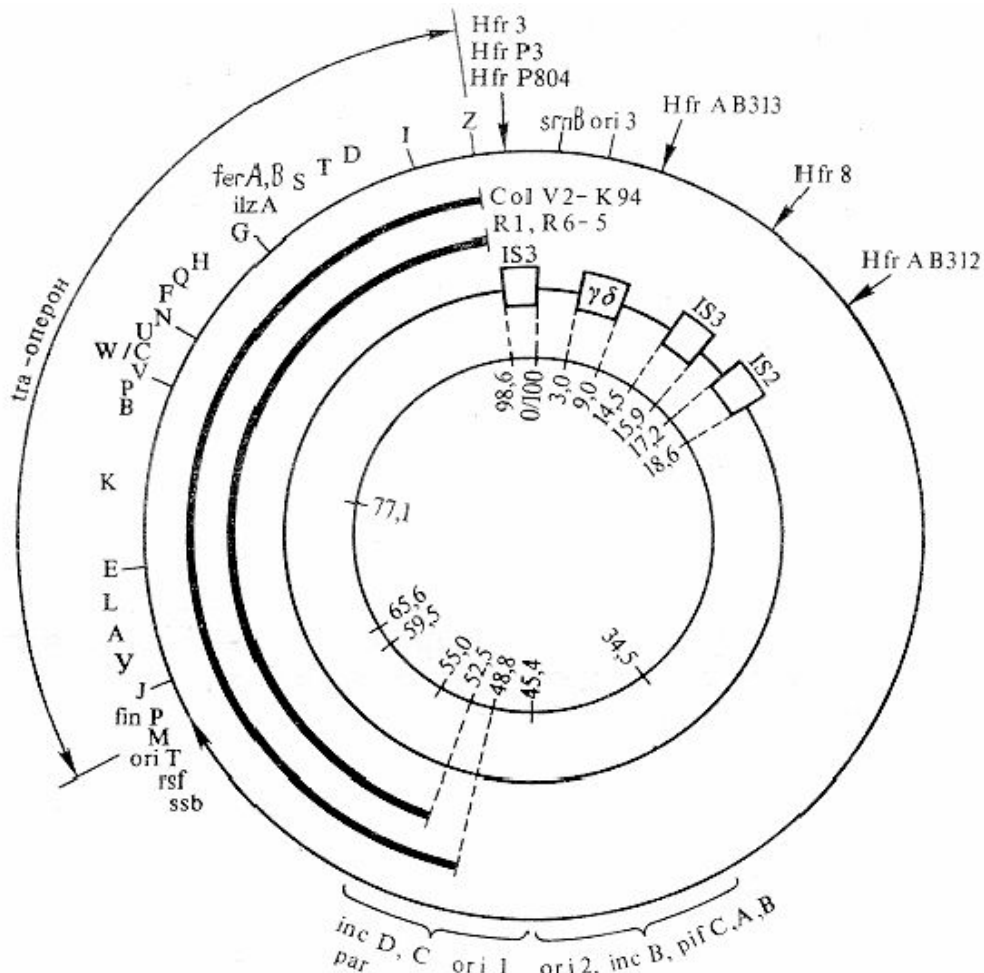


Рис. 2.6. Генетична карта *F*-плазмиди

Гени однієї *tra*-групи кодують білки, що необхідні для синтезу на поверхні клітини *E. coli* специфічних ниткоподібних структур – статевих пілей (1 – 3 пілі на клітину). Статеві пілі забезпечують формування первинного кон’югаційного контакту клітини-донора і клітини-реципієнта. Подальше скорочення пілей призводить до зближення кон’югуючих клітин і утворенню між ними поверхневого контакту (кон’югаційного містка), який необхідний для одностороннього перенесення генетичного матеріалу від донора до реципієнта.

Інші гени *tra*-області детермінують синтез білків, що забезпечують метаболізм самого процесу кон’югації і переносу ДНК. До них відносяться ферменти ендонуклеази, які розрізають кільцеву молекулу плазмидної ДНК, перетворюючи її у лінійну структуру, що є обов’язковою умовою для перенесення такої молекули із клітини-донора до реципієнтної клітини.

При утворенні цитоплазматичного містка одна із ланцюгів ДНК *F*-плазміді надрізається, а на комплементарному ланцюзі починається реплікація ДНК. Розрізаний ланцюг ДНК *F*-плазміді по цитоплазматичному містку переходить у цитоплазму клітини-реципієнта і на ньому за принципом комплементарності добудовується новий ланцюг (рис. 2.7).

Бактеріальна хромосома

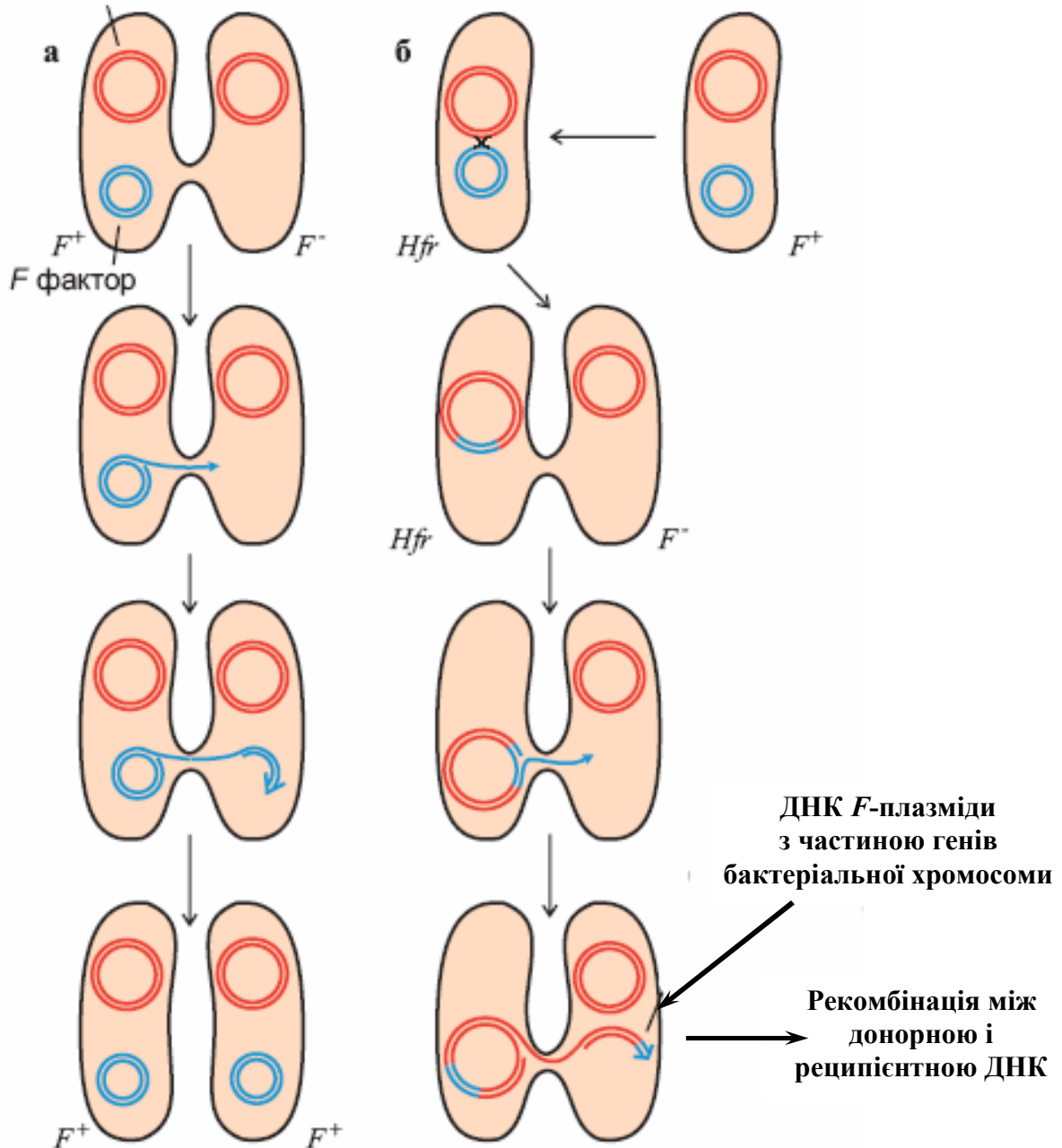


Рис. 2.7. Передача генетичного матеріалу при кон'югації у *E. coli*.
а – передача *F*-плазміді при схрещуванні $F^+ \times F^-$

б – утворення лінії клітин *Hfr* в результаті інтеграції *F*-плазмиди у бактеріальну ДНК і передача бактеріальних генів від донорної до реципієнтної клітини при схрещуванні $Hfr \times F^-$

Генетичний матеріал переноситься від донора до реципієнта однонаправлено і у строгій лінійній послідовності. Якщо різко струснути кон'югуючі бактерії (у спеціальному апараті-блендері), то вони роз'єднуються. В залежності від тривалості кон'югації до струшування у *F*⁻-клітину буде перенесена більша чи менша частина плазмідної ДНК. За 1 хвилину передається приблизно 40 т.п.н. Після закінчення процесу кон'югації дволанцюгова плазмідна ДНК стає кільцевою, а *F*⁻-клітина перетворюється на *F*⁺-клітину.

Але при схрещуванні $F^+ \times F^-$ у клітину-реципієнт переносяться лише плазмідні гени, а гени, що локалізовані у бактеріальній хромосомі, до клітини-реципієнта не переносяться. Разом з тим *F*-плазида може вбудовуватись у бактеріальну хромосому, тобто переходить у інтегрований стан. У бактеріальній хромосомі є біля 20 сайтів інтеграції *F*-плазмиди. Клітини з інтегрованою *F*-плазмідною називаються *Hfr*-донорами (від англ. *high frequency recombination* – висока частота рекомбінації). При перенесенні копії однієї з ланцюгів ДНК *F*-плазмиди до клітини-реципієнта також переноситься повна або часткова копія бактеріальної хромосоми (рис. 9.5). Таким чином утворюється клітина, яка містить вихідну дволанцюгову бактеріальну хромосому і один повний або неповний ланцюг перенесеної донорської ДНК. В подальшому при реплікації ДНК відбувається рекомбінація. Цей процес принципово не відрізняється від рекомбінації при трансформації.

В природних умовах тривалість кон'югації невелика, тому до клітини-реципієнта переходить лише частина копії хромосоми донора і частина *F*-плазмідної ДНК. Таким чином клітина-реципієнт не набуває властивостей *Hfr*-донора. За 1 хвилину передається приблизно 40 т.п.н., тобто близько 1 % бактеріальної хромосоми. Відповідно на перенесення усїєї хромосомної ДНК *E.coli* необхідно приблизно 100 хв.

Вірогідність перенесення певного гена хромосоми донора у клітину-реципієнт залежить від його віддаленості від інтегрованої *F*-плазмідної ДНК (рис. 2.8).

Чим більша тривалість кон'югації, тим більша вірогідність перенесення даного гена. Це дає можливість скласти генетичну карту бактерії у хвилинах кон'югації. Тобто одиницею карти є хвилина кон'югації – кількість ДНК, що передається *Hfr*-клітиною за 1 хвилину.

Відлік часу починається в точці 0, де знаходиться оперон, що складається з трьох генів, які контролюють біосинтез треоніну (*thr*). Відповідно, якщо *F*-плазмідна ДНК буде інтегрована в цьому місці хромосомної ДНК, то при кон'югації в першу чергу до клітини-реципієнта будуть перенесені *thr*-гени. Гени *lac* перенесуться через 8 хвилин, гени *recE* – через 30 хвилин, гени *argR* – через 70 хвилин і т.д.

F-плазміда, шляхом сомовирізання із бактеріальної хромосоми, може переходити із інтегрованого стану в автономний. При вирізанні *F*-плазміди можливе і часткове захоплення хромосомної ДНК (до 50 % хромосомних генів). *F*-плазміда, яка містить хромосомні гени називається *F'*-фактором. Перенесення генетичного матеріалу при схрещуванні *F'* × *F* називається сексдукцією.

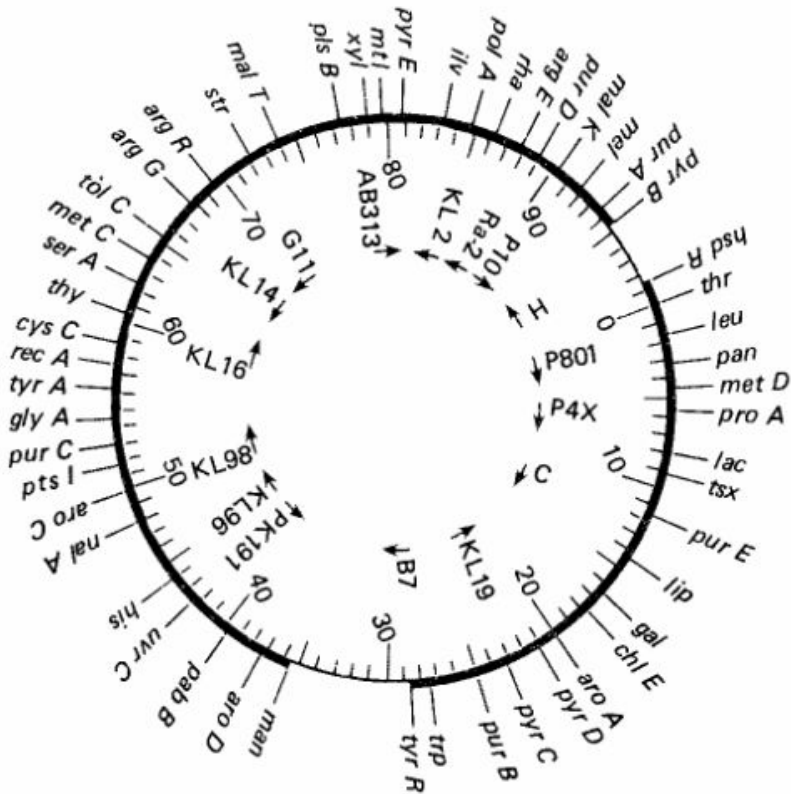


Рис. 2.8. Генетична карта *E.coli*.

(Стрілки на внутрішньому колі – точки інтеграції *F*-плазміди у бактеріальну хромосому і напрямок перенесення хромосомних генів різними *Hfr*-штамами.)

2.3. Трансформація

Трансформація бактерій – процес перенесення ДНК, ізольованої із одних клітин в інші. Трансформація була відкрита Ф. Гріффітсом у 1928 році на дослідах з пневмококами.

Відомі два штама пневмококів – S- і R-форми. Вірулентність бактерії визначається наявністю мукополісахаридної капсули (S-форма), яка захищає її від впливу з сторони організма-хазяїна. В результаті життєдіяльність цих бактерій приводить до смерті тварни. Бактерії S-форми при штучному культивуванні утворюють гладенькі блискучі колонії. Бактерії R-форми не мають капсули і уворюють шоруховаті колонії. R-штам пневмококів непатогенний для мишей. Але, якщо мишам одночасно ввести убиті S-клітини і живі R-клітини, то миші помирають.

У 1944 році О. Евері, К. Маклеод і М. Маккарті доказали, що цей процес пов'язаний з перенесенням ДНК. В природних умовах позаклітинна ДНК утворюється при лізисі прокариот.

При трансформації одна бактерія (реципієнт) поглинає ізольовану ДНК іншої бактерії (донора) (рис. 2.9).

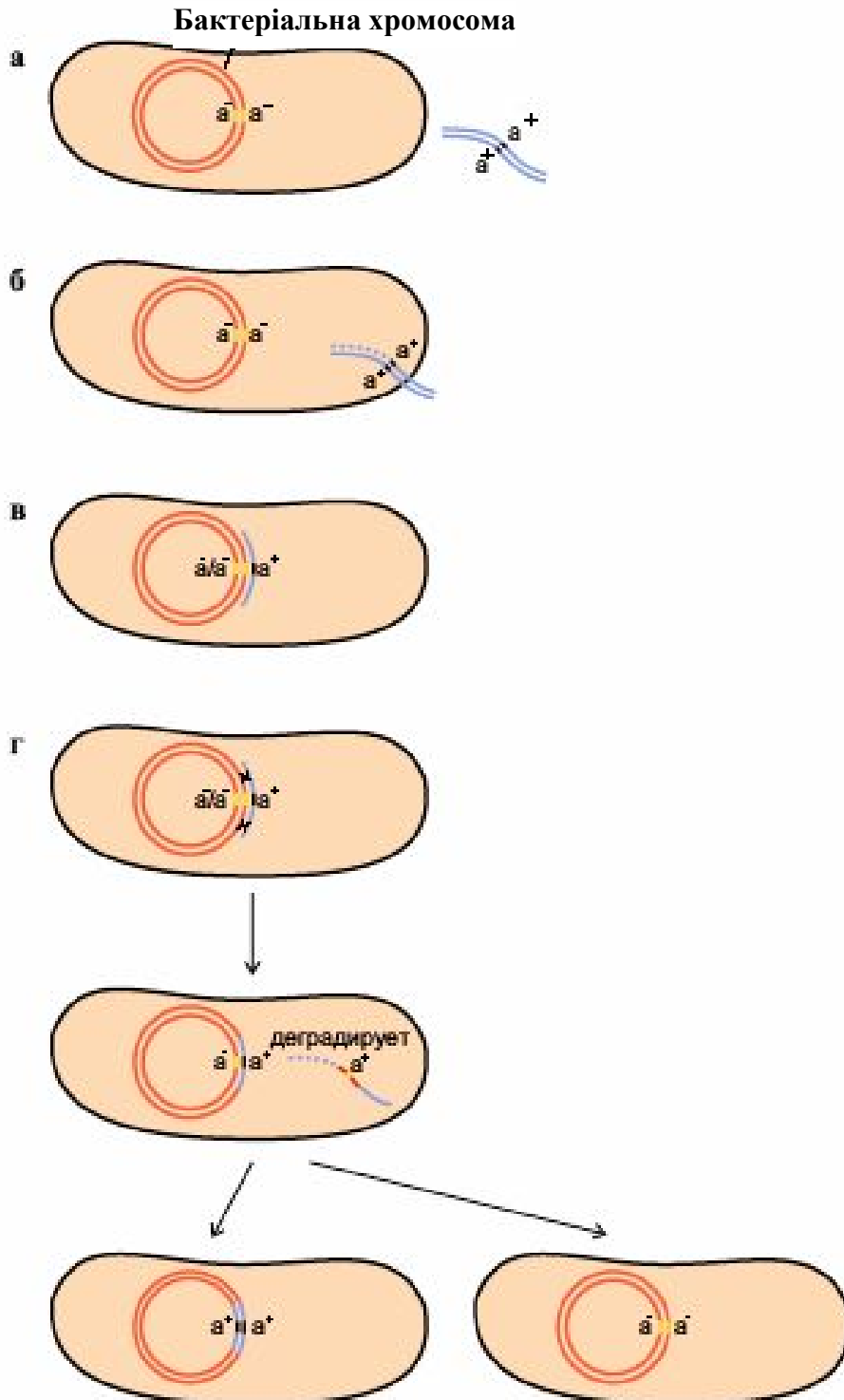


Рис. 2.9. Процес трансформації у *Bacillus subtilis*.

а) Донорна дволанцюгова молекула ДНК має a^+ алель якогось гена, а реципієнтна бактерія має a^- алель гена. Трансформуюча ДНК приєднується до рецепторних сайтів на поверхні клітини-реципієнта та проникає до клітини;

б) Під впливом бактеріальних нуклеаз дволанцюгова донорна ДНК перетворюється на одноланцюгову структуру;

в) Одноланцюгова донорна ДНК спарюється з гомологічним районом хромосоми реципієнта, формуючи трьохланцюгову структуру;

г) Подвійний кросинговер продукує рекомбінантну a^+/a^- молекулу ДНК – гетеродуплекс (ділянка дволанцюгової ДНК, на якій не у всіх нуклеотидних парах азотисті основи зв'язані водневими зв'язками; тобто один ланцюг власної бактеріальної ДНК + ланцюг донорної ДНК)) і лінійний a^- -фрагмент ДНК, який руйнується. Після поділу такої клітини одна частина потомків будуть a^+ -трансформантами, а інша половина матиме батьківський a^- -генотип.

Здатність клітини до трансформації можлива при особливому стані, який називають компетентністю. У компетентних клітин змінюється склад клітинної стінки і плазмолемі: стінка стає пористою, а плазмолема утворює багаточисельні впадіння, на зовнішній поверхні клітинної стінки з'являються особливі антигени – фактори компетентності (зокрема, специфічні білки з низькою молекулярною масою). Збільшити компетентність клітини можна деякими хімічними агентами або дією сильного електричного поля.

Процес трансформації можна розділити на кілька стадій:

1. Зворотнє приєднання молекул дволанцюгової донорної ДНК до рецепторних сайтів на поверхні клітини-реципієнта. На цій стадії ДНК донора чутлива до дії ДНКаз.

2. Незворотнє поглинання ДНК донора. Ця та наступні стадії нечутливі до дії ДНКаз.

3. Перетворення дволанцюгової ДНК донора в одноланцюгові фрагменти під дією клітинних нуклеаз.

4. Ковалентне приєднання одноланцюгової ДНК донора до хромосоми реципієнта і рекомбінація генетичного матеріалу.

5. Фенотипова експресія інтегрованого гена донора у трансформованій клітині.

Таким чином при трансформації відбувається не додавання нових генів, а заміна генів реципієнта на частково гомологічні нуклеотидні послідовності.

Частота трансформації у прокаріот залежить від властивостей трансформуючої ДНК, від її концентрації, від стану клітини-реципієнта, від виду бактерій. Максимальна частота трансформованих клітин не перевищує 1 на 100 клітин.

Трансформація відома також і для еукаріот. Але на поверхні еукаріотичних клітин відсутні рецепторні сайти для приєднання трансформуючої ДНК, тому донорну ДНК штучно вводять у еукаріотичні клітини шляхом мікроін'єкції.

2.4. Трансдукція

Трансдукцією називається процес переносу генетичного матеріалу за допомогою вірусу із клітини-донора до клітини-реципієнта. Явище трансдукції у 1952 році відкрили Н. Зіндер і Дж. Ледерберг, проводячи досліди з *Salmonella typhimurium*.

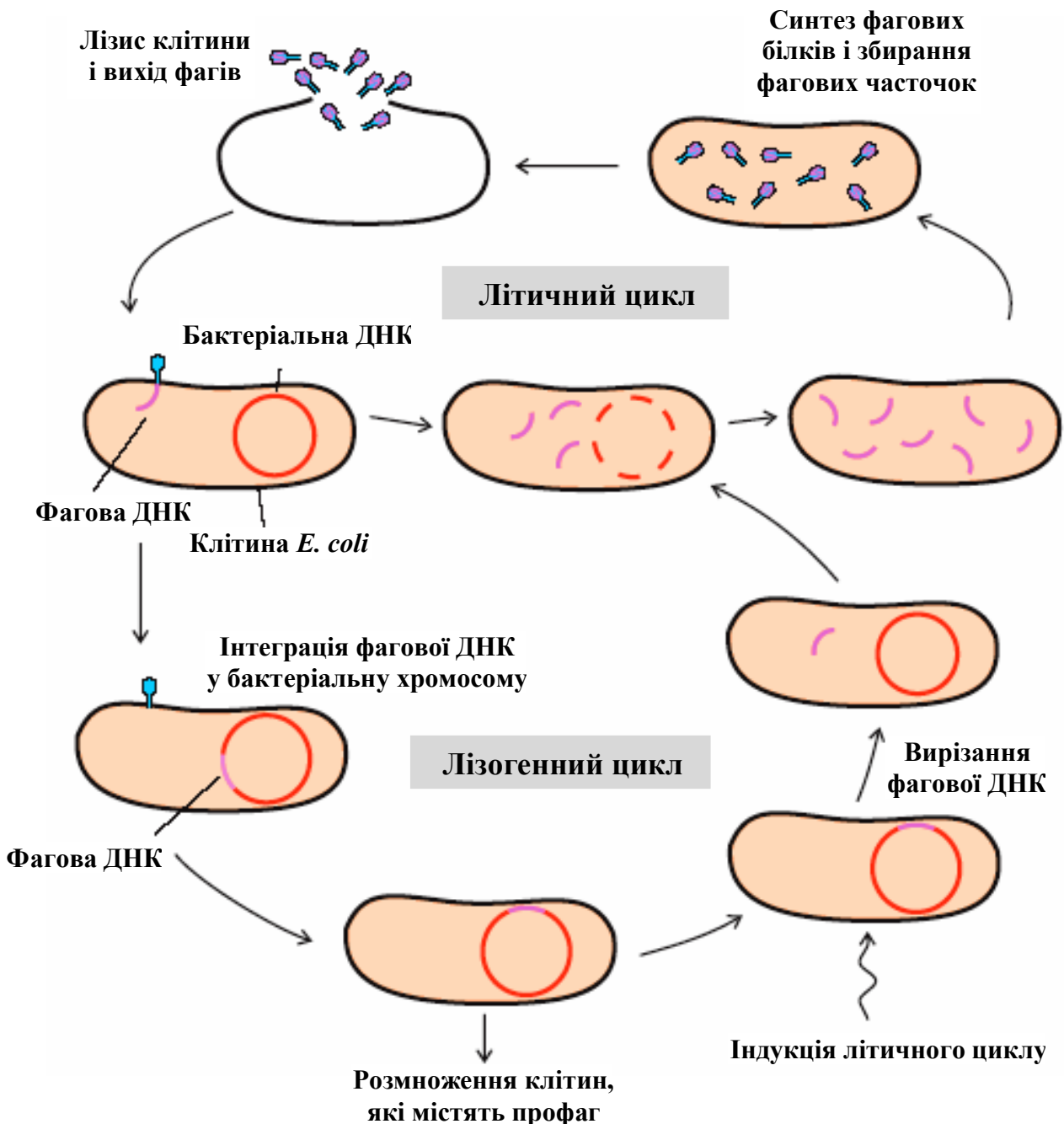


Рис. 2.10. Життєвий цикл помірною фага λ .

При трансдукції (рис. 2.10) у віріони бактеріофага потрапляє ДНК клітини-хазяїна. Віріони інфікують інші клітини і ДНК вихідної бактеріальної клітини проникає до іншої бактеріальної клітини. Вірусна ДНК інтегрує у бактеріальну хромосому, а, принесена з вірусною, ДНК чужорідної бактеріальної клітини

рекомбінує з ДНК бактеріальної хромосоми інфікованої клітини. В результаті цього близько 50 % клітин виявляються трансформованими.

Бактеріофаги, або віруси бактерій, поділяють на дві категорії: вірулентні і помірні. Вірулентний бактеріофаг (або просто – фаг), проникаючи в клітину, викликає літичну реакцію, тобто розмножується і лізує бактерію. Помірні бактеріофаги можуть викликати як літичну, так і лізогенну реакцію. В останньому випадку фаг, що інфікує переходить у стан профага, який синхронно відтворюється з хромосомою бактерії. Бактерії, що несуть профаг, називають лізогенними (рис. 2.10).

Розрізняють три типи трансдукції: загальну (неспецифічну), обмежену (специфічну) і абортивну.

2.4.1. Загальна трансдукція. Цей тип трансдукції був виявлений у наступному експерименті. Дослідники взяли U-подібну трубку, яку у нижній частині поділили посередині бактеріальним фільтром (рис. 2.11).

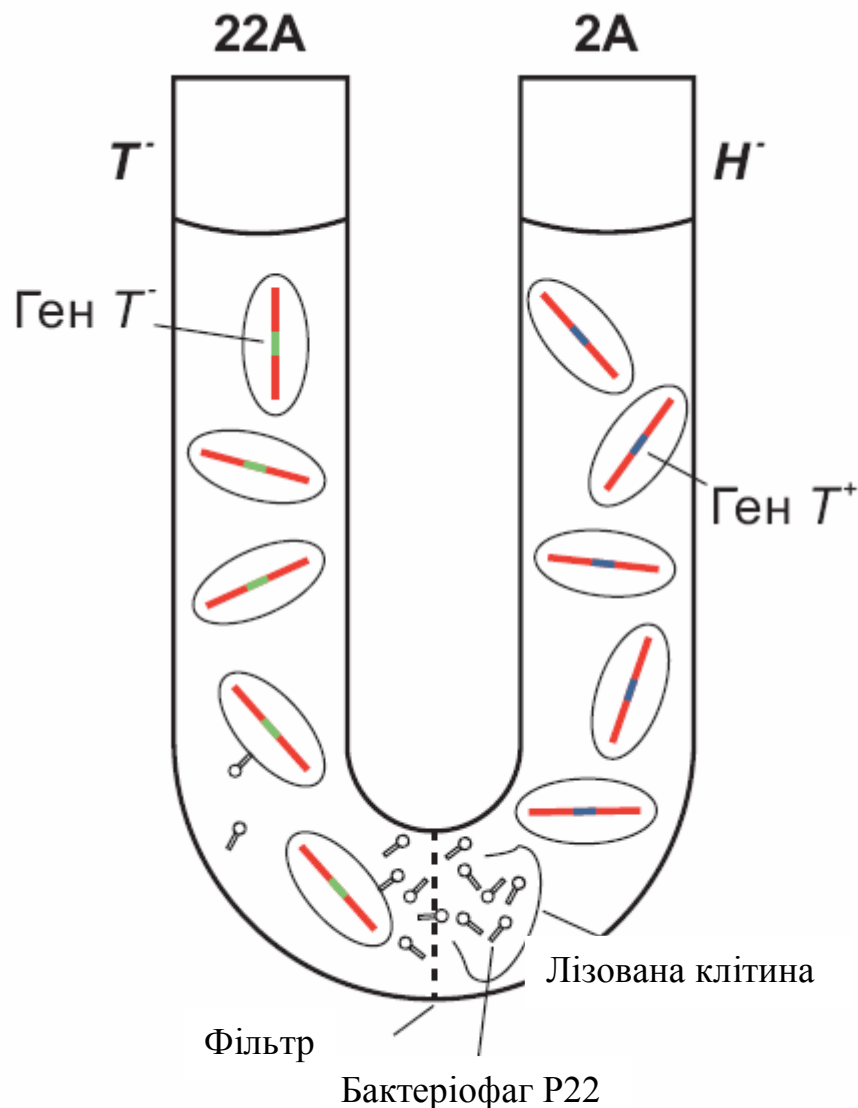


Рис. 2.11. Схема досліду, яка демонструє явище трансдукції у *Salmonella typhimurium*.

У одну половину цієї трубки помістили тифозні бактерії штаму 22А, а у другу половину – штаму 2А. Штам 22А має мутацію, яка блокує синтез триптофана (Т⁻), штам 2А має мутацію, що блокує синтез гістидину (Н). При цьому бактеріальні клітини не можуть проходити через фільтр.

Після інкубації у трубці, розділеній бактеріальним фільтром, цих різних штамів, був зроблений висів клітин обох штамів. При висіві клітин штаму 22А на середовище без триптофана було виявлено невелику кількість колоній. Тобто деякі клітини набули здатності синтезувати триптофан і змогли дати колонії на середовищі без цієї амінокислоти. Фільтруючимся агентом, який переніс ген Т⁺ від штаму 2А до штаму 22А, виявився бактеріофаг.

При загальній трансдукції фрагменти бактеріальної ДНК донора випадково включаються у дозріваючу фагову часточку разом з фаговою ДНК або, навіть, замість неї (рис. 2.12).

При загальній трансдукції бактерія-донор через фаг передає лише окремий фрагмент ДНК довжиною 1/50 – 1/100 від усієї бактеріальної хромосоми. Виявлення котрансдукування двох або більше генів вказує на їх зчепленість, а по частоті такої котрансдукції можна говорити про порядок розташування генів на генетичній карті. Наприклад якщо гени *a* і *b*, а також *b* і *c* котрансдукуються попарно, а гени *a* і *c* не котрансдукуються, то відповідно вони локалізуються у хромосомі у порядку *a – b – c*.

Величина трансдукованого фрагмента визначається розміром ДНК донора, яка здатна упакуватись в головку фага. Доказано, що у часточках трансдукуючого фага практично вся фагова ДНК замінена на бактеріальну. Оскільки ДНК фага Р1 складається приблизно із 10² т.п.н., а хромосома *E. coli* – із приблизно 4×10³ т.п.н., то фрагмент бактеріальної хромосомної ДНК, який здатний включитись у трансдукуючу часточку, складає біля 2,3 % хромосоми *E. coli*. Якщо виходити з того, що довжина середнього гена дорівнює 1 т.п.н., то при трансдукції фагом Р1 можливе сумісне перенесення близько 100 генів, а фагом Р22 – близько 40.

2.4.2. Обмежена трансдукція. Даний тип трансдукції був описаний у 1956 році Дж. і Е. Ледербергом і М. Морзе.

При обмеженій трансдукції відбувається рекомбінація між фаговою і хромосомною бактеріальною ДНК, тому фагові трансдукуючі часточки обов'язково мають ДНК обох типів.

Трансдукцію сусідніх ділянок ДНК здійснюють тільки фагові часточки, які отримані в результаті індукції лізогенних бактерій (наприклад, шляхом їх УФ-опромінення) або при спонтанному виході профага із хромосоми, що призводить до лізису клітини. Якщо ж фагові часточки будуть отримані в процесі літичного циклу, який пов'язаний з розмноженням вегетативного фага, то вони не зможуть здійснювати трансдукцію. Це суттєво відокремлює обмежену трансдукцію від загальної. В останньому випадку трансдукуючі часточки помірної фага утворюються в процесі літичного циклу.

Інтеграція ДНК помірної фага з хромосомою, як і наступне спонтанне або індуковане вирізання профага, здійснюється механізмами сайт-специфічної рекомбінації. Але іноді вирізання фагової ДНК відбувається з помилками, тоді фагова ДНК містить і сегмент бактеріальної хромосоми, а у бактеріальній

хромосомі залишається ділянка фагової ДНК. Така рекомбінація називається реципроктною. Втрата ділянки ДНК фага призводить до утворення дефектних фагових часток, оскільки фагові гени, які необхідні для росту і дозрівання фага під час літичного циклу, замінені на бактеріальну ДНК.

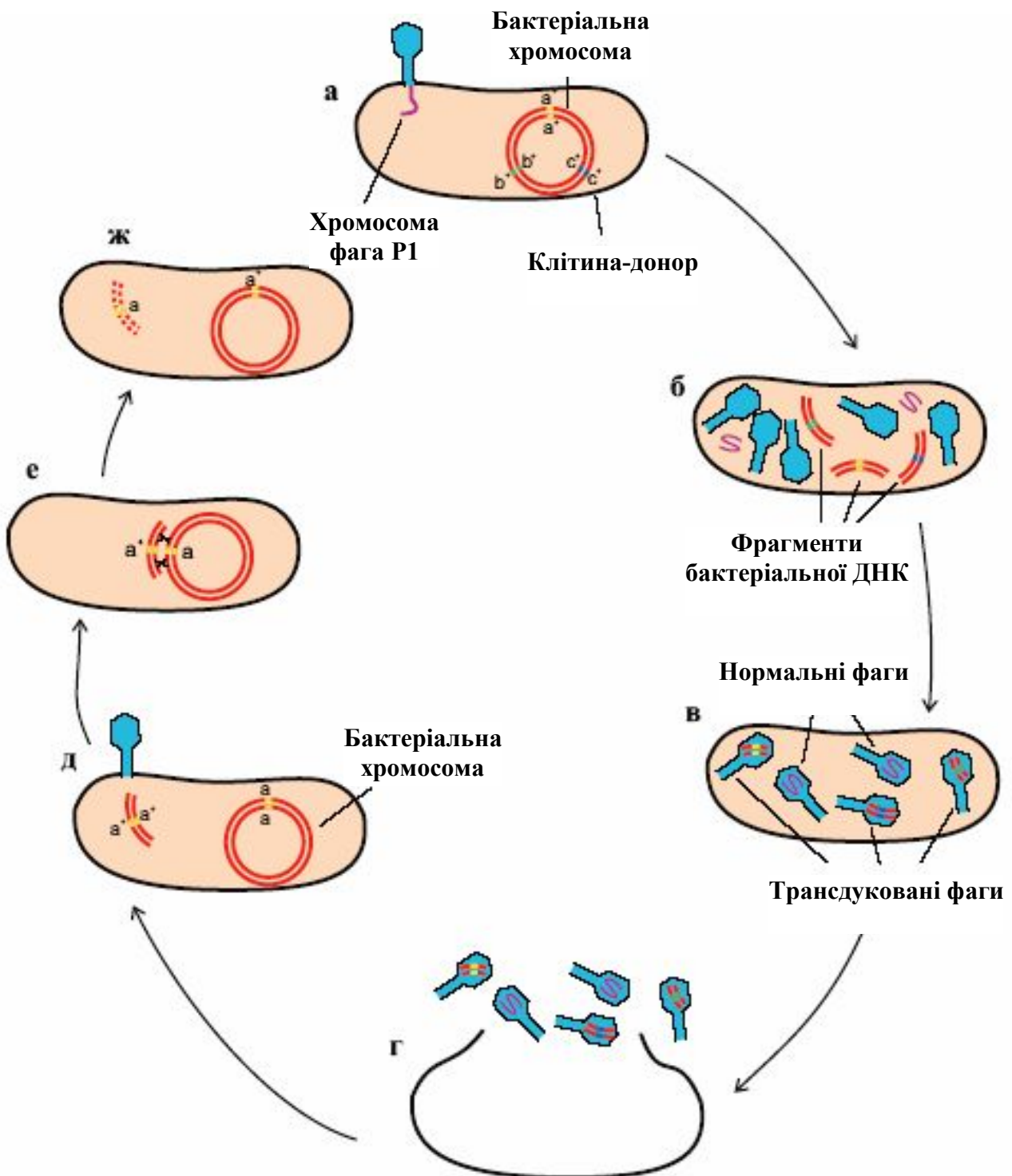


Рис. 2.12. Схема загальної трансдукції між штамами *E. coli*.

- а) клітина дикого штаму *E. coli*, яка інфікується фагом P1;
- б) деградація ДНК клітини-хазяїна в ході літичного циклу;

- в) під час збирання фагових часток деякі фрагменти бактеріальної хромосоми включаються у фагову частинку;
- г) лізис інфікованої клітини
- д) трансдукуючий фаг інфікує ауксотрофну бактерію;
- е) подвійний кросинговер призводить до обміну між донорним геном a^+ і реципієнтним a^- ;
- ж) утворення стабільного трансдуктанта.

2.4.3. Abortивна трансдукція. При abortивній трансдукції трансдукуємий фагом фрагмент ДНК донора не інтегрується у хромосому клітини-реципієнта, а залишається у її цитоплазмі і у такому вигляді здатний підтримуватись і проявляється фенотипово. Під час поділу клітини цей фрагмент ДНК передається лише одній із дочірніх клітин, тобто спадкується однолінійно. В кінцевому підсумку він втрачається у потомстві.

За допомогою abortивної трансдукції можна встановити чи відносяться мутації, які контролюють потребу в якій-небудь речовині, до різних генів або до одного і того ж гену.

Запитання до розділу:

1. Що таке плазміда?
2. У чому полягає відмінність епісоми від плазміди?
3. Які фенотипові ознаки з'являються у клітині, що містить певну плазмиду?
4. Назвіть основні біологічні властивості плазмід.
5. Які мігруючі елементи геному характерні для бактерій?
6. Охарактеризуйте функції інсерційних елементів геному?
7. Що таке транспозон? Яка їх роль у процесах еволюції мікроорганізмів?
8. Що таке кон'югація?
9. Які існують типи клітин-донорів?
10. Яким чином відбувається перенесення генетичного матеріалу з однієї клітини до іншої при кон'югації?
11. Що таке трансформація бактерій?
12. При якому стані клітина здатна до трансформації?
13. Назвіть стадії процесу трансформації.
14. Від чого залежить частота трансформації у прокаріот?
15. Чи можлива трансформація для еукаріот?
16. Що таке трансдукція?
17. Які є типи трансдукції?
18. Дайте характеристику загальній трансдукції.
19. Від чого залежить величина трансдукованого фрагмента ДНК?
20. Яка відмінність між обмеженою та загальною трансдукцією?
21. Чому при abortивній трансдукції донорний фрагмент ДНК спадкується однолінійно?

3. ГЕНЕТИЧНИЙ КОД

Ще 2500 років тому Арістотель висловив припущення про те, що гамети – це аж ніяк не мініатюрні варіанти майбутнього організму, а структури, що містять інформацію про розвиток ембріона. Однак розвиток цієї ідеї став можливим лише після дослідів Менделя, які показали, що гени є елементарними факторами спадковості. Але як ці фактори обумовлюють розвиток різних фенотипових ознак?

З відкриттям генетичної ролі ДНК була закладена основа концепції про те, що успадковується генетична інформація. Критичне значення при цьому має той факт, що структура ДНК не залежить від послідовності пар основ. Таким чином, послідовність основ у полінуклеотидному ланцюгу має важливе значення для кодування послідовності амінокислот у білку.

Кожний білок складається з постійного числа певних амінокислот. Сума каталітичних і структурних активностей різних білків клітини визначає її фенотип. Звичайно, крім послідовностей, що кодують білки, у ДНК знаходяться специфічні області, які розпізнаються регуляторними білковими молекулами. Функція цих областей залежить від послідовності певних нуклеотидів і не опосередкована генетичним кодом. Генетична інформація організму складається з генів, які експресуються у вигляді білків і з ділянок, що функціонують як регуляторні зони.

Згідно із загальноприйнятою у молекулярній біології догмою, кожна соматична клітина організму містить однаковий набір хромосом, отже, має однакову генетичну інформацію. Однак не вся ця інформація експресується у кожній клітині, тобто генетичний матеріал можна розглядати як сховище генетичної інформації. У кожній клітині експресується тільки частина генетичного матеріалу, інша ж інформація зберігає мовчання.

Взаємини між послідовністю гена і послідовністю білка встановлюються за допомогою генетичного коду. Яким же чином у послідовності нуклеотидів може бути представлена послідовність амінокислот?

Зазвичай у білкових молекулах виявляють двадцять амінокислот. Амінокислоти з'єднуються пептидними зв'язками, які утворюються в результаті конденсації аміногрупи однієї амінокислоти з карбоксильною групою другої. Амінокислотну послідовність умовно записують від амінокислоти з вільної NH_2 – групи (N-кінець) до амінокислоти із вільною COOH – групою (C – кінець).

Будь-які інші амінокислоти, наприклад, відносно рідко зустрічаємий гідроксипролін, утворюється в результаті специфічної модифікації однієї із 20 звичайних протеїногенних амінокислот. Різноманітні види модифікацій амінокислот, такі як фосфорилування, аденілювання та метилування виконуються специфічними ферментами вже у складі білкової молекули.

Загальний принцип організації білкової молекули полягає в тому, що структури вищого порядку визначаються безпосередньо структурою нижчого порядку. Це означає, що в первинній послідовності амінокислот закладена інформація, необхідна для утворення правильної конформації білка. Сюди

відносять утворення ковалентних і нековалентних зв'язків. Наприклад, суттєвим моментом у формуванні вторинної структури є утворенням дисульфідних (S-S) містків між залишками цистеїну. Кожний цистеїн знаходиться у поліпептидному ланцюгу окремо, але в результаті складання білка у специфічну конформацію дві амінокислоти виявляються рядом і відбувається конденсація двох SH-груп.

Які ж умови необхідні для того, щоб із первинної структури білка утворилась правильна структура вищого порядку? Чи закладена інформація про вторинну структуру у первинній послідовності амінокислот білка? Чи структура білка формується під час вихідного синтезу білка?

Отже у нуклеотидній послідовності повинно бути достатньо кодуєчих одиниць, щоб зашифрувати 20 амінокислот. Але ДНК містить лише 4 азотисті основи. Це значить, що кодове відношення повинно бути більшим за одиницю, тобто специфічність однієї амінокислоти повинна бути детермінована більш, ніж однією азотистою основою. Якби кодове число дорівнювало двом і дві основи визначали б одну амінокислоту, то у ДНК могло би бути закодовано лише 16 амінокислот. Тому кодове число повинно бути не менше трійки.

Якщо генетичний код триплетний, то кожній амінокислоті повинні відповідати три розміщених поряд основи. Оскільки число можливих триплетних комбінацій складає 4^3 , тобто 64, існування триплетного коду припускає, що або не всі триплети приймають участь в кодуванні амінокислот, або деякі амінокислоти кодуються більш ніж одним кодоном.

Триплетна природа генетичного коду була вперше продемонстрована у генетичних експериментах. Послідовність із трьох нуклеотидів, що відповідає одній амінокислоті, називається кодоном. Послідовність кодонів зчитується безперервно, починаючи з фіксованої стартової точки на одному кінці гену, і закінчується в точці термінації на іншому кінці гену. Записуючи послідовність нуклеотидів умовно в напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця, ми бачимо, що вона відповідає амінокислотній відповідності, записаної у напрямку від N-кінця до C-кінця.

Система запису генетичної інформації у ДНК (і-РНК) у вигляді визначеної послідовності нуклеотидів називається генетичним кодом. Генетичний код відображений у таблиці 3.1. Добре видно, що генетичний код вироджений: 20 амінокислот представлені 61 кодоном. Майже кожній амінокислоті відповідає декілька кодонів-синонімів.

Другою особливістю коду є тенденція до групування кодонів, які відповідають одній амінокислоті. Часто основа у третьому положенні кодона є несуттєвою для її специфічності. Одна амінокислота може бути представлена чотирма кодонами, які відрізняються лише за третьою основою. Інколи різниця заключається у перевазі пурина над піримідином в цьому положенні. Меншу специфічність цього положення в кодоні називають виродженістю третьої основи.

Ця особливість, а також тенденція до подібності кодонів для амінокислот одного типу (тобто полярних, гідрофобних тощо) зводять до мінімуму ефект мутацій. При такій організації генетичного коду випадкова заміна якої-небудь азотистої з великою ймовірністю приведе до заміни на вихідну амінокислоту або ж заміни не відбудеться зовсім.

Відповідність кодонів і-РНК амінокислотам

		Друга азотиста основа					
		У	Ц	А	Г		
Перша азотиста основа	У	фенілаланін	серин	тирозин	цистеїн	У	Третя азотиста основа
		фенілаланін	серин	тирозин	цистеїн	Ц	
		лейцин	серин	стоп-кодон	стоп-кодон	А	
		лейцин	серин	стоп-кодон	триптофан	Г	
	Ц	лейцин	пролін	гістидин	аргінін	У	
		лейцин	пролін	гістидин	аргінін	Ц	
		лейцин	пролін	глутамін	аргінін	А	
		лейцин	пролін	глутамін	аргінін	Г	
	А	ізолейцин	треонін	аспарагін	серин	У	
		ізолейцин	треонін	аспарагін	серин	Ц	
		ізолейцин	треонін	лізин	аргінін	А	
		метионін	треонін	лізин	аргінін	Г	
	Г	валін	аланін	асп. к-та	гліцин	У	
		валін	аланін	асп. к-та	гліцин	Ц	
		валін	аланін	глут. к-та	гліцин	А	
		валін	аланін	глут. к-та	гліцин	Г	

Тільки 61 із 64 триплетів використовується для позначення амінокислот. Яка ж функція трьох кодонів, що залишились? Триплети УАА, УАГ і УГА є кодонами термінаторами, на яких синтез білка зупиняється. Вони названі «*nonsense*»-кодонами (термінаторами), які означають кінець синтезу даної поліпептидної молекули. До них відносяться такі триплети ДНК: АТТ, АЦТ, АТЦ; у РНК – УАА (охра), УГА (опал) і УАГ (амбер).

Властивості генетичного коду:

1. *Триплетність* – одній амінокислоті в поліпептидному ланцюжку відповідають три розташованих поруч нуклеотиди молекули ДНК (і-РНК).
2. *Виродженість (надмірність)* – кількість можливих триплетів 64, а амінокислот – 20, тому одну амінокислоту може кодувати кілька триплетів.
3. *Неперекриваємість* – один нуклеотид входить до складу тільки одного триплету. Триплети не накладаються один на одного при зчитуванні інформації з ДНК.

4. *Універсальність* – у всіх живих організмів однакові триплети кодують однакові амінокислоти.

5. *Односпрямованість зчитування* (побудова нового полінуклеотидного ланцюга іде у напрямку $5' \Rightarrow 3'$).

6. Серед триплетів генетичного коду є такі, котрі не кодують амінокислот. Вони названі «*nonsense*»-кодонами (термінаторами), що позначають кінець синтезу даної поліпептидної молекули. До них відносяться в ДНК такі триплети: АТТ, АЦТ, АТЦ; у РНК – УАА, УГА, УАГ.

Запитання до розділу:

1. Скільки амінокислот входить до складу білкової молекули?
2. Яким чином за допомогою чотирьох азотистих основ кодується інформація про первинну структуру білкової молекули у ДНК?
3. Що таке кодон?
4. Тільки 61 із 64 триплетів генетичного коду використовується для позначення амінокислот. Яка ж функція трьох кодонів, що залишились?
5. Назвіть властивості генетичного коду.

4. ГЕНЕТИКА ЯК ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Оптимізація будь-якого біотехнологічного процесу спрямована на покращення генетичних властивостей продуцентів різноманітних сполук. Для цього зазвичай використовували явище мутагенезу із наступним скринінгом та відбором необхідних організмів. Сьогодні у цій області відбулися величезні зміни. У наш час розробляються й застосовуються принципово нові методи, які ґрунтуються на технології рекомбінантних ДНК. Модифікація генетичного матеріалу здійснюється різноманітними методами: у живому організмі (*in vivo*) і поза його межами (*in vitro*), відповідно, це два напрямки розвитку молекулярної біології і генетики – клітинна та генна інженерія.

За допомогою сучасних методів конструювання організмів можливе одержання нових високопродуктивних продуцентів білків і пептидів, антигенів, вірусів та ін. Бурхливий розвиток генетичної і клітинної інженерії сприяв новим напрямкам розвитку біотехнологічної промисловості. Фундаментом для виникнення новітніх методів біотехнології стали відкриття у області генетики, молекулярної біології, генетичної ензимології, вірусології, мікробіології та інших дисциплінах.

4.1 Мета та методологія генної інженерії

Генетична інженерія – це розділ молекулярної біології і генетики, який займається цілеспрямованим конструюванням нових, неіснуючих у природі генів, шляхом маніпулювання з фрагментами нуклеїнових кислот. Генна інженерія є інструментом біотехнології, яка опирається на дослідження таких біологічних наук, як молекулярна біологія, цитологія, генетика та мікробіологія. Генетичну інженерію можна розглядати як комплексну науку, яка складається з генної та геномної інженерії (табл. 4. 1).

Таблиця 4.1

Розділи генетичної інженерії

<i>Генна інженерія</i>			
Вид діяльності	Етапи	“Інструментарій”	Методи перенесення генів
Конструювання організмів із невластивими даному виду ознаками	<i>In vivo</i> : виділення генів, їх перенесення і закріплення в новому генетичному середовищі, експресія генів	Віруси, плазмиди і транспозони	Трансдукція, кон’югація, транспозиція, злиття протопластів
	<i>In vitro</i> : синтез або виділення генів; модифікація генів, заміна промоторів і термінаторів, локалізований мутагенез; приєднання генів до векторних молекул; введення генів до клітин, їх клонування і експресія	Рестриктази та інші нуклеази, ДНК-лігази, зворотня транскриптаза і інші ДНК- та РНК-полімерази. Вектори, адаптери, полімерки, зонди та ін.	Трансформація (хімічна, електропорація, прискореними частками, ліпосомами), мікроін’єкції у ядра еукаріот.
<i>Геномна інженерія</i>			
Вид діяльності	Об’єкти	Методи конструювання	
Конструювання організмів нових видів	Віруси	Рекомбінація <i>in vivo</i> та <i>in vitro</i>	
	Клітини прокариот	Міжвидова кон’югація і злиття протопластів	
	Клітини еукаріот	Злиття рослинних протопластів і тваринних клітин, введення у клітину ізольованих метафазних хромосом, мікроін’єкції хромосом у ядро клітини, перенесення ізольованих мітохондрій і хлоропластів	

Роком народження генетичної інженерії вважається 1972 рік, коли була отримана *in vitro* перша рекомбінантна молекула ДНК. Тоді група дослідників на чолі з американським біохіміком Полом Бергом, що працювали у Стенфордському університеті в Каліфорнії, повідомила про створення поза організмом першої рекомбінантної ДНК. Вона складалась із ДНК онкогенного вірусу мавпи SV40, ДНК дефектного фага λ і галактозного оперону кишкової палички *Escherihia coli*. Така рекомбінантна структура теоретично могла функціонувати як у клітинах кишкової палички, так і мавпи. Інструментом для генетичного конструювання ДНК стали дві групи ферментів – рестрикційні ендонуклеази (рестриктази) і лігази. Перші необхідні для одержання певних фрагментів ДНК, другі – для їх об'єднання. Рестриктази і лігази у сукупності з іншими ферментами (нуклеази, зворотня транскриптаза, ДНК-полімераза та ін.) забезпечують проведення всіх генноінженерних маніпуляцій. За свою роботу Пол Берг у 1980 році отримав Нобелівську премію.

Метою генної інженерії є конструювання генетичних структур та створення організмів з новою генетичною програмою, шляхом перенесення генетичної інформації з одного організму в інший (рис. 4.1).

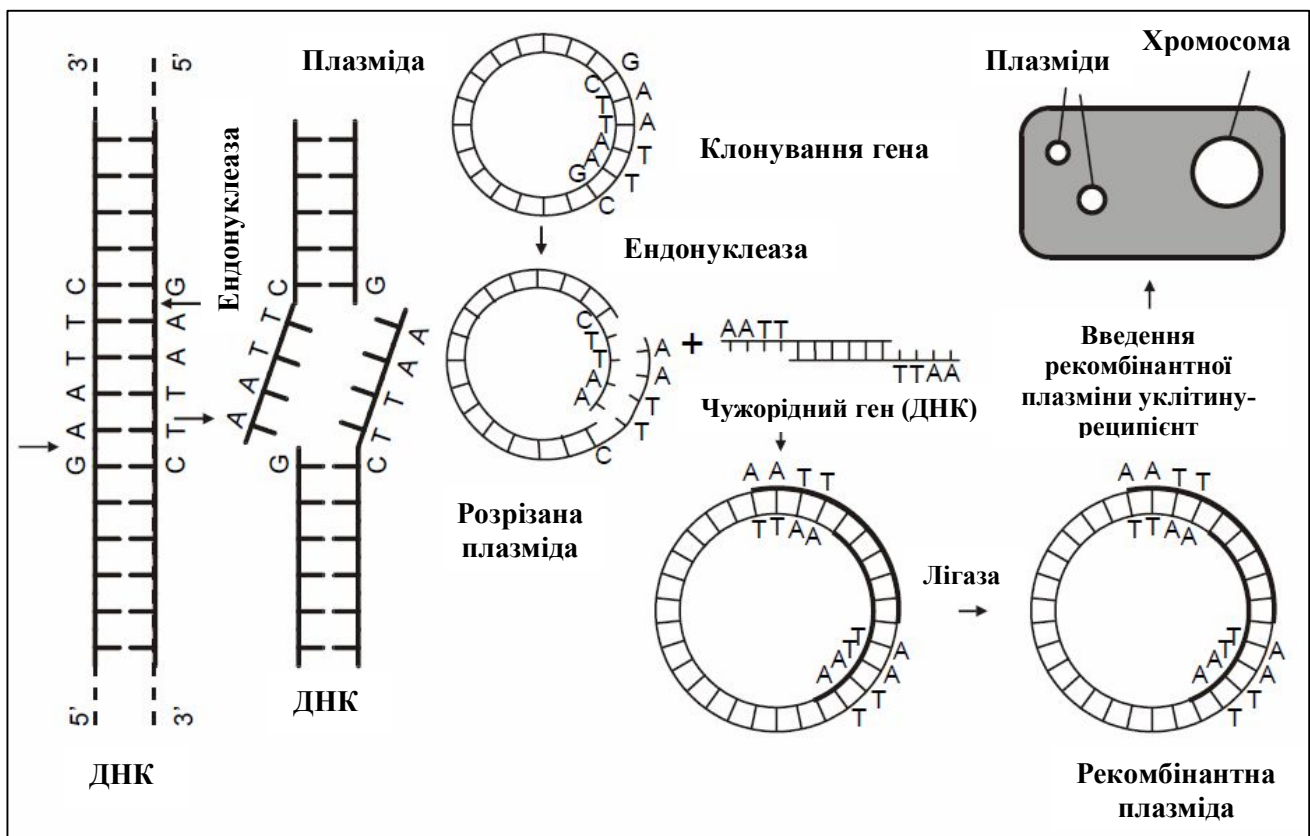


Рис. 4.1. Введення чужорідного гена у плазмиду *E. coli* і клонування рекомбінантної ДНК у клітинах.

Плазміда *E.coli* розрізається рестриктазою з утворенням на кінцях неспарених нуклеотидів (TTAA або AATT). Також за допомогою рестриктази із донорної ДНК вирізається необхідний ген з комплементарними плазмідній ДНК

послідовностями (AATT і TТАА). Обидві ДНК (гена і плазмиди) зшиваються за допомогою лігази. Гібридну плазмиду вводять у клітини *E. coli*, яка при подальшому розмноженні дає потомство клітин із даною плазмидою. Введений у плазмиду ген індукує у бактеріальній клітині синтез певного білка.

Методи генної інженерії були розроблені в 60-70-х роках ХХ століття. Вони включають наступні основні етапи (рис. 4.1):

- 1) одержання генетичного матеріалу (виділення природних генів або їх хімічний синтез);
- 2) включення цих генів у генетичну структуру (векторну молекулу), яка автономно реплікується, і створення рекомбінантної ДНК;
- 3) введення рекомбінантних молекул ДНК у клітину-реципієнт і їх включення у хромосомний апарат клітини;
- 4) відбір трансформованих клітин.

4.2. Ферменти генної інженерії

Одними із найбільш важливих ферментів, які застосовуються у генній інженерії є рестриктази, за допомогою яких отримують фрагменти ДНК, а також ДНК-лігази, які можуть з'єднувати ці фрагменти. Також у генній інженерії використовують ДНК-полімерази, які здатні копіювати ланцюг ДНК. Серед унікальних ферментів генної інженерії виділяють зворотню транскриптазу, яка здатна до синтезу ДНК на матриці інформаційної РНК.

4.2.1. Рестриктази. Якщо до клітини потрапляє чужорідна ДНК, клітинні рестриктази зв'язуються із дволанцюговими молекулами чужорідної ДНК в певних ділянках (сайтах впізнавання) і розрізають їх на фрагменти (рестрикти). Клітинна ДНК не руйнується власними рестриктазами, оскільки її сайти впізнавання модифікуються специфічними метилазами. Рестриктази (ендодезоксирибонуклеази, ендонуклеази) і метилази (метилтрансферази) позначають буквами R і M відповідно. Наявність у клітині цих двох ферментів (так звана RM-система) перешкоджає гідролізу власної ДНК. Чужорідна ДНК, яка потрапляє до клітини слугує субстратом для обох ферментів. При цьому рестриктази і метилази конкурують між собою, але активність рестриктаз переважає метилуючу активність в середньому на два порядки.

Назва фермента складається із першої букви рода бактерії і двох перших букв виду, наприклад, *Bacillus subtilis* – *Bsu*, *Escherichia coli* – *Eco*. За необхідності додається позначення штаму або серотипу: *Hinc* означає фермент виділений із клітин *Haemophilus influenzae* з серотипом *c*. Різні системи рестрикції-модифікації, які кодуються однією бактеріальною клітиною позначають римськими цифрами. Наприклад, назви *HaeI*, *HaeII* і *HaeIII* відносяться до трьох різних ферментів клітин *Haemophilus aegyptius*. Загалом ферменти RM-системи позначають як ендонуклеаза R або метилаза M з наступною назвою системи, наприклад, *R-Hinc* або *M-Hinc*. Білки RM-системи можуть кодуватись плазмідами

і фагами, тоді до назви фермента додається назва нехромосомного елемента, наприклад, *EcoP1* відноситься до ферменту, який кодується фагом P1.

З урахуванням основних властивостей ферментів RM-системи (субодиничність будови, потреба кофакторів, специфічність сайтів розщеплення і їх положення відносно сайтів впізнавання) їх поділяють на чотири класи.

Рестриктази I класу розрізають ДНК у довільних місцях на відстані від декількох сотень до кількох тисяч пар нуклеотидів від сайтів впізнавання, утворюючи при цьому суцільний спектр рестриктів (рис. 4.2). Тому рестриктази цього класу практично не використовуються у генній інженерії, оскільки за їх допомогою неможливо отримати строго детерміновані за розмірами фрагменти ДНК. Найбільш вивченими рестриктазами I класу є ферменти *EcoK* і *EcoB*, виділені відповідно із клітин *E. coli* K12 *E. coli* B.

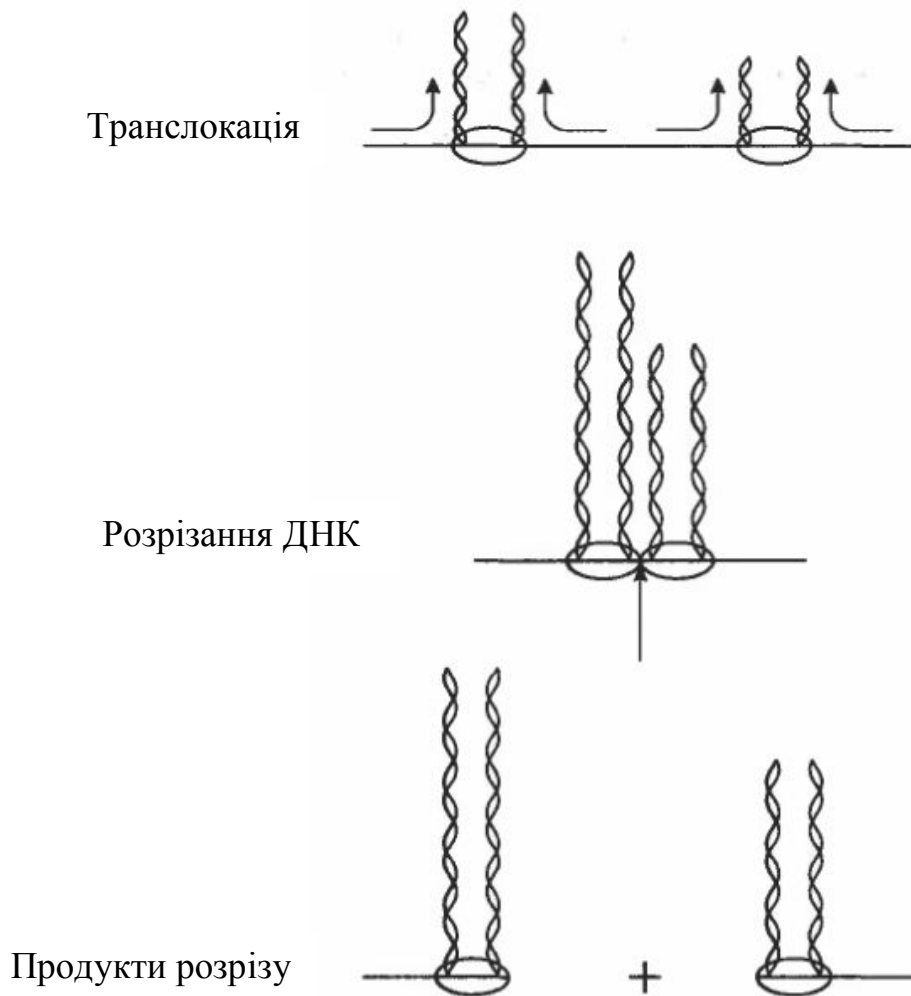


Рис. 4.2. Модель взаємодії рестриктаз I класу з молекулою ДНК.

Рестриктази I класу специфічні до немодифікованої дволанцюгової ДНК і мають наступні властивості: потребують у якості кофакторів аденозинтрифосфат (АТФ), S-аденозинмонофосфат (SAM) і іони Mg^{2+} . Рестриктази I класу після взаємодії з ДНК у сайті впізнавання починають здійснювати АТФ-залежну транслокацію (переміщення) ланцюгів ДНК в обох напрямках (рис. 4.1). При

зустрічі двох сусідніх молекул рестриктаз, що транслокують ДНК, вони розрізають дволанцюгову ДНК в районі контакту.

У рестриктаз II класу сайти розрізу ДНК співпадають із сайтами впізнавання або знаходяться біля них на чітко визначеній відстані, що дозволяє отримувати рестрикти певної довжини. Першим описаним ферментом цього класу була рестриктаза *HindIII*.

Рестриктази і метилази II класу діють незалежно, що є дуже зручним в експериментальному плані. Тому ферменти II класу широко використовуються для генетичного конструювання *in vitro*, виділення генів, їх фізичного картування з метою визначення послідовності нуклеотидів у ДНК і т.д. За своєю будовою рестриктази II класу – відносно просто організовані білки, які складаються із двох субодиниць одного типу із відносно невеликою молекулярною масою. Для специфічної дії цих ферментів необхідні лише іони Mg^{2+} у фізіологічній концентрації. Деякі із рестриктаз I, II та III класів наведені у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Рестриктази I, II та III класів

№ п/п	Позначення ферменту	Джерело виділення ферменту
1	2	3
1	<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>
2	<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
3	<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>
4	<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>
5	<i>Bme12I</i>	<i>Bacillus megaterium</i> 12
6	<i>BspRI</i>	<i>Bacillus sphaericus</i> R
7	<i>BstI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
8	<i>CviII</i>	<i>Chlorella</i> , інфікована вірусом NY-2A
9	<i>CviI</i>	<i>Chlorella</i> , інфікована вірусом IL-3A
10	<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13
11	<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> R245
12	<i>FseI</i>	<i>Frankia</i> sp. Eull b
13	<i>HaeI</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
14	<i>HaeII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
15	<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
16	<i>HapII</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>
17	<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
18	<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
19	<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
20	<i>MaeIII</i>	<i>Methanococcus aeolicus</i>
21	<i>MnoI</i>	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
22	<i>MseI</i>	<i>Micrococcus</i> sp.
23	<i>NciI</i>	<i>Neisseria cinerea</i>
24	<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>

1	2	3
25	<i>PacI</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
26	<i>PmeI</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
27	<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>
28	<i>RsaI</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
29	<i>RsrII</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
30	<i>SaII</i>	<i>Streptomyces albus</i>
31	<i>Sau3AI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
32	<i>SfiI</i>	<i>Streptomyces fimbriatus</i>
33	<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>
34	<i>SwaI</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
35	<i>Tth111I</i>	<i>Thermus thermophilus</i> 111
36	<i>VspI</i>	<i>Vibrio</i> sp.
37	<i>XmaI</i>	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
38	<i>XmnI</i>	<i>Xanthomonas manihotis</i>

Рестриктази III класу подібні до рестриктаз I класу, оскільки вони працюють в комплексі з метилазами і впізнають несиметричні послідовності нуклеотидів. Комплекс ферментів III класу складається із двох субодиниць. Здатність до специфічного зв'язування із ДНК притаманна лише метилазі, тому її називають MS-субодиницею. Розрізання ДНК R-субодиницею відбувається на певній відстані (24 – 27 пар нуклеотидів) від сайту впізнавання. До рестриктаз III класу відноситься фермент *EcoP1*.

RM-система IV класу представлена унікальним ферментом *Eco571*, який складається із одного поліпептидного ланцюга. Даний фермент володіє як ендонуклеазною, так і метилазною активністю.

4.2.2. Метилази. Необхідно розрізняти сайт-специфічні метилази, які діють у поєднанні із рестриктазами і метилази, що використовуються клітиною для різноманітних регуляторних цілей.

Молекулярний механізм дії метилаз RM-систем полягає у перенесенні метильованих груп з S-аденозил-L-метионіна на певні залишки цитозину (утворюється 5-метилцитозин) або аденіну (утворюється N₆-метиладенін), що розміщені симетрично на кожному ланцюзі сайту впізнавання, якщо сайти представлені паліндромами (ділянка ДНК, на якій повністю або майже ідентичні послідовності основ однаково читаються в обох напрямках від одного центру симетрії). В результаті цього одноіменні рестриктази перестають зв'язуватись з модифікованими сайтами і розрізати ДНК. Сайт впізнавання стійкий до дії рестриктаз, навіть коли метильований лише один ланцюг ДНК.

Метилази поділяють на ті ж класи, що і відповідні їм рестриктази. Метилази II класу зазвичай використовують для модифікації *in vitro* сайтів впізнавання з метою їх захисту від дії одноіменних рестриктаз. Крім того метилази II класу

використовують для збільшення специфічності дії рестриктаз, які мають альтернативні сайти впізнавання.

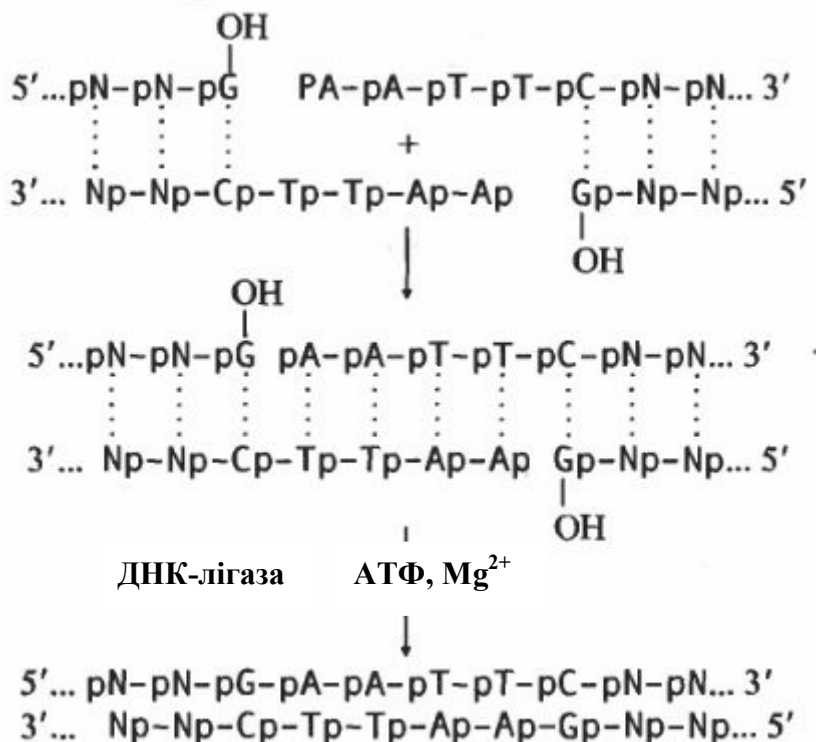
У клітині також знаходяться метилази, не пов'язані з RM-системою, які метилують певні ділянки ДНК. Інформація про наявність даних метилаз необхідна при роботі із виділеною клітинною ДНК, оскільки метильована ДНК стає нечутливою до дії рестриктаз, у яких сайти впізнавання перекриваються із метильованими ділянками клітинної ДНК.

4.2.3. Лігази. Різноманітні генетичні процеси (реплікація, рекомбінація, репарація) супроводжуються появою у дволанцюгових молекулах ДНК одноланцюгових розривів – ніків. У таких молекулах 3'ОН- і 5'р-кінці розірваних полінуклеотидних ланцюгів утримуються разом за рахунок водневих зв'язків з комплементарним ланцюгом ДНК. Ферменти, які зшивають подібні ланцюги шляхом відновлення фосфодієфірних зв'язків між сусідніми нуклеотидами названі ДНК-лігазами. Вони є другою групою найважливіших ферментів генної інженерії.

Найбільш вивченими є ДНК-лігази клітин *E. coli* і фага Т4. Вони відрізняються за кофакторами. ДНК-лігаза *E. coli* у якості кофактора потребує дифосфопіридиннуклеотид, у той час як лігаза фага Т4 – аденозинтрифосфат. Крім того, ДНК-лігаза фага Т4 на відміну від ДНК-лігази *E. coli*, здатна каталізувати реакцію об'єднання дволанцюгових фрагментів ДНК з тупими кінцями, тобто фрагментів без перекриваючихся одноланцюгових комплементарних ділянок. Тому при проведенні генно-інженерних робіт частіше використовують ДНК-лігазу фага Т4, як більш універсальний фермент.

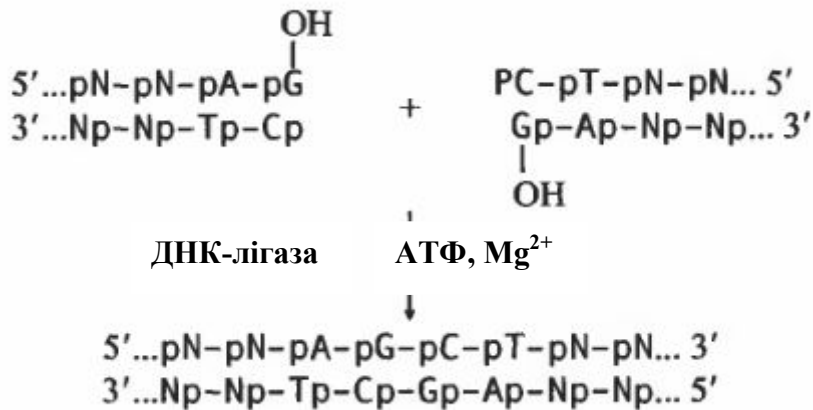
ДНК-лігаза фага Т4 каталізує два типи реакцій:

1. Лігування (зшивання) липких кінців ДНК:



Субстрати цієї реакції – дволанцюгові молекули ДНК з одноланцюговими повністю комплементарними липкими кінцями. Окремим випадком такої реакції є лігування так званого ніку – розриву у одному із двох ланцюгів двоспиральної ДНК.

2. Лігування тупих кінців ДНК:



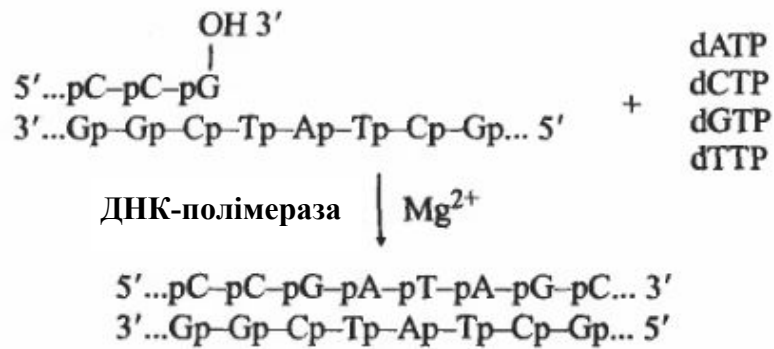
Таким чином, ДНК-лігаза фага Т4 забезпечує ковалентне поєднання будь-яких дволанцюгових фрагментів ДНК. Тому вона є одним із найважливіших ферментів, на використанні яких засновані методи рекомбінації молекул ДНК *in vitro*.

4.2.4. Полімерази. Загальна властивість ДНК- і РНК-полімераз – їх здатність вести матричний синтез нуклеїнових кислот у напрямку 5'→3'. Відмінність між ДНК- та РНК-полімеразами заключається у тому, що для початку роботи ДНК-полімерази необхідний праймер із вільною 3'ОН-групою, а РНК-полімераза здатна сама ставити на матриці перший нуклеотид. Більшість ДНК-полімераз володіють також 3'→5' екзонуклеазною (редагуювальною) активністю, яка призначена для видалення помилково приєднаних нуклеотидів.

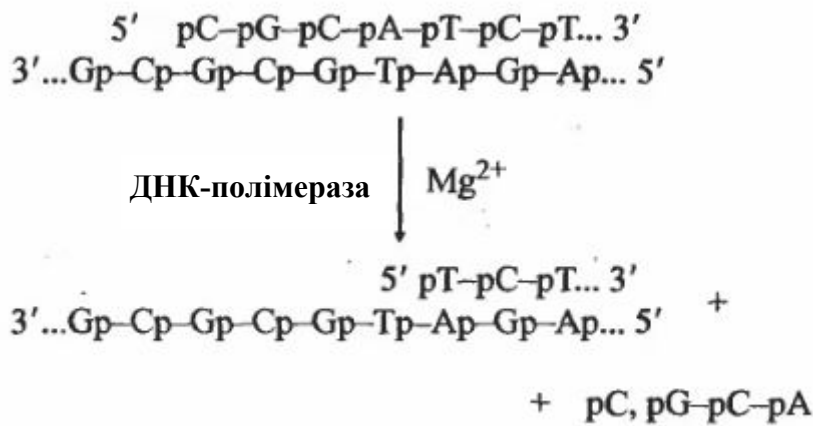
Широке поширення у генно-інженерній практиці отримали термостабільні ДНК-полімерази. Вони незамінні у дослідях з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також для секвенування ДНК методом високотемпературного полімеразного копіювання.

Розглянемо роботу ДНК-полімераз на прикладі ДНК-полімерази I *E. coli*. Даний фермент володіє трьома видами активності:

1. Полімеразна активність обумовлює синтез ланцюга ДНК у напрямку 5'→3'. Синтез здійснюється на одноланцюговій матриці у присутності дезоксирибонуклеозидтрифосфатів. Для початку реакції необхідна наявність праймера із 3'ОН-кінцем:

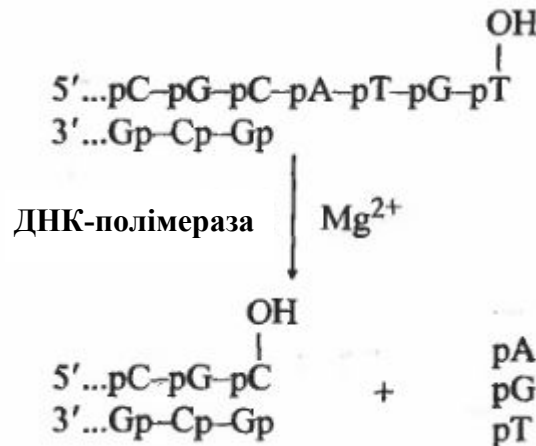


2. Екзонуклеазна активність у напрямку 5'→3' викликає відщеплення нуклеотидів із 5'-кінців дволанцюгових молекул ДНК і призводить до їх деградації:



5'→3'-екзонуклеаза розриває дієфірний зв'язок лише у спарених ділянках дволанцюгової молекули ДНК і одномоментно може вирізати до десяти нуклеотидів.

3. Екзонуклеазна активність у напрямку 3'→5' призводить до відокремлення нуклеотидів з 3'ОН-кінця одно- і дволанцюгових молекул ДНК:



Необхідно підкреслити, що 3'→5'-нуклеаза розрізає дієфірний зв'язок лише у неспарених ділянках ДНК і одномоментно може вирізати лише один нуклеотид.

ДНК-полімераза I одночасно може вести реакцію полімерізації і гідролізу нуклеотидного ланцюга у напрямку 5'→3', починаючи з одноланцюгового розриву (ніка) у дволанцюговій ДНК. При цьому нік переміщується вздовж ланцюга ДНК (тому процес називають нік-трансляцією) у напрямку 5'→3' на відстань до 1000 пар нуклеотидів, що використовують для введення у ДНК *in vitro* мічених нуклеотидів.

4.2.5. Зворотня транскриптаза. Зворотня транскриптаза (або РНК-залежна ДНК-полімераза, ревертаза) – фермент, що каталізує синтез ДНК з використанням РНК в якості матриці. Називається так тому, що більшість процесів транскрипції в живих організмах відбуваються в іншому напрямку, а саме, з молекули ДНК синтезується РНК-транскрипт.

Зворотня транскриптаза була відкрита незалежно один від одного двома дослідниками Говардом Теміном і Девідом Балтімором у 1970 році. За це відкриття вони разом із Ренато Дульбеко розділили Нобелівську премію з біології і медицини.

Зворотня транскрипція необхідна для здійснення життєвого циклу ряду вірусів, зокрема ретровірусів, наприклад, вірусів імунodefіциту людини і Т-клітинної лімфоми людини типів 1 і 2. Ці віруси містять РНК в якості носія свого геному. Після попадання вірусної РНК в клітину, зворотня транскриптаза, що міститься у вірусних частках, синтезує комплементарну РНК дволанцюгову ДНК.

Зворотню транскриптазу також кодують ретротранспозони еукаріот, яка використовується ними для вбудовування у геном клітини-господаря, подібно до того, як це відбувається у вірусів. Фермент теломераза теж свого роду є зворотньою транскриптазою, який знайдений у більшості еукаріотних організмів, зокрема людини. Теломераза використовує РНК у якості шаблону при добудовуванні теломерних ділянок хромосом у процесі реплікації ДНК.

У генетичній інженерії зворотню транскриптазу використовують для одержання ДНК-копії еукаріотичного гена, що не містить інтронів. Для цього з донорного організму виділяють зрілу мРНК, що кодує відповідний генний продукт (білок) і на матриці РНК за допомогою ревертази будують ДНК. Отриману ДНК можна трансформувати у клітини бактерій для одержання трансгенного продукту.

Зворотня транскриптаза (ревертаза) володіє трьома ферментативними активностями:

1. ДНК-полімеразною, використовуючи у якості матриці як РНК, так і ДНК;
2. Активністю РНКазы Н, яка гідролізує РНК у складі гібриду РНК-ДНК, але не гідролізує одно- чи дволанцюгову РНК;
3. ДНК-ендонуклеазною (важлива для інтеграції вірусної ДНК у генетичний апарат клітини).

Щоб почати синтез ревертазі необхідний праймер. Праймером може слугувати одноланцюговий сегмент як РНК, так і ДНК, які у процесі реакції виявляються ковалентно зв'язаними з новосинтезованим ланцюгом ДНК (рис. 4.3). Зворотню транскриптазу використовують для транскрипції матричної РНК у комплементарну ДНК.

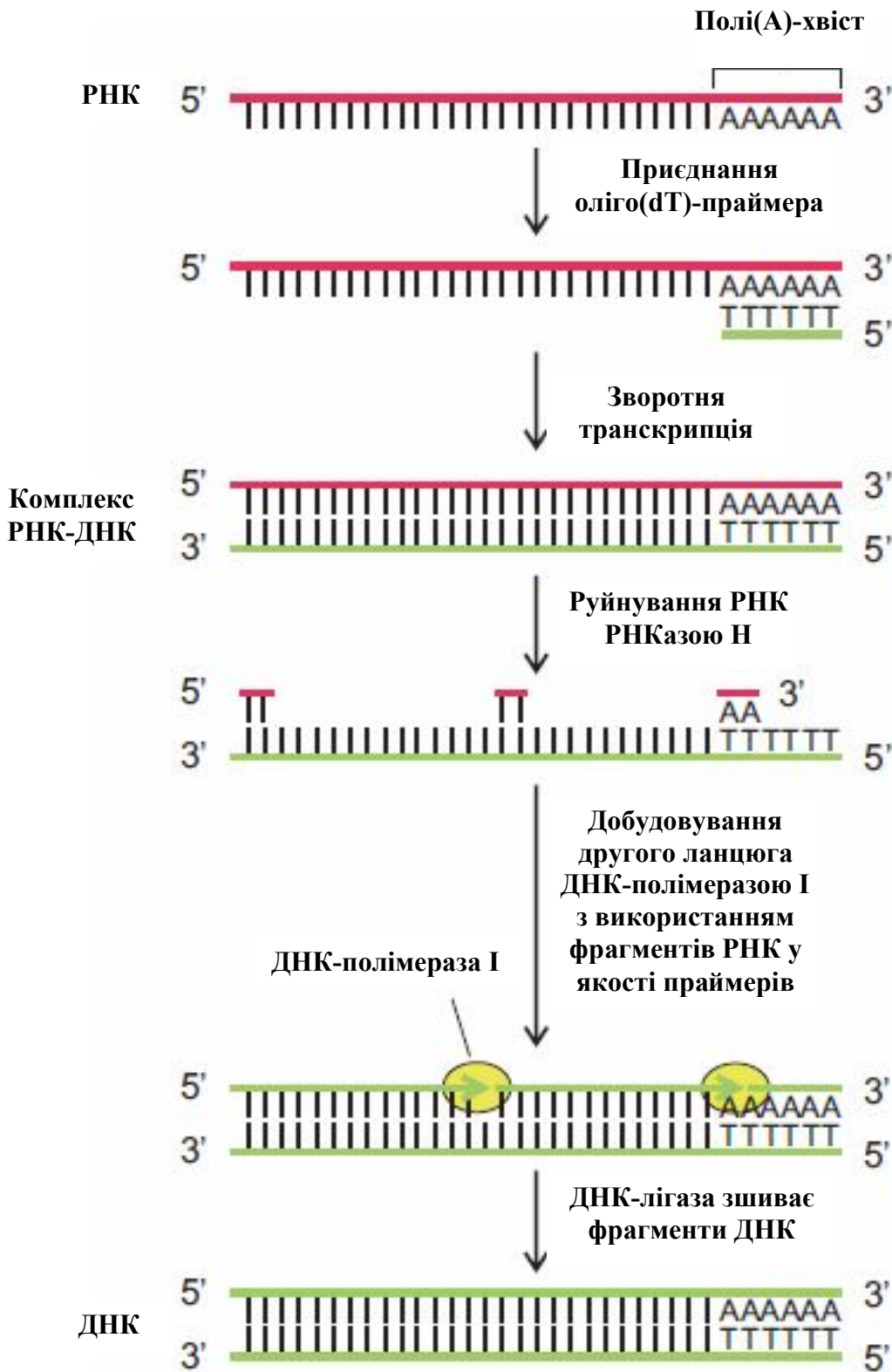


Рис. 4.3. Схема синтезу ДНК на матриці РНК.

4.2.6. Нуклеази. Ферменти-нуклеази володіють ендо- і екзонуклеазною активністю і не проявляють якої-небудь специфічності до нуклеотидної послідовності ДНК. Ці ферменти використовують для видалення будь-яких одноланцюгових структур, включаючи проломи (одноланцюгові ділянки у

дволанцюговій молекулі ДНК), кінці шпильок і частково денатуровані області ДНК. Нуклеаза може утворювати ніки у суперзакручених молекулах ДНК, а також викликати деградацію ДНК одночасно з обох кінців дволанцюгової молекули.

4.3. Векторні молекули

Вектором (від латинського *vector* – переносчик, носій) у генетичній інженерії називають молекулу ДНК, що здатна самостійно реплікуватись, включати чужорідну ДНК, переносити її у реципієнтні клітини і стабільно там підтримувати.

Вектори класифікують за такими ознаками:

1. В залежності від області використання розрізняють:

- 1) вектори загального призначення (клонування геномних генів, будь-яких фрагментів ДНК);
- 2) вектори для експресії клонованих генів (синтез і-РНК і білків);
- 3) спеціалізовані вектори (секвенування і мутування генів, вивчення особливостей регуляції клонованих генів, ідентифікація у клонуемій ДНК промоторів та інших регуляторних сайтів).

2. За походженням ДНК-вектори поділяють на:

- 1) плазмідні (існують у клітині і поза клітиною лише у вигляді молекул ДНК);
- 2) фагові або вірусні (існують у вигляді молекул ДНК і віріонів);
- 3) гібридні (поєднують окремі властивості плазмід і вірусів (фагів) – фагміди, косміди, фазміди).

Фагові вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК довжиною 15-25 т.п.н., що не є достатнім для клонування генів тварин і рослин, довжина яких перевищує 35-40 т.п.н. Необхідною ємністю володіють гібридні векторні молекули, які назвали космідами.

Косміда – це невелика за розмірами плазміда, у яку *in vitro* уведені *cos*-сайти ДНК фага λ . Звідси і походить назва векторів даного типу. У ДНК нормальних фагових часток *cos*-сайти розташовані на кінцях цієї молекули, розділяючи таким чином мономери фагової ДНК у конкатемерах. Конкатемери фагової ДНК поєднують кілька мономерів, які є попередниками зрілих фагових ДНК перед упакуванням у фагові часточки. У таких конкатемерах сусідні *cos*-сайти розташовуються на відстані 35-45 т.п.н. один від одного і заключають між собою увесь фаговий геном. В процесі упакування *cos*-сайти впізнаються відповідними компонентами ферментної системи і у цих сайтах відбувається послідовне відрізання упакованої у фагову частку λ -ДНК від іншої неупакованої ДНК конкатемера.

Наявність *cos*-сайтів у ДНК є єдиною необхідною умовою упакування ДНК у фагові часточки. Це означає, що послідовність нуклеотидов λ -ДНК, яка розташована між двома *cos*-сайтами і містить у собі весь фаговий геном (35-45 т.п.н.), може бути замінена *in vitro* на аналогічний за довжиною фрагмент чужорідної ДНК і упакована у фагові часточки. Такий штучний фаг виявляється

нежиттєздатним. Однак після адсорбції химерної фагової частки на поверхні бактеріальної клітини її ДНК проникає всередину бактерії і починає автономно реплікуватися як плазмід, розмір якої становить 30-40 т.п.н. Оскільки така плазмід (косміда) містить у своєму складі селективні маркери у вигляді генів стійкості до антибіотиків, її підтримують у бактеріальних клітках шляхом вирощування бактерій на середовищі з відповідними антибіотиками. Незважаючи на те, що ємкість космідних векторів значно вище фагових, ефективність клонування ДНК у космідах нижча, хоча й досягає у певних випадках 10⁵-10⁶ бактеріальних колоній на 1 мкг клонуємої ДНК. При такій ефективності упакування необхідно лише 2-4 мкг клонуємої ДНК для одержання повної клонотеки більшості еукаріотичних геномів.

Стадія упакування ДНК космід у фагові частки використовується лише для полегшення процесу введення рекомбінантних ДНК великого розміру всередину бактеріальних клітин. Такий процес імітує проникнення фагової хромосоми у бактерію під час фагової інфекції. У випадку космід подібність між їх проникненням у бактеріальні клітини і фаговою інфекцією на цьому закінчується. Однак подібність цих процесів є більш глибокою у випадку векторів, які були названі фазмідами.

Фазміди – це векторні молекули ДНК, які складаються із генетичних елементів плазмід і хромосом бактеріофагів. Вони можуть володіти ємкістю, яка характерна для λ -векторів, а також існувати в певних умовах у бактеріальних клітинах у вигляді плазміди або ж упакуватися у фагові частки *in vivo* при зміні цих умов.

3. За структурою ДНК розрізняють кільцеві і лінійні вектори.

4. За способом реплікації у клітині виділяють:

- 1) автономні вектори (реплікуються самостійно);
- 2) інтегративні вектори (реплікуються у складі клітинної хромосоми).

5. За числом молекул у клітині вектори можуть бути:

- 1) малокопійними (кілька копій);
- 2) мультикопійними (десятки копій).

6. За числом реплікаторів, які знаходяться у векторному геномі, вектори ділять на:

- 1) монореplikонні;
- 2) біреplikонні (біреplikонні вектори також називають човниковими, якщо вони можуть реплікуватись у клітинах різних видів).

Для ефективного виконання своїх функцій вектори повинні відповідати наступним вимогам:

- 1) бути реplikоном, щоб стабільно існувати у клітині;
- 2) мати селективний маркер, який дозволяє відбирати трансформовані вектором клітини;
- 3) мати хоча б один сайт рестрикції для введення чужорідної ДНК.

4.4. ДНК-технології

Необхідний ген можна отримати кількома способами:

- 1). Отримання фрагментів ДНК із природного матеріалу;
- 2). Хімічний синтез ДНК;
- 3). Синтез комплементарної ДНК на матриці і-РНК.

Виділення генів із природної ДНК проводять за допомогою рестриктаз, які каталізують розщеплення ДНК у певних сайтах. Розріз ДНК можна проводити двома способами: перший – з утворенням так званих “тупих” кінців (розріз обох ланцюгів ДНК на одному рівні); другий – з утворенням так званих “липких” кінців (розріз ДНК з утворенням одного короткого ланцюга, а другого на кілька нуклеотидів довшого).

Нуклеотидну послідовність ДНК із липкими кінцями за допомогою лігази можна вбудувати у попередньо оброблений рестриктазою вектор. Але цей метод має істотні недоліки, оскільки досить важко підібрати ферменти для строгого вирізання необхідного гена. Разом із геном захоплюються “зайві” нуклеотиди або, навпаки, ферменти відрізають частину гена, у результаті чого він стає функціонально неповноцінним.

Хімічний синтез ДНК застосовують у тому випадку, якщо відома первинна структура білка або пептиду, синтез якого кодує даний ген. Для цього необхідне повне знання нуклеотидної послідовності гена. Цей метод дозволяє точно відтворити потрібну послідовність нуклеотидів, а також вводити у гени ділянки впізнавання рестриктазами, ряд регуляторних послідовностей та ін. Вказаний метод складається з хімічного синтезу коротких 8-16-членних одноланцюгових фрагментів ДНК (олігонуклеотидів) за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами. Потім одноланцюгові фрагменти ДНК утворюють дволанцюгову структуру за рахунок водневих зв'язків із комплементарними азотистими основами другого ланцюга. При цьому сусідні олігонуклеотиди, які відносяться до комплементарних ланцюгів, повинні частково перекриватись один з одним із утворенням “липких” кінців. Отримані таким чином дволанцюгові олігонуклеотидні ділянки зшиваються лігазою.

Зараз є “генні машини”, які під контролем мікропроцесора дуже швидко синтезують специфічні короткі послідовності одноланцюгової ДНК (рис. 4.4). Необхідна послідовність азотистих основ вводиться через клавіатуру пульта керування. Після цього мікропроцесор відкриває клапани, через які за допомогою насоса у колонку синтезу ДНК послідовно надходять нуклеотиди, а також необхідні реагенти і розчинники. Колонка синтезу ДНК наповнена бусинками кремнію, на яких збираються молекули ДНК. Отримані олігонуклеотиди зшиваються за допомогою лігази. За допомогою цього методу були отримані гени А- і В-ланцюгів інсуліна, проінсуліна, соматотропіна та ін.

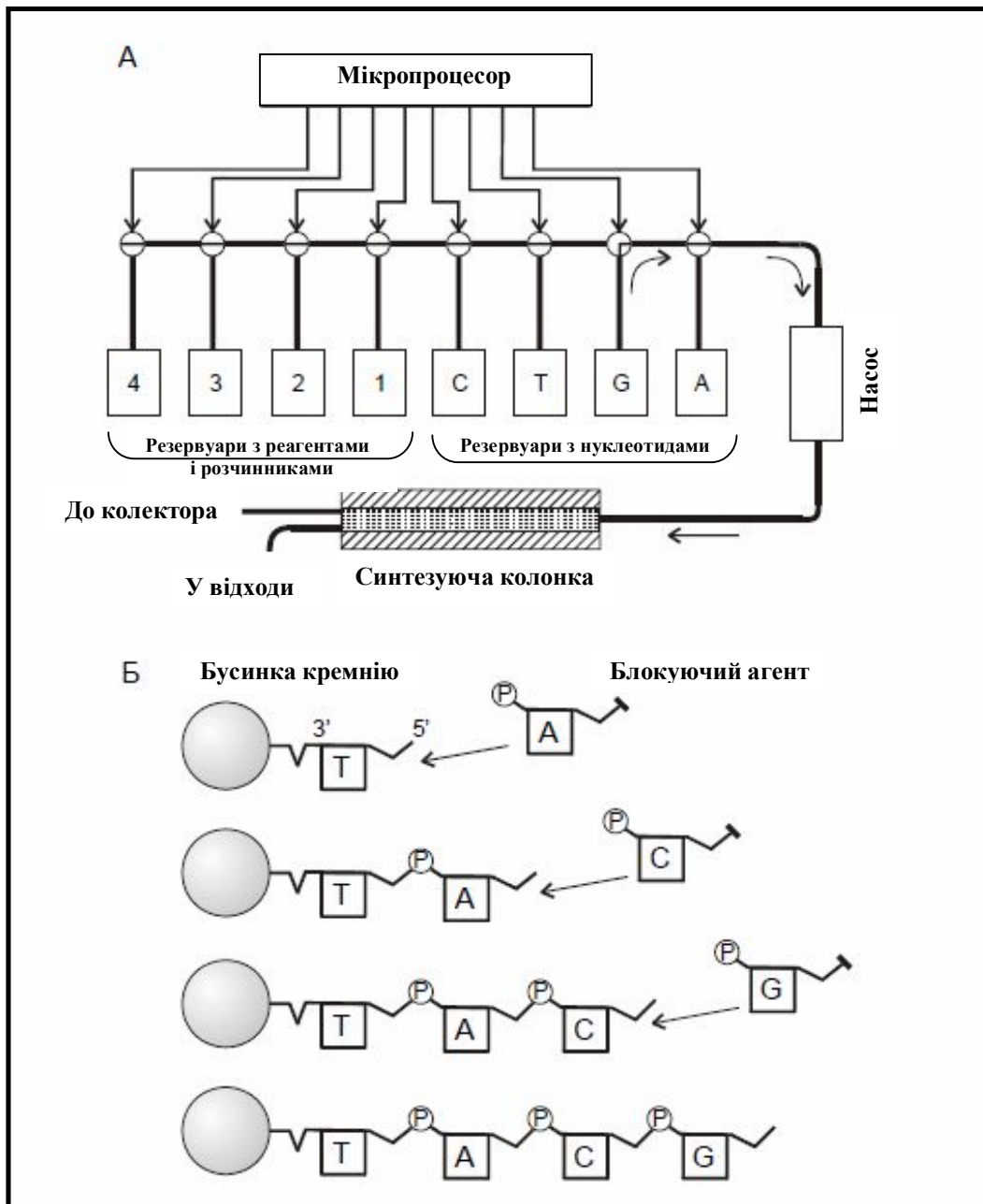


Рис. 4.4. Схема роботи “генної машини”.

Синтез комплементарної ДНК на матриці і-РНК є в даний час найпоширенішим методом. Спочатку із клітин виділяють матричну РНК, яка кодується необхідним геном. Потім при певних умовах на виділеній і-РНК, як на матриці, за допомогою зворотної транскриптази (ревертази) синтезується комплементарний ланцюг ДНК. Отриманий таким чином ланцюг ДНК служить матрицею для синтезу другого ланцюга за допомогою ДНК-полімерази. Даний метод у 1979 році був використаний для синтезу гена гормону росту людини (соматотропіна).

Отриманий тим або іншим способом ген містить інформацію про первинну структуру білка, але для реалізації цієї інформації необхідні додаткові механізми. Перенесення генетичної інформації у клітину здійснюється у складі вектора. Ген разом з вектором складає рекомбінантну молекулу ДНК.

4.4.1. Конструювання рекомбінантних ДНК. При звичайному введенні у бактеріальну клітину чужорідна ДНК руйнується ферментними системами клітини. Щоб цього не сталося, використовують векторні молекули ДНК, які здатні до автономного існування при введенні у клітину, а при її поділі – реплікуватися. Вектор також несе у своєму складі генетичну ознаку, яка є необхідною для наступного розпізнавання і відбору трансгенних організмів. Зазвичай у якості маркерних генів використовують гени стійкості до антибіотиків.

Конструювання рекомбінантних ДНК здійснюється *in vitro*. Для цього вибирають необхідний вектор і за допомогою рестрикційних ферментів розрізають його у певній ділянці з утворенням липких комплементарних кінців. Далі комплементарні кінці вектора і необхідного гена зшиваються лігазою з утворенням кільцевої молекули ДНК.

У якості векторів використовують плазмиди і віруси. Віруси швидко переходять із клітини у клітину і за короткий проміжок часу здатні інфікувати увесь організм. Важливою проблемою при використанні вірусів є атенуація – ослаблення патогенності віруса. Таким чином невідомо, чи інфіковані вірусом клітини виживуть і зможуть передавати потомству уведену генетичну програму. Найпоширенішими векторами є невеликі багатокопійні плазмиди. Перші плазмиди були виділені із бактерій, а згодом їх стали конструювати методами генної інженерії.

Використання векторів загального призначення – методично нескладне завдання, яке не вимагає спеціального обладнання. У генній інженерії найбільш поширеними для клонування є плазмідні вектори *E. coli* (*pBR322*, *pBR325*, *pACYC117*, *pACYC 184*). Сучасні плазмідні вектори у присутності хлорамфенікола здатні до реплікації, незалежно від поділу хромосоми, при цьому кількість копій плазмід може зростати до $1-2 \cdot 10^3$ копій на клітину.

При одержанні бібліотеки генів рослин і вищих тварин, у яких загальна довжина геному становить до $3 \cdot 10^9$ т.п.н. вирішальну роль відіграє ємкість вектора. У цьому випадку у якості вектора використовують ДНК фага λ . За допомогою спеціальних методів рекомбінантні ДНК вводять прямо у фагові частинки. Ще більшу ємкість мають косміди, у яких *cos*-сайт фага λ бере участь в упакуванні ДНК у фагову частку. Досягнуті методи упакування ДНК дозволяють одержувати бібліотеки генів практично будь-яких організмів.

4.4.2. Перенесення генів у клітини організму-реципієнта. Перенесення рекомбінантних ДНК у клітину-реципієнт здійснюється шляхом трансформації, кон'югації або трансдукції. Трансформація бактерій – процес перенесення ДНК, ізольованої із одних клітин в інші. Трансформація була відкрита Ф. Гріффітсом у 1928 році на дослідах з пневмококами. У подальшому трансформація була продемонстрована і вивчена у багатьох видів бактерій. Встановлено, що до трансформації здатні лише деякі, так звані “компетентні” клітини (здатні включати чужорідну ДНК і синтезувати особливий трансформуючий білок). Після проникнення у клітину один із ланцюгів рекомбінантної ДНК деградує, а інший за рахунок рекомбінації з гомологічною ділянкою реципієнтної ДНК включається до

бактеріальної хромосоми або стає позахромосомною одиницею. Трансформація – це найбільш універсальний спосіб передачі генетичної інформації, через що має велике значення для генних технологій.

Кон'югація – один із способів обміну генетичним матеріалом, при якому відбувається одностороннє перенесення генетичної інформації від донора до реципієнта. Цей процес перебуває під контролем особливих кон'югативних плазмід, а перенесення інформації від донорної клітини до реципієнтної здійснюється через спеціальні статеві ворсинки (пілі). Також можлива передача генетичної інформації за допомогою некон'югативних плазмід за допомогою так званих плазмід-помічників.

Процес перенесення генетичного матеріалу за допомогою вірусів від клітини-донора до клітини-реципієнта називається трансдукцією. Нині розроблені методи введення генетичного матеріалу до клітин тварин і рослин за допомогою спеціальних човникових вірусних векторів.

4.4.3. Скринінг і відбір рекомбінантних клітин. Після перенесення до клітин сконструйованої ДНК лише невелика частина реципієнтних клітин приймає необхідний ген. Тому дуже важливим етапом є ідентифікація клітин, які несуть необхідний ген.

На першій стадії ідентифікують і відбирають клітини, що несуть вектор, на основі якого здійснене перенесення ДНК. Відбір проводять за генетичними маркерами, якими позначений вектор. Головним чином маркерами є гени стійкості до антибіотиків. Тому відбір проводять за допомогою висіву клітин на середовища, що містять конкретний антибіотик. Після висіву на цих середовищах виростають тільки клітини, у складі яких знаходиться вектор з генами стійкості до антибіотику.

На другій стадії відбирають клітини, що несуть вектор і необхідний ген. Для цього використовують дві групи методів: 1) засновані на безпосередньому аналізі ДНК клітин-реципієнтів і 2) засновані на ідентифікації ознаки, яка кодується потрібним геном. При використанні першої групи методів із клітин виділяють векторну ДНК, і на ній проводиться пошук ділянок, що несуть відповідний ген. Далі проводять секвенування частини нуклеотидної послідовності гена. Можливий інший метод – гібридизація виділеної із клітин ДНК із зондом (шуканий ген або відповідна йому мРНК); виділену ДНК переводять у одноланцюговий стан і вона вступає у взаємодію із зондом. Далі визначають наявність дволанцюгових гібридних молекул ДНК. При використанні другої групи методів можливий безпосередній відбір клітин, які синтезують білок – продукт транскрипції і трансляції необхідного гена. Застосовуються також селективні середовища, що підтримують ріст тільки тих клітин, які отримали необхідний ген.

За допомогою методів генетичної інженерії можливе конструювання нових форм мікроорганізмів за заданим планом, здатних синтезувати різноманітні продукти, у тому числі еукаріотичних організмів. Рекомбінантні мікробні клітини швидко розмножуються у контрольованих умовах і здатні утилізувати різноманітні, у тому числі, недорогі субстрати.

Основні проблеми, що виникають при генетичних маніпуляціях, полягають у наступному: 1) гени при трансформації, потрапляючи у чужорідне середовище, зазнають впливу протеаз, тому необхідні гени потрібно захищати від дії протеаз; 2) як правило, продукт трансплантованого гена акумулюється у клітках і не виділяється у середовище; 3) більшість бажаних ознак кодується не одним, а групою генів. Усе це суттєво ускладнює перенесення потрібних генів і вимагає розробки технології послідовної трансплантації кожного гену.

4.5. Основні напрями генної інженерії мікроорганізмів

Розвиток технології рекомбінантних ДНК дозволив проводити виділення генів еукаріот і експресувати їх у гетерологічних системах. Зараз методи генетичної інженерії дозволяють конструювати генетичні системи, що здатні функціонувати у клітинах про- та еукаріот. Ці можливості дозволяють створювати організми з новими надзвичайно важливими властивостями, наприклад, бактеріальні клітини, які здатні синтезувати еукаріотичні білки.

Серед білкових продуктів, що представляють великий інтерес, виділяються такі біологічно активні речовини, як гормони. Важливе місце серед них займають гормони білкової будови. Ці гормони, багато з яких гостро необхідні в медицині, донедавна одержували екстракцією із тканин тварин за умови, що гормон не має виражену видову специфічність. Порівняно короткі пептидні гормони намагалися одержувати хімічним синтезом. Але такий шлях одержання виявився нерентабельним уже для молекул, які складаються із декількох десятків ланок. Єдиним джерелом гормонів із край вираженою видовою специфічністю (гормон росту соматотропін) були органи померлих людей.

Успіхи генної інженерії дали надію на можливість клонування генів, що відповідають за синтез ряду гормонів у мікробних клітинах. Перші успішні результати по експресії хімічно синтезованої послідовності нуклеотидів ДНК, що кодує 14-ланковий пептидний гормон соматостатін (антагоніст соматотропіна) були отримані в 1977 р. у США компанією "Генетек". Для запобігання процесу руйнування гормону в бактеріальних клітинах під впливом пептидази автори застосували підхід, який потім був успішно використаний для одержання інших пептидних гормонів. Був сконструйований гібридний ген, частина якого була взята з гена ферменту β -галактозидази кишкової палички, а залишок представляв собою фрагмент, що кодує власне соматостатін (фрагмент синтезували хімічним методом). Уведений до бактеріальної клітини гібридний ген кодував синтез гібридного білка, який складався більш ніж на 90 % з амінокислотної послідовності β -галактозидази і амінокислот соматостатіна. На межі ділянок двох вихідних генів перебував кодон амінокислоти метіоніну. Останнє дозволило обробити гібридний білок бромціаном, який розриває пептидний зв'язок, утворений метіоніном і серед продуктів розщеплення був виявлений соматостатін. Даний підхід був використаний для одержання багатьох пептидних гормонів (А- і В-ланцюгів інсуліну, нейропептида лейенкефаліна, брадикініна, ангіотензіна та ін.).

Генноінженерними методами за короткий термін були створені мікроорганізми-суперпродуценти, за допомогою яких стало можливим отримання високого виходу ряду білків вірусів і тварин. Нині створені мікроорганізми, у яких до 20 % клітинного білка становлять генноінженерні продукти, наприклад, коров'ячий антиген вірусу гепатиту В, головний капсидний антиген вірусу ящуру, ренін теляти, поверхневий антиген вірусу гепатиту В та ін.

4.5.1. Біосинтез інсуліну людини. Гормон інсулін складається із двох поліпептидних ланцюгів А і Б, довжиною 20 і 30 амінокислот відповідно. Послідовність інсулінових ланцюгів була встановлена у 1955 р. Сенгером. Хімічний синтез двох ланцюгів інсуліну, який включав 170 реакцій, був реалізований у 1963 р. у США, ФРН і Китаї. Але перенести такий складний хімічний процес у промисловість виявилось неможливим. Тому до 1980 р. інсулін отримували за рахунок його виділення із підшлункової залози великої рогатої худоби (підшлункова залоза корови у середньому важить 200 – 250 г, а для одержання 100 г кристалічного інсуліну необхідно до 1 кг вихідної сировини). Тому потреби в інсуліні задовольняли не повністю. Так, у 1979 р. з 6 млн. зареєстрованих хворих цукровим діабетом інсулін одержували тільки 4 млн. чоловік. У 1980 р. датська компанія "Ново індастри" розробила метод перетворення інсуліну свині в інсулін людини за допомогою ферментаційного заміщення залишку аланіна, який є 30-ю амінокислотою у В-ланцюгу інсуліна на залишок треоніна. У результаті був отриманий однокомпонентний інсулін людини 99% чистоти. В організмі тварини два поліпептидні ланцюги першочергово є частинами однієї білкової молекули довжиною 109 амінокислот – це препроінсулін. При синтезі у клітинах підшлункової залози перші 23 амінокислоти слугують сигналом для транспорту молекули крізь мембрану клітини. Потім ці амінокислоти відщеплюються і утворюється проінсулін довжиною 86 амінокислот.

У 1980 р. Гілберт з колегами виділили мРНК інсуліну з пухлини β -клітин підшлункової залози пацюка (у той час не дозволяли маніпулювати з генами людини) (рис. 4.5). Отриману ДНК-копію мРНК вбудували у плазмиду *pBR 322* у середню частину гена пеніцилінази (фермент у нормі виділяється із клітини), яку ввели до бактеріальної клітини. Сконструйована плазміда містила інформацію про структуру проінсуліна, а не препроінсуліна. При трансляції мРНК у клітках *E. coli* синтезувався гібридний білок, який містив амінокислотні послідовності пеніцилінази і проінсуліна. Гормон із цього білка вирізали трипсином. Було доведено, що отриманий у такий спосіб білок інсуліну впливає на цукровий обмін аналогічно гормону підшлункової залози.

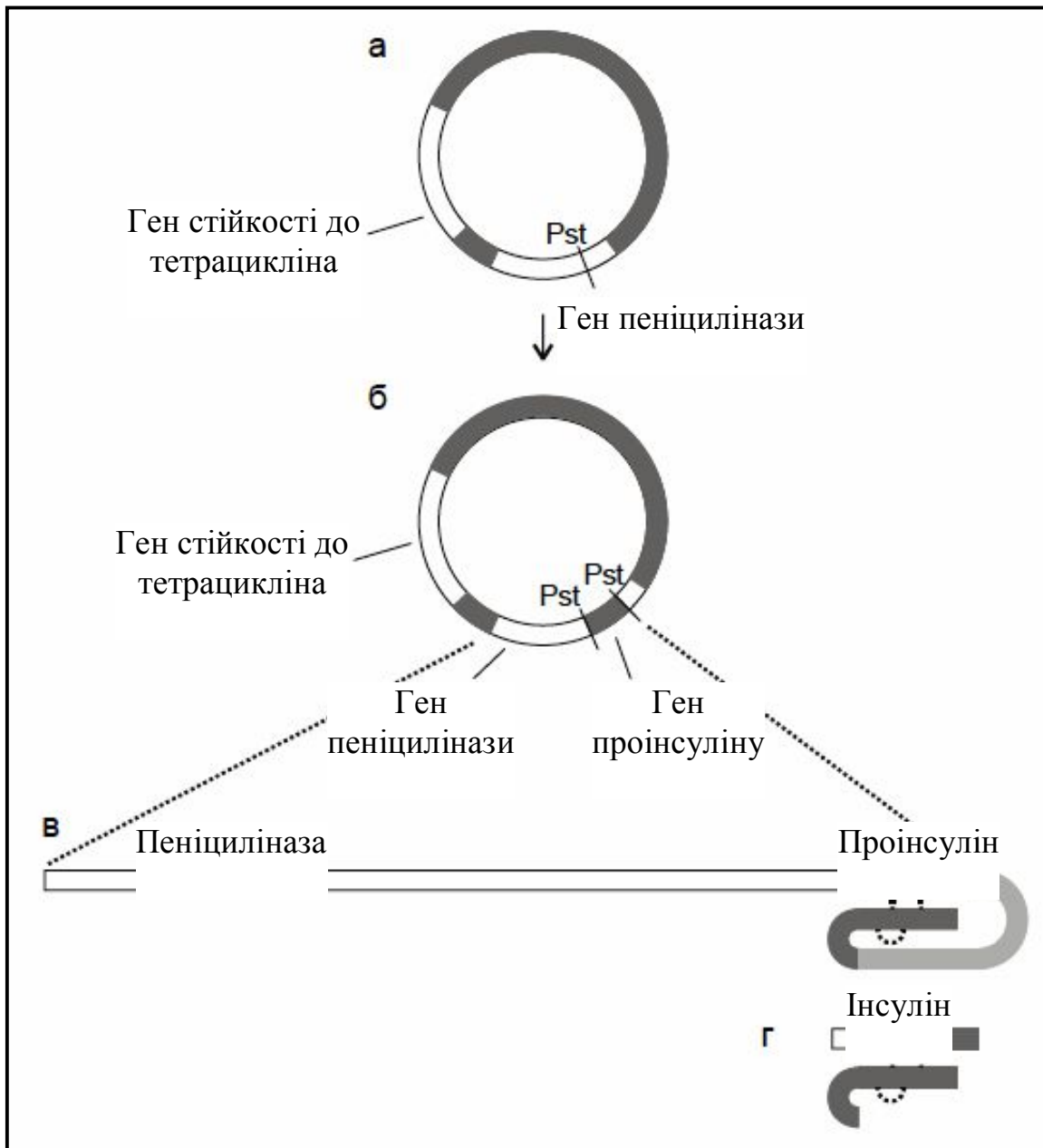


Рис. 4.5. Схема біосинтезу інсуліну пацюка у клітинах *E. coli*.

- а). Карта плазмиди *pBR 322* з двома генами – пеніцилінази і стійкості до тетрацикліну.
- б). Карта, отримана при визначенні послідовності кДНК рекомбінантної плазмиди у продукуючій інсулін *E. coli*.
- в). Гібридний білок.
- г). Біологічно активний інсулін, який утворюється після видалення пеніцилінази і сегмента проінсуліна.

У 1979 р. у США протягом трьох місяців синтезували гени, які кодують А- і В-ланцюг інсуліну; гени були зібрані з 18 і 11 олігонуклеотидів відповідно. Далі гени вбудували, як і при одержанні соматостатіна, у плазмиду наприкінці гена β -галактозидази кишкової палички.

У клітинах *E. coli* також здійснений синтез проінсуліна, а не тільки його окремих ланцюгів. На виділеній інформаційній РНК інсуліну була синтезована ДНК-копія, яку за допомогою вектора ввели до бактеріальної клітини. Синтез проінсуліна має певні переваги, оскільки процедури екстракції і очищення гормону мінімальні.

Удосконалення техніки одержання генноінженерних штамів-продуцентів за допомогою різних прийомів (ампліфікацією плазмід, інкапсулюванням рекомбінантних ДНК, які вводяться до клітини, пригніченням протеолітичної активності реципієнтних клітинок) дозволило отримати високі виходи інсуліну (до 200 мг/л культуральної рідини). Медико-біологічні та клінічні випробування генноінженерного інсуліна показали придатність препарату і у 1982 р. він був допущений до виробництва у багатьох країнах.

4.5.2. Мікробний синтез гормону росту людини – соматотропіну. Соматотропін (гіпофізарний гормон росту) уперше був виділений у 1963 р. із трупного матеріалу. Вихід гормону з одного гіпофіза становив близько 4-6 мг у перерахунку на готовий фармацевтичний препарат. Для лікування карликовості необхідна доза становить 6 мг на тиждень протягом року. Отримання соматотропіну із гіпофізу трупів мало ряд недоліків, зокрема низький вихід гормону, а також гетерогенність препарату, який отримували за допомогою екстракції. Проти отриманого таким чином соматотропіну у організмі вироблялися антитіла, які зводили нанівець дію гормону. Крім того, існувала небезпека, що при прийманні препарату могло відбутися зараження організму рядом вірусів. Тому діти, що отримували даний препарат, потребували багаторічного медичного спостереження.

Генноінженерний препарат соматотропіну має безсумнівні переваги: доступний у великих кількостях, гомогенний, не містить вірусів. Синтез соматотропіна, який складається із 191 амінокислотного залишку, був здійснений у США Гедделем зі співробітниками у 1979 р. (компанія "Генентек") (рис. 4.6).

При хіміко-ферментному синтезі ДНК отримують ген, що кодує попередник соматотропіна, тому був обраний спеціальний шлях клонування гена соматотропіну. На першому етапі була отримана дволанцюгова ДНК-копія і-РНК, далі було проведене рестрикційне розщеплення отриманої ДНК з отриманням нуклеотидної послідовності, яка кодує амінокислотну послідовність гормону, крім перших 23 амінокислот. Далі провели клонування синтетичного полинуклеотиду, який містив інформацію про ці 23 амінокислоти разом зі стартовим *ANG* кодоном на початку. Два отриманих фрагменти ДНК з'єднали і вбудували до пари *lac*-промоторів і ділянки зв'язування рибосом. Сконструйований ген трансплантували у клітини *E. coli*. Синтезований бактеріями гормон мав необхідну молекулярну масу, не був зв'язаний з яким-небудь білком, а його вихід становив близько 100 000 молекул на клітку. Але отриманий таким чином гормон містив на N-кінці поліпептидного ланцюга додатковий залишок метіоніну, при видаленні якого спостерігався низький вихід гормону.

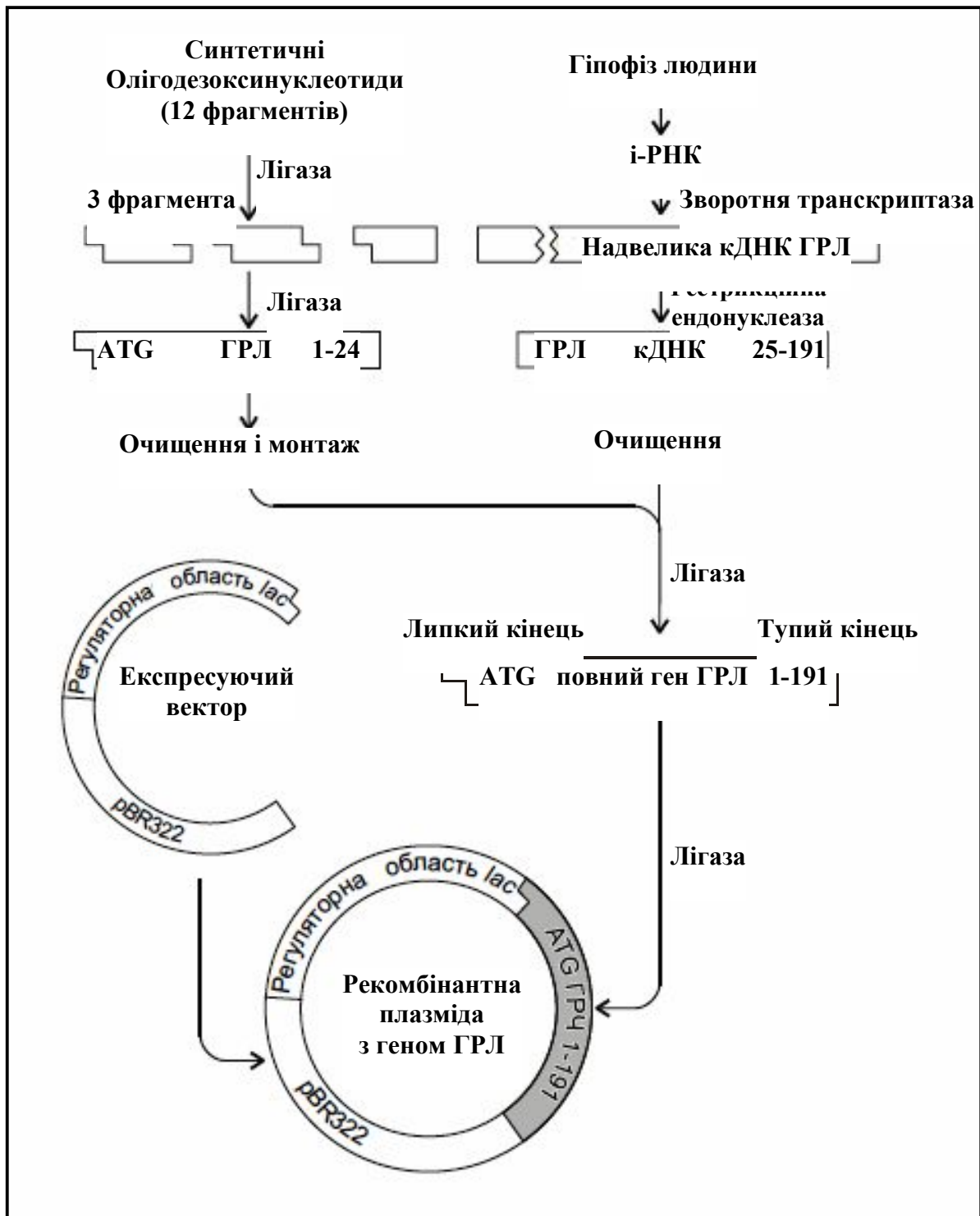


Рис. 4.6. Схема конструювання гена соматотропіна комбінацією хімічного синтезу і виділення природної і-РНК.

У 1980 р. були отримані докази того, що генноінженерний соматотропін має біологічну активність нативного гормону. Клінічні випробування препарату також пройшли успішно. У 1982 р. гормон соматотропні був також отриманий на основі сконструйованої кишкової палички в Інституті Пастера в Парижі. Вартість гормону до 1990 р. знизилася до 5 доларів за одиницю препарату. У наш час його

починають застосовувати у тваринництві для стимулювання росту домашньої худоби, збільшення удоїв тощо.

4.5.3. Виробництво рекомбінантних інтерферонів. Інтерферони – це цитокіни з противірусною, імуномодулюючою та протипухлинною активністю. Вони впливають на ряд процесів, включаючи регуляцію росту клітин, їх диференціацію, апоптоз, беруть опосередковану участь у становленні імунної відповіді, а також включенні механізмів антибактеріального захисту. Вказані властивості ІФН дозволяють віднести їх до поліфункціональних біорегуляторів широкого спектру дії.

В залежності від структури, фізико-хімічних та біологічних властивостей, ІФН поділяють на три типи. До інтерферонів I типу відносяться: лейкоцитарний α -ІФН, фібробластний β -ІФН, δ -ІФН, ε -ІФН, κ -ІФН, трофобластний τ -ІФН, ω -ІФН та ξ /limitin-ІФН. Інтерферони II типу або імунні ІФН мають лише одного представника – γ -ІФН. Нещодавно були відкриті інтерферони III типу – λ -ІФН.

Наприкінці 70-х років ХХ століття стала очевидною потенційна важливість інтерферонів для медицини, у тому числі профілактики онкологічних захворювань. Клінічні випробування стримувалися відсутністю достатніх кількостей інтерферонів і високою вартістю препаратів, отриманих традиційним способом (виділення із крові). Так, у 1978 р. для одержання 0,1 г чистого інтерферону в Центральній лабораторії охорони здоров'я Гельсінкі (лабораторія – світовий лідер з виробництва інтерферону із лейкоцитів здорових людей) перероляли 50000 л крові. Отримана кількість препарату могла забезпечити лікування 10000 випадків вірусної інфекції. Перспективи одержання інтерферонів пов'язували з генною інженерією.

У 1980 р. Гілберту і Вейсману в США вдалося одержати інтерферон за допомогою генетично модифікованої *E. coli*. До труднощів з якими зіштовхнулись дослідники слід віднести низький рівень мРНК інтерферону у лейкоцитах, навіть після їх стимуляції вірусом. При переробці 17 л крові вдалося виділити мРНК і отримати її ДНК-копію. Останню вбудували у плазмиду й клонували в *E. coli*. Було випробувано понад 20000 клонів клітин. Окремі клони були здатні до синтезу інтерферону, але з низьким виходом – 1-2 молекули на клітину. Аналогічні дослідження проводили в Японії, Англії, Франції, Росії.

У 1980 р. були встановлені нуклеотидні послідовності α - і β -інтерферонів: мРНК фібробластного інтерферону складається з 836 нуклеотидів; з них 72 і 203 нуклеотида припадають на 5'- і 3'-нетрансльовані області, 63 кодують пептид, який відповідає за секрецію інтерферону із клітин і 498 нуклеотидів кодують 166 амінокислотних залишків саме інтерферону. Після цього хімічним синтезом були отримані гени α - і β -інтерферонів, які клонували в *E. coli*. У 1981 р. була розшифрована нуклеотидная послідовність імунного інтерферону, що суттєво відрізняється за своїми властивостями від перших двох, але є майже однаковим за величиною молекули. Істотним моментом був повний синтез гена лейкоцитарного інтерферону людину здійснений у Великобританії співробітниками фірми "Імперіал кемікал індастрі" і Школи біологічних наук Лестерського університету.

Протягом півтора року була синтезована повна послідовність ДНК-копії інтерферону, здатна кодувати α -інтерферон. Синтез олігонуклеотидів був здійснений новим методом, що суттєво прискорило синтез гена. Спочатку до поліакриламідної смоли був приєднаний нуклеотид; далі проводили приєднання пар нуклеотидов, використовуючи конденсуючий агент у безводному піридині. Кожний цикл тривав півтора години, тому протягом року можна було синтезувати послідовність довжиною в 5000 нуклеотидов. Було синтезовано 67 олігонуклеотидов, які за допомогою лігази з'єднали у дволанцюгову ДНК, що складається з 514 пар нуклеотидов. Отриманий ген ввели до клітин *E. coli* і *Methylophilus methylotrophus*, в результаті експресії гену отримали інтерферон.

Зусилля, спрямовані на одержання генноінженерних інтерферонів, дозволили знизити витрати на виробництво більш ніж в 100 разів. На основі генноінженерних клітин бактерій і дріжджів були отримані різні типи інтерферонів. Це дозволило розпочати широкомасштабне медико-біологічне і клінічне випробування препаратів. Отримані протягом 1980-1981 рр. препарати інтерферонів були очищені на 80 % і мали питому активність більш ніж 107 міжнародних одиниць активності на 1 мг білка. Розширення клінічних випробувань інтерферонів, початих у цей період, залежить від підвищення ступеня його очищення. Прогрес у цьому напрямку був досягнутий застосуванням моноклональних антитіл, які можна використовувати для афінної хроматографії (при цьому необхідні білки затримуються на колонці з антитілами).

4.6. Значення генної інженерії

Генетична інженерія, як метод і як розділ біології має велике значення у розвитку і життєдіяльності всього суспільства загалом. З розвитком генної інженерії розширився обсяг поняття “біотехнологія”. У сучасному розумінні біотехнологія – це сукупність промислових методів, у яких використовуються живі організми та біологічні процеси для виробництва цінних для народного господарства продуктів. Звичайно, посилене виробництво продуктів життєдіяльності організмів досягається спеціально створеними і підібраними комбінаціями генетичного матеріалу. Методи генної інженерії широко застосовуються у харчовій та мікробіологічній промисловості, у роботах з культурами тканин, для виробництва моноклональних антитіл, прискореного розмноження нащадків від суперелітних тварин, для клонування і прискореного розмноження суперелітних рослин тощо.

Конструювання штамів мікроорганізмів з використанням методів генної та генетичної інженерії призвело до створення нових біотехнологічних процесів. До промислово важливих мікроорганізмів відносяться бацили, які використовуються у виробництві вітамінів, ферментів та засобів боротьби із шкідниками; актиноміцети – продуценти антибіотиків; дріжджі, які використовуються в хлібопекарському виробництві і у виробництві кормового білка; псевдомонади, на використанні яких розробляються ефективні біологічні міри охорони навколишнього середовища та ін.

У харчовій, пивоварній та спиртовій промисловості застосовуються методи генетичної інженерії для створення нових штамів мікроорганізмів (бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів), які забезпечують активне молочнокисле, маслянокисле, спиртове та інші типи бродіння. Великого значення набуває розробка біотехнологій мікробного синтезу ферментів для харчової промисловості. Наприклад, мікробний синтез хімозину (реніну, сичужного ферменту) є важливою ланкою у технології виготовлення пресованих сирів.

Мутантні штами мікроорганізмів використовуються для синтезу кормових білків, вітамінів, антибіотиків, гормонів, ферментів та амінокислот у промислових масштабах. У наш час понад 5000 різних антибіотиків отримують за допомогою плісневих грибів, актиноміцетів та бактерій. Зауважимо, що протягом 50 років після відкриття антибіотиків продуктивність штамів-продуцентів за допомогою методів експериментального мутагенезу та генної інженерії була збільшена у сотні і навіть тисячі разів. Так, за допомогою мутагенезу була збільшена продуктивність продуцента пеніциліну (*Penicillium chrysogenum*) від 100 до 10000–15000 одиниць активності, а синтез амінокислоти лізину (*Brevibacterium sp.*) було збільшено у 300-400 разів порівняно з вихідною формою відповідного продуцента. Слід відзначити, що серед продуктів мікробного синтезу велике значення мають незамінні амінокислоти, які не синтезуються у організмі людини та тварин, але конче потрібні для нормального синтезу білків і тому повинні надходити до організму в готовому вигляді разом з їжею.

Великого значення набула генетична інженерія рослин. За допомогою методів генної інженерії були виведені трансгенні рослини, які здатні протистояти різним комахам, патогенам, іншим несприятливим впливам без обробки хімічними речовинами. Це в свою чергу може помітно покращити екологічну ситуацію. Відмова від застосування хімічних речовин у сільському господарстві зробить продукти харчування екологічно чистими. Адже генна інженерія рослин оперує тими речовинами, які споконвіку споживались людиною – нуклеїнові кислоти і білки. Технологія генетичної інженерії не дає токсичних відходів, що забруднюють довкілля.

Важливим досягненням генної інженерії є створення гібридом – клітинних гібридів, які отримують злиттям нормальної клітини (наприклад, імунного лімфоцита) з пухлинною клітиною. Використання гібридом у виробництві моноклональних антитіл відкрило нову сторінку у біотехнології виробництва засобів боротьби з інфекційними хворобами.

Не менш важливим здобутком генної і генетичної інженерії стало переведення на рівень мікробного синтезу речовин, які в нормі синтезуються у савців у надзвичайно малих кількостях. Це досягається шляхом введення відповідних генів у генетичний апарат бактерій та культивування генетично модифікованих мікроорганізмів у промислових масштабах. Саме таким чином були створені біотехнології мікробного синтезу інсуліну, інтерферону, соматотропіну та інших цінних для людини речовин. Наприкінці ХХ століття було встановлено, що структурні гени як легких, так і важких ланцюгів імуноглобулінів ссавців можуть функціонувати в геномах бактерій. Отже, було доведено можливість мікробного синтезу антитіл.

За допомогою генної інженерії вдалося розв'язати найгостріші проблеми, з якими зіткнулося сучасне людство. Зокрема, лікування різних ендокринних захворювань вимагає виробництва гормональних препаратів у промислових масштабах. І саме генетична інженерія дає можливість практично в необмежених масштабах отримувати потрібні речовини. Так, американські дослідники створили штам бактерій (*Escherichia coli*), здатний синтезувати гормон росту людини соматотропін, який відіграє важливу роль у процесах росту, посилює синтез білків та гальмує їх розпад, сприяє зменшенню відкладання підшкірного жиру, посилює розкладання жиру та збільшує співвідношення м'язової маси тіла до жирової, а також бере участь у регуляції вуглеводного обміну.

Нині понад 60 млн. людей страждають цукровим діабетом. Єдина можливість допомогти таким хворим – регулярно вводити в організм інсулін, який отримували із підшлункової залози великої рогатої худоби і свиней. Але тваринний інсулін не повністю відповідає людському організму, і деякі діабетики мають алергію до таких ліків. Крім того, отриманий таким чином препарат досить дорогий, і не задовольняє всіх потреб. Вихід було знайдено за допомогою методів генної інженерії. Синтезований ген інсуліну людини був “вбудований” у бактеріальну клітину (*Escherichia coli*) і нині саме за допомогою мікроорганізмів отримують цю життєво необхідну речовину.

На думку експертів ООН, найближчим часом головною політичною проблемою планети може стати голод. Адже нині 60 відсотків населення Землі постійно недоїдають, третина – голодує, причому ситуація дедалі загострюється внаслідок значного зменшення сільськогосподарських угідь і збільшення населення. Тому значні надії покладаються на генну інженерію, яка дає можливість створення нових високоврожайних сортів рослин і порід тварин, захисту врожаїв від шкідників і несприятливих умов навколишнього середовища, поліпшенню смакових якостей та поживності продуктів.

Так, у США користуються попитом продукти поліпшені внаслідок генних маніпуляцій. Генетично модифікована морква соковитіша та солодша за звичайну, а її м'якоть без неприємних волокон. Однак і тут не все просто. Скажімо, викликає небезпека перевантажити не тільки екологічну, а й економічну систему.

Далеко неоднозначні результати дослідів по створенню нових порід тварин і сортів рослин, які б поєднували у собі переваги різних видів. У 1982 році американські й шведські вчені ввели гормон росту пацюка в запліднені яйцеклітини миші і одержали мишей-велетнів. Трохи згодом людські гени росту було введено в клітини свиней і виведені породи давали більше м'яса. Генно-інженерним шляхом виведено породи свиней, у яких дуже мало жиру – справжні “живі шинки”. Та виявилось, що природа опирається таким маніпуляціям: “вдосконалені” тварини були хворобливі й непоросливі. Чимало вчених вважає, що подібні маніпуляції можуть підірвати й без того розхитану екологічну рівновагу в біосфері, і ніхто не знає, як довго природа витримає штучну флору й фауну.

Чимало дослідників тривожиться й тим, що нині важко прогнозувати результати втручання в банк генів живої природи навіть з гуманними намірами. Скільки разів уже природа жорстоко мстила за такий волюнтаризм, як, наприклад,

при хімізації сільського господарства, забруднення навколишнього середовища відходами промисловості і транспорту тощо. Таким чином перспективи, які відкриває генна та генетична інженерія, викликають не тільки очікування кращого, але й побоювання. Багато хто розглядає генні технології як потенційну загрозу для існування життєвих цінностей людини. Нині немає повної гарантії безпечності, або цілковитої небезпечності втручання людини у спадкову інформацію живого.

4.7. Соціальні та етичні аспекти генної інженерії

Властивості, отримані сільськогосподарськими культурами в результаті генно-інженерної модифікації, можуть бути надзвичайно цінними. Стійкість до дії гербіцидів і пестицидів, надзвичайно широкий діапазон температур доквілля, при якому забезпечується збереження плодів, а врожайність не знижується, підвищення показників урожайності – все це досягло значних висот. Те саме стосується виражених корисних властивостей деяких продуктів, як, наприклад, оптимізований для профілактики атеросклерозу і надлишкової ваги профіль жирних кислот у деяких сортах генетично модифікованої кукурудзи та сої, особливі властивості крохмалю в картоплі (завдяки цьому не всмоктується багато жиру під час смаження картоплі).

Проте поряд з позитивними результатами, які стосуються високої ефективності трансгенних організмів і висловлюваним із цього приводу оптимізмом, у суспільстві (в основному серед екологів, політиків, активістів природоохоронних організацій і рухів) наростає занепокоєння, пов'язане з потенційною екологічною небезпекою широкого застосування трансгенних організмів. Занепокоєння базується переважно на уявленнях про те, що введення чужорідних ДНК в основні сорти продовольчих культур – процес не природний і тому супроводжується ризиком для здоров'я. Але оскільки всі живі організми, включаючи сільськогосподарські культури, тварин, мікроорганізмів тощо, містять ДНК, як можна вважати неприродними рекомбінантні ДНК (скомбіновані з наявних у природі генів)? Навіть визначення поняття «чужорідний ген» проблематичне, бо велика кількість генів спільна для багатьох різних організмів.

Від самого початку становлення генної інженерії ставлення до неї було неоднозначне. Загалом висловлювалися побоювання, що трансгенні організми, які створено без урахування їхніх ймовірних екологічних характеристик і які не пройшли тривалої спільної еволюції з природними організмами, «вирвавшись з пробірки на волю», зможуть безконтрольно й необмежено розмножитися, що приведе:

- 1). До витіснення природних організмів з місць природного розселення їх (з екологічних ніш);
- 2). До наступної ланцюгової реакції «падаючого доміно» порушень екологічної рівноваги;
- 3). До зменшення біорізноманіття;
- 4). До активації сплячих, раніше невідомих патогенних мікроорганізмів;
- 5). До «втечі» чужорідних генів із трансгенних організмів;

- 6). До хаотичного переносу генів у біосфері;
- 7). До появи монстрів, що знищують усе.

З часом виявилось, що первісні страхи були сильно перебільшені. Спочатку техніка безпеки робіт з трансгенними організмами виходила з того, що ці химери можуть бути небезпечними, як, наприклад, чума, холера, віспа тощо. Тому з трансгенними мікроорганізмами працювали у спеціальних інженерних спорудах, звідкіля живою могла вийти тільки людина, та й то, після того, як зніме спецодяг. Однак поступово стало ясно, що ризик сильно завищували. Трансгенні мікроорганізми виявилися менш життєздатними, ніж вихідні форми. До того ж існує надзвичайно велика відмінність у функціонуванні про- і еукаріотичних генів, що теж обмежує потенційну загрозу довкіллю від генетично модифікованих організмів.

Загрози, яких зараз очікують від генетично модифікованих продуктів, можна умовно розділити на дві категорії – потенційні (гіпотетичні) і приписувані. Що стосується останніх, то сюди можна віднести алергічні реакції (у тому числі неправильно інтерпретовані реакції на введення деяких антибіотиків) і нібито відмічені гормональні зміни (фемінізацію хлопців і передчасне статеве дозрівання дівчат). Жоден з цих ефектів генетично модифікованих продуктів у даний час не підтверджений методами доказової медицини – і це значить, що всі дані твердження можуть вважатися фактично голосливими.

Складніше стоїть справа з загрозами потенційними. У фахівців основні побоювання пов'язані, у першу чергу, із трансгенними мікроорганізмами. По-перше, якщо їх одного разу випустити в природу, цей процес неможливо повернути назад. По-друге, у світі мікроорганізмів розповсюджений обмін генами між різними видами. По-третє, екологічні взаємодії між мікроорганізмами, а також між мікро- та макроорганізмами, вивчені дуже мало. По-четверте, вважається, що на даний час науці відомі лише від 1 до 10 % наявних у природі мікроорганізмів, інші залишаються невідомими. Тому прогнозувати наслідки інтродукції трансгенних мікробів у природні екосистеми дуже важко. Саме тому у світі проведено лише 10 польових випробувань трансгенних мікроорганізмів, але більш як 25000 польових випробувань трансгенних рослин.

Біотехнологів звинувачують у насильстві над природою, оскільки вони, на відміну від звичайних селекціонерів, пересаджують гени звідки завгодно і куди завгодно, що може призвести до непередбачуваних наслідків. Деякі непередбачувані (вторинні) ефекти вбудовування чужого гена в геном рослини можливі. Але вони такою ж мірою властиві й звичайній селекції. І генна інженерія, і селекція переносять новий генетичний матеріал, який може викликати порушення роботи генів, їх модифікацію, виключення або активацію, здатність синтезувати нові білки або змінювати рівень синтезу вже наявних білків. Нові продукти життєдіяльності клітин, у принципі, можуть бути й токсичні, і алергенні, і канцерогенні.

Прикладом появи непередбачуваних результатів у звичайній селекції служить історія з гібридом кукурудзи «Техас». На початку 1970-х рр. величезні посівні площі цієї культури в США були спустошені грибковим захворюванням.

З'ясувалося, що продукт гена, специфічного для даного гібрида, взаємодіяв з токсином гриба, що в результаті приводило до розвитку захворювання.

Отже, генетична модифікація рослин за можливими наслідками не більш небезпечна, ніж звичайна селекція. Навіть більше: іноді селекція призводить до набагато більш істотних порушень в геномі рослини, ніж спрямована генетична модифікація. З 1930-х рр. для селекції використовують радіацію та хімікати, що викликають мутагенез. Досі відомо близько 2200 сортів різних культур, отриманих у такий спосіб. Очевидно, що на відміну від генетичної модифікації таке грубе втручання зачіпає не один ген і має непередбачувані наслідки.

Небезпечнішим за генетичну модифікацію може бути навіть звичайне схрещування. Наприклад, латинські літери (Т, N, V, F) на упаковках насіння томатів означають стійкість проти різних захворювань, отриману шляхом схрещування з неїстівним для людини диким томатом. Помідори N, стійкі проти нематоди, містять сегмент (3,5 млн п.н.) з генома дикого родича цього сорту; фрагмент складає 0,3 % від усієї ДНК томату (для порівняння, ген стійкості в трансгенних рослинах має всього близько 7 т.п.н.). Таким чином, звичайне схрещування, крім потрібного гена, вносить у рослину декілька десятків зайвих невідомих генів. А гени з неїстівної рослини цілком можуть кодувати токсини, алергени та інші шкідливі для людини речовини. Парадокс полягає в тому, що томат, куди методами генної інженерії перенесли один-єдиний відомий і перевірений ген, ретельно вивчатимуть і регулюватимуть його розповсюдження, а томат, у який звичайною селекцією перенесли десятки невідомих генів, за міжнародними правилами не вимагає ніякого контролю та вивчення.

Головний контраргумент прихильників генетично модифікованих продуктів зводиться до відомого вислову «Людина завжди вживала в їжу рослини і м'ясо тварин, але у неї не вирости ані листя, ані хвіст – в організмі всі білкові молекули і ДНК (тобто, гени) розпадаються, як правило, до структурних одиниць – амінокислот і нуклеотидів, однакових для всього живого».

Так чи інакше, але якщо побоювання щодо трансгенних організмів тією чи іншою мірою виправдані, то застосування їх дійсно варто обмежити й воно повинне суворо регулюватися; якщо ж ці побоювання не виправдані, то вони можуть сильно загальмувати розвиток передової галузі біоіндустрії. От чому розробка методів раціональних і науково обґрунтованих оцінок ризиків, пов'язаних із широким застосуванням трансгенних культур, досить актуальне й практично необхідне завдання. Зокрема, у цей час у багатьох країнах прийнята або обговорюється можливість прийняття державних документів, які (з врахуванням науково обґрунтованих оцінок ризиків, що пов'язані із використанням трансгенних організмів) повинні дозволити, обмежити або заборонити використання трансгенних організмів.

Приблизно половина усіх програм, опрацьовуваних ООН, UNIDO, UNEP, спрямовані на те, щоб запропонувати проекти міжнародних угод для вирішення проблем, пов'язаних із трансгенними організмами. Розроблені два головних документи – «Кодекс добровільно прийнятих правил, яких слід дотримуватися при інтродукції організмів у навколишнє середовище», підготовлений секретаріатом UNIDO, і «Протокол з біобезпеки у рамках Конвенції з біологічної

розмаїтості» UNEP. Вважають, що Кодекс як зразок для добровільного наслідування буде корисний для урядів при розробці чи зміні національних правил, які регулюють створення трансгенних організмів та роботу з ними. Згідно з Протоколом, очікується, що кожна сторона, яка приєднується до Конвенції з біорізноманіття, вводитиме і реалізовуватиме запобіжні заходи для недопущення несприятливого впливу трансгенних організмів на біорізноманіття.

В останні роки минулого сторіччя дослідники приступили до інтенсивного створення трансгенних організмів, корисна дія яких повинна проявлятися в довкіллі і які призначені для здійснення дуже знаменного етапу в розвитку цивілізації – для спрямованої генетичної модифікації біосфери. Це означає, що такі трансгенні мікроорганізми, рослини й тварини житимуть не в біореакторах, не в теплицях та клітках, а на волі. Цілі, які дослідники ставлять перед собою при створенні цих організмів, такі:

- 1). Призупинення розпаду та наступне поліпшення довкілля;
- 2). Заміна (у максимально можливих масштабах) невідновлюваних джерел енергії і сировини;
- 3). Підвищення ефективності сільського господарства і харчової промисловості;
- 4). Контроль над спадковими захворюваннями людини;
- 5). Генна терапія спадкових хвороб людини;
- 6). Генетична модифікація людини;
- 7). Клонування людини;
- 8). Створення організмів, призначених для поширення життя на інших планетах;
- 9). Створення принципово нових, більш перспективних форм життя.

Усі ці проекти за ступенем їхнього практичного втілення можна розподілити на чотири групи. Проекти *першої групи* успішно здійснюються й розвиваються. Це, головним чином, створення різних трансгенних рослин і тварин. Проекти *другої групи* реалізуються тільки в лабораторних умовах, оскільки масове застосування відповідних трансгенних організмів у відкритому середовищі поки що заборонене через неясність екологічних наслідків. Це, в основному, трансгенні мікроорганізми, призначені для очищення ґрунтів і акваторій від забруднення (біоремедіація), для поліпшення довкілля тощо.

Проекти *третьої групи* не реалізуються й не розробляються з морально-етичних причин. Це, в основному, роботи з повного клонування людини та створення трансгенних людей. Клонування організму – це технологія, у результаті якої організм розвивається не із заплідненої яйцеклітини, а з соматичної клітини. Ядро соматичної клітини, узятє від іншого індивіда, в умовах *in vitro* зливають з яйцеклітиною і імплантують так званій сурогатній матері, що виношуватиме дитину, не будучи його генетичною матір'ю. Потім у нормальний термін повинна народитися людина, точна копія того, хто був донором клітини.

Клонування *in vitro* людських ембріонів до віку не більш 14 днів, потрібних для одержання з них культур клітин для медицини, уже дозволене в Англії. З'явилися повідомлення про початок клонування людей у тих країнах, де це не

викликає моральних заперечень. Вже з'явився новий термін «*off-shore biotech lab*» – офшорна біотехнологічна лабораторія.

Проекти *четвертої групи* ще перебувають на початковій стадії розробки через їхню високу складність. Це, в основному, створення принципово нових форм життя й організмів для колонізації інших планет. У цьому випадку вже синтезовано два нових нуклеотиди для побудови нового генетичного коду та 80 нових амінокислот. В НАСА обговорюють проект створення мікроорганізмів для Марсу, які повинні утилізувати компоненти марсіанського ґрунту і виділяти вуглекислий газ; остання обставина має привести до глобальної зміни клімату цієї планети.

Відповідно до загальноприйнятої у світовій науковій літературі точки зору, методологія оцінок екологічного ризику трансгенних організмів повинна базуватися на основних принципах і положеннях Картахенського Протоколу з біобезпеки (2000 р.) або Конвенції про біологічну розмаїтість. Мета цих міжнародно погоджених принципів полягає у «забезпеченні належного рівня захисту в області безпечної передачі, обробки й використання живих змінених організмів, що є результатом сучасної біотехнології та здатні несприятливо вплинути на збереження й стійке використання біологічної розмаїтості...».

У цілому всі ризики, пов'язані із застосуванням трансгенних організмів, можуть бути віднесені або 1) до потенційної небезпеки для здоров'я людини чи тварин при вживанні їжі й/або кормів, отриманих із трансгенних організмів, або 2) до потенційної екологічної небезпеки виробництва трансгенних організмів для біоти різних екосистем, особливо для біорізноманіття агроекосистем.

Стосовно першої групи ризику вчені виділяють три основні небезпеки, що можуть виникнути. По-перше, несподівані результати прояву активності гена. Йдеться, по-перше, про можливі зміни хімічного складу та зниження харчової цінності продукту. По-друге, можливі зміни технологічних параметрів, що погіршують споживчі властивості продуктів. По-третє, не виключено, що в результаті генної модифікації можуть синтезуватися якісь компоненти, що викликають алергічні реакції, чи з'явитися небезпечні сполуки, які з мутагенними, канцерогенними чи токсикогенними властивостями.

Цього ми боїмося, і виходить, повинні опрацювати адекватну систему оцінки трансгенної продукції. Мало довести, що ген дуже вузько змінює фактично одну молекулу з мільйона в складі даного продукту; важливо показати, що не змінюються його властивості та не виникають небезпечні нові властивості. Модифікації роблять генетики та біотехнологи, одержуючи блискучі результати, а далі цілий ряд досліджень повинні провести медики. Оцінка генетично зміненого продукту включає три блоки питань. Перший, медико-генетичний, оцінює зміни в генотипі організму та можливість їхнього подальшого впливу на людину. Другий, технологічний, встановлює, що отриманий цим методом продукт не змінює свої технологічні властивості. І третій, величезний блок медико-біологічної оцінки, досліджує вплив трансгенних продуктів на імунний статус організму, систему ферментного захисту клітини та оцінює потенційну мутагенність. Тільки після вивчення цих показників, у тому числі на декількох поколіннях лабораторних

тварин, починається процес державної реєстрації та отримується дозвіл на широке використання при обов'язковому подальшому моніторингу.

Стосовно другої групи ризику, то наразі основна можлива небезпека від трансгенних рослин, які масово вирощуються у відкритому ґрунті. Існує також ймовірність небажаного потрапляння трансгенних мікроорганізмів з промислових умов до природних екосистем. А чи можливо на сьогоднішній день за допомогою науково обґрунтованих методів дійсно оцінити реальні кількісні показники екологічного ризику, що може бути викликаний, наприклад, вирощуванням трансгенних рослин? Особливо це стосується вирощування ентомоцидних трансгенних рослин, які вже культивуються в світі на 20 млн га; ці рослини несуть гени ентомоцидних токсинів і призначені для ураження певних видів комах. Це стосується й трансгенних рослин, стійких проти гербіцидів тощо. Так, з оцінками агроекосистемного ризику ентомоцидних трансгенних рослин пов'язані серйозні труднощі. Як правило, агроекосистеми досить складні й складаються з великої кількості популяцій видів, які взаємодіють між собою. Ці популяції можуть перебувати як у конкурентних взаємовідношеннях, так і в симбіотичних. Популяції поєднані одна з одною досить складними й часом розгалуженими трофічними зв'язками. Визначення й опис домінантних видів і кількісна характеристика їхніх взаємодій як один з одним, так і з довкіллям – завдання, що потребує великих затрат часу та праці. Теоретично, безпосередньо викликане трансгенними рослинами збільшення або зменшення чисельності якихось видів тварин може призвести до наступної зміни чисельності популяцій інших видів, що перебувають, зокрема, у відносинах типу “хижак-жертва” тощо. Для оцінки причиново-наслідкових зв'язків, що можуть призвести до небажаних наслідків, необхідне вичленовування істотних характеристик агроекосистем і прийнятний ступінь досить детального їх опису. Такими істотними характеристиками можуть бути: а) біорізноманіття – стосовно до основних панівних видів рослин, тварин і мікроорганізмів, а також показники їхньої питомої щільності (чисельності), б) основні трофічні взаємодії в агроекосистемах і в) критерії неприйнятності змін в агроекосистемах.

Сьогодні розглядають такі основні типи ризиків, безпосередньо пов'язаних з ентомоцидними трансгенними рослинами:

- 1). Ураження нецільових комах, зокрема, порушення балансу в системах хижак-жертва, що тягне за собою небажане підвищення або зниження чисельності інших тварин;
- 2). Виникнення стійкості до ентомотоксину у цільових і нецільових комах, що, у свою чергу, повинне призвести до: а) зниження ефективності ентомоцидної дії ентомоцидних трансгенних рослин і мікробних препаратів *Bt*-токсинів, б) зниженню чисельності природних мікроорганізмів (зокрема, *Bacillus thuringiensis*), яким для свого розвитку необхідні життєздатні комахи, чутливі до *Bt*-токсинів;
- 3). Інтрогресію трансгенів – перенесення з пилком ентомоцидних трансгенних рослин їхніх трансгенів у вихідні нетрансгенні сорти й/або до їхніх диких родичів і викликане цим генетичне забруднення сортів

культивованих рослин та дикорослих видів, що зменшує їхнє біорізноманіття.

Тому коли вчені планують створення нових рослин за допомогою біоінженерії, то детально обговорюється кожен ген, що вводять у новий продукт. Після створення нового трансгенного організму його безпека ретельно перевіряється. За заданих умов, під суворим контролем, протягом трьох років проходить випробування та оцінка впливу даного трансгенного організму на довкілля, нецільові організми, найпоширеніші ентомофаги, ураження ґрунтових комах, ризик негативного впливу на ризосферні мікроорганізми, ризик виникнення й поширення стійких комах, рослин тощо, ризик негативних плейотропних ефектів трансгенів, можливість передачі трансгена іншим організмам тощо. Наприклад, у світовій практиці до виходу трансгенної рослини на ринок проходить, як правило, до 10 років. Незважаючи на всі наявні заходи безпеки, все ж є проблемні моменти. Так, проведені широкомасштабні дослідження використовуваних ентомоцидних *Bt*-рослин не виявили негативного впливу на різні екологічні ніші. Але у 2001 р. були оприлюднені дані про те, що у природних популяціях кукурудзи (провінція Оаксака, Мексика, природний центр походження кукурудзи) виявлено ДНК, комплементарну до 35S вірусу мозаїки кольорової капусти CaMV, який широко застосовується як промотор; це призвело до широких дискусій. Тому в Мексиці було створено комісію і проведено повторні дослідження, в результаті яких показано, що до 12 % дикорослих рослин кукурудзи, а в деяких районах і до 36 %, містять трансгенний промотор. Крім того, в деяких зразках виявили послідовності ДНК, комплементарні до *Bt*-конструкцій. У травні 2002 р. незалежні групи вчених заявили, що немає ніяких сумнівів в тому, що приблизно 10 % традиційних сортів кукурудзи містять трансгени. Тому керівництво Мексики заборонило посів трансгенної кукурудзи по всій території країни. Оскільки трансгени передаються з пилком, ведуться активні роботи по отриманню трансгенних рослин, що несуть трансген не в ядерному геномі, а в хлоропластному. Цитоплазматичні гени не потрапляють до складу пилку тому, бо у більшості рослин вони передаються по материнській лінії. Крім того, ці рослини будуть безпечними і для комах, що контактують з пилком.

Виходячи з наведених даних, бажано, щоб у комплексі методологічно обґрунтованих оцінок ризиків був би блок методів, максимально уніфікованих і стандартизованих а також, разом з тим, концептуально обґрунтована методологія, що дозволяє прогнозувати ризики, виходячи з суто специфічних характеристик як самого трансгенного організму, так і запланованого регіону його інтродукції.

Прогнозування поведінки екосистем, що базується на математичному моделюванні їхньої просторово-часової динаміки або на аналізі часових рядів, які отримані під час спостережень (експериментів) – надзвичайно важкий процес. Звичайно, така динаміка добре прогнозується тільки на порівняно коротких відрізках часу, обмежених так званим горизонтом передбачуваності. Поки що узагальнення й попередній аналіз опублікованих матеріалів з екологічної оцінки виробництва трансгенних організмів дають змогу зробити попередній висновок про те, що ступінь тяжкості можливих негативних наслідків використання

трансгенних організмів (як й імовірність їхньої реалізації) залишається невизначеною. Тому, зрозуміло, методи оцінок екологічних ризиків, пов'язаних із сучасною генно-інженерною біотехнологією, повинні постійно розвиватися, уточнюватися й удосконалюватися. Бажано, щоб темп розвитку й застосування цих методів випереджав світове зростання кількості створених трансгенних організмів та їхнє використання. Наразі цього не спостерігається.

Зараз на ринку продовольчої сировини відбувся розподіл на генетично модифіковані культури (ГМ-культури) та «звичайні» генетично немодифіковані. Для забезпечення цього розподілу зараз у харчовій промисловості Європи та США існує два типи систем «зберігання ідентичності» (*IP-systems*): м'яка (*soft IP-system*) та жорстка (*hard IP-system*). Жорстка система зберігання ідентичності передбачає кількісний контроль наявності ГМ-продуктів по всьому виробничому циклу, починаючи від контролю насіння, його збору, окремого зберігання, транспортування та поставки на переробні підприємства, а також контроль окремої переробки генетично немодифікованої сировини, виробничий контроль, окреме зберігання кінцевих продуктів після пакування та відвантаження з підприємства. М'яка система зберігання ідентичності передбачає лише контроль на переробних підприємствах чи контроль кінцевого продукту у відповідності з прийнятим у державі законодавством.

Обов'язкове маркування продукції, яка містить генно-модифіковану сировину, не означає, що даний продукт шкідливий для здоров'я людини. Це лише додаткова інформація для споживачів, які мають право вибору.

Підводячи підсумки, слід визнати, що звичайно, про повністю гарантовану безпеку трансгенних організмів для людського здоров'я говорити поки що не доводиться, хоча б тому, що сучасна генна інженерія аж ніяк не досконала. Однак ймовірність наявності негативних впливів при використанні генетично модифікованих продуктів однозначно оцінюється фахівцями як низька. Загалом, за увесь час інтенсивного застосування генної інженерії в усьому світі за більш ніж 30 років жодного випадку виникнення небезпеки, пов'язаної з трансгенними організмами, зареєстровано не було. До цього потрібно додати, що з цією «загрозою» кожен з нас має право боротися у добровільному порядку – ігноруючи генетично модифіковані продукти у продажу. У деяких країнах, включаючи європейські, а також Україну законодавством передбачене обов'язкове маркування харчових продуктів, що містять визначені кількості генетично модифікованих компонентів. Для Європи, наприклад, ця кількість складає 0,9 %.

Нині жоден із сортів генетично модифікованих рослин не дозволений для комерційного вирощування на території України. Державний дозвіл можна одержати тільки на польові випробування, що проводяться за умов нерозповсюдження трансгенних рослин у довкіллі. За даними Міністерства екології і природних ресурсів України, такі дослідження проводили компанії «Монсанто», «КВС» та «Авентіс» у Київській і Черкаській областях.

Оскільки Україна намагається стати членом Світової Організації Торгівлі (СОТ), вона буде змушена відкрити кордони для генетично модифікованих продуктів із США та інших країн. Якщо ви купуєте соєве молоко виробництва США та Канади, то, незважаючи на відсутність відповідного маркування,

ймовірно, що воно зроблене з трансгенної сої. Є дані, що генетично модифіковані продукти реалізуються через мережу “*McDonalds*”. Важче визначитися з багатокомпонентними продуктами, які теж можуть містити добавки з генетично модифікованих продуктів, такі як ковбаса і м’ясні вироби, печиво, морозиво тощо. До речі, вони не повинні неодмінно бути імпортного виробництва. У звичайному вітчизняному кетчупі може бути модифікований крохмаль, а у цукерках – соя. Генетично модифікованими можуть бути такі продукти, як кукурудзяна олія, кукурудзяний крохмаль, соєвий білок та соєве масло, лецитин, соєвий соус, бавовникова олія. Генетично модифікована соя може міститися у деяких сортах печива, в дитячому харчуванні, маргаринах, супах, піці, їжі швидкого приготування, у ковбасах, цукерках, морозиві, чіпсах, шоколаді, соусах. Генетично модифікованими можуть бути також імпортні полуниці, кабачки, папайя, цикорій тощо.

Продукти генної інженерії вносять у наше життя багато нового та необхідного, завдяки цим продуктам людство може реалізувати свої потреби, необхідно лише дотримуватися правил безпеки при впровадженні цих продуктів.

Настав вік біотехнологій. Бо практично у всіх сферах людського життя можуть бути використані методи генної інженерії. Якщо держава не приділить уваги даній галузі сьогодні, то ми відстанемо від світового рівня не на роки, а на століття.

Запитання до розділу:

1. Що вивчає генетична інженерія?
2. Що є метою генної інженерії?
3. Назвіть основні етапи методів генної інженерії.
4. Які ферменти використовують у генній інженерії?
5. Що таке вектор? Як класифікують вектори?
6. Яким чином у генній інженерії отримують потрібний ген?
7. Чи можливий штучний синтез генів?
8. Яким чином створюють рекомбінантну ДНК?
9. Як відбувається перенесення сконструйованих генів до клітини?
10. Яким чином отримували інсулін? Як відбувається процес одержання інсуліну зараз?
11. За рахунок чого став можливим мікробіологічний синтез гормону росту соматотропіну?
12. Що таке інтерферони? Які їх функції? Чи можливий синтез інтерферонів прокаріотичними організмами?
13. Яке значення для людства має генна інженерія?
14. У чому полягає сутність генетичного ризику й можливої небезпеки в біоінженерії?
15. Які критерії використовують при винесенні рішення щодо можливості використання генетично модифікованих організмів і отриманих із них нових харчових продуктів?

16. Як ви вважаєте, які державні органи та інститути повинні контролювати дослідження в області рекомбінантних ДНК?
17. Як контролюють створення генетично модифікованих організмів, що призначені для вільного використання в навколишньому середовищі і навіщо такий контроль є необхідним?
18. У чому причини і який зміст суспільного протесту проти біоінженерії у світі?

5. ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ СЕЛЕКЦІЇ

5.1. Структура сучасної селекції

Найважливішою галуззю практичного застосування генетики є селекція. **Селекція (від латинського *selectio* – вибір, відбір)** – наука про теоретичні основи та методи створення нових і поліпшення вже існуючих сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. Теоретичною основою селекції є генетика та вчення про штучний добір.

Сучасна селекція базується на досягненнях генетики і є основою ефективного високопродуктивного сільського господарства і біотехнології.

Завданнями сучасної селекції є:

1. Створення нових і вдосконалення старих сортів, порід і штамів з промислово-корисними ознаками;
2. Створення технологічних високопродуктивних біологічних систем з максимальним використанням сировинних і енергетичних ресурсів планети;
3. Підвищення продуктивності порід, сортів і штамів з одиниці площі за одиницю часу;
4. Підвищення споживчих якостей продукції;
5. Зменшення відсотку побічних продуктів та їх комплексна переробка;
6. Зменшення втрат від шкідників та хвороб.

Вчення про сучасну селекцію було започатковане відомим російським ученим-біологом Миколою Івановичем Вавіловим. Він вважав, що ряд промислово-корисних ознак обумовлені сумісною дією багатьох генів. Тому спочатку необхідно виявити ці гени та установити характер взаємодій між ними. У зв'язку з цим Вавілов М.І. стверджував, що саме генетика є теоретичною основою селекції.

Вавіловим М.І. були виділені наступні розділи селекції:

1. Вчення про вихідний сортовий, видовий та родовий потенціал;
2. Вчення про спадкову мінливість (закономірності у мінливості, вчення про мутації);
3. Вчення про роль середовища при виявленні сортових ознак (вплив окремих факторів середовища, вчення про стадії розвитку рослин стосовно селекції);
4. Теорія гібридизації як у межах близьких, так і віддалених видів;

5. Теорія селекційного процесу;
6. Вчення про основні напрямки селекційної роботи;
7. Селекція рослин, тварин і мікроорганізмів.

5.2. Методи селекції

Основні методи селекції – це штучний відбір і гібридизація. Теорію штучного відбору створив видатний англійський учений Чарльз Дарвін. Основні положення своєї теорії він виклав у праці «Походження видів шляхом природного добору, або збереження обраних порід у боротьбі за життя» і розвинув у праці «Зміни свійських тварин і культурних рослин під впливом одомашнення».

На думку Ч. Дарвіна, формування порід і сортів почалося з приручення людиною диких видів тварин і вирощування диких видів рослин. Адже в основі значного різноманіття порід і сортів лежить лише невелика кількість видів диких предків. Тож порода тварин або сорт рослин не є самостійним видом, а лише групою особин певного виду (штучна популяція), яка відрізняється від інших подібних сукупностей певними спадковими ознаками. Розвиваючи в різних напрямках ознаки диких предків одного чи кількох видів, людина створила багато різноманітних порід і сортів. Наприклад, предками всіх порід свійського собаки (яких нараховують понад 400) вважають кілька близьких видів вовків.

За Дарвіном механізм штучного добору такий. Серед багатьох тварин або рослин певного виду людина вибирає для подальшого розмноження окремих особин, які відрізняються від інших корисними для неї ознаками. Серед нащадків відібраних особин також проводять добір: особин, які успадкували від батьків бажані для людини ознаки, залишають для подальшого розмноження. Таким чином, із покоління в покоління бажані для людини ознаки розвивається все більше, оскільки для розведення відбирають особин, у яких ознаки виражені найкраще.

Ч. Дарвін припустив, що на початкових етапах створення культурних форм рослин та тварин діяв несвідомий відбір. Надаючи переваги при розмноженні певним особинам, людина не ставила перед собою свідоме завдання створити нові породи чи сорти і методично не застосовувала різні системи схрещування і типи штучного добору. Тільки у другій половині XVIII століття несвідому форму штучного добору почали змінювати на методичну: спеціально підбирали батьківські пари, застосовували різні варіанти схрещування і проводили плановий добір серед одержаних нащадків за певними ознаками. Це дало можливість створювати породи або сорти із запланованими властивостями.

Отже, штучний відбір – це вибір людиною найцінніших для господарства тварин, рослин та мікроорганізмів для одержання від них нащадків з бажаними станами ознак. Штучний відбір є найважливішим елементом будь-якої селекційної роботи, він необхідний не лише для збереження досягнутих результатів, а й для їхнього подальшого вдосконалення.

Важливою умовою ефективності штучного відбору є різноманіття вихідного матеріалу. Якщо ж різноманітність вихідного матеріалу незначна, штучний добір малоефективний. Для організмів, яким властиве самозапліднення або

самозапилення, штучний відбір буде ефективним доти, доки з вихідної, неоднорідної за генетичним складом групи особин не будуть виділені чисті лінії. Подальший відбір у чистих лінях організмів, гомозиготних за більшістю генів, результатів майже не дає, а джерелом спадкових змін у них можуть бути лише мутації.

Ознаки, які відбирає людина, не завжди виявляються корисними для самих організмів: створені породи чи сорти часто вже не здатні до самостійного існування в природі й потребують постійної турботи з боку людини. Наприклад, важко собі уявити, як можуть врятуватися від хижаків представники м'ясних порід великої рогатої худоби з масивним тілом і короткими ногами або півень з дуже довгим хвостом.

У процесі штучного добору модифікаційна мінливість організмів зростає, а їхня загальна життєздатність знижується. На породу або сорт, створені людиною, одночасно діє і весь комплекс факторів навколишнього середовища (кліматичні умови, вплив інших організмів тощо). Тому людина повинна створювати умови, найсприятливіші для розвитку тих чи інших ознак та їхніх станів.

У селекції застосовують масовий або індивідуальний тип штучного відбору (рис. 5.1). При масовому відборі з вихідного матеріалу відбирають особин із ознаками, які цікавлять селекціонерів. Хоча масовий відбір простий у застосуванні і дає непогані результати, проте він має і ряд недоліків. Групи особин, подібних за фенотипом, можуть виявитися генотипно різнорідними (наприклад, гомозиготними за доміантними алелями або гетерозиготними). Це обов'язково впливатиме на ефективність відбору: при схрещуванні між собою гетерозиготних організмів у гібридів першого покоління зміни ознак у бік, бажаний для селекціонерів, відбуватимуться досить швидко, але у міру накопичення гомозиготних особин ефективність відбору в подальшому буде знижуватися.

Кращі результати дає індивідуальний відбір, коли для подальшого розмноження залишають організми, у яких вивчено фенотип і генотип. Інформацію про генотип організмів одержують при вивченні їх родоводу, або за допомогою аналізуючих схрещувань та інших методів.

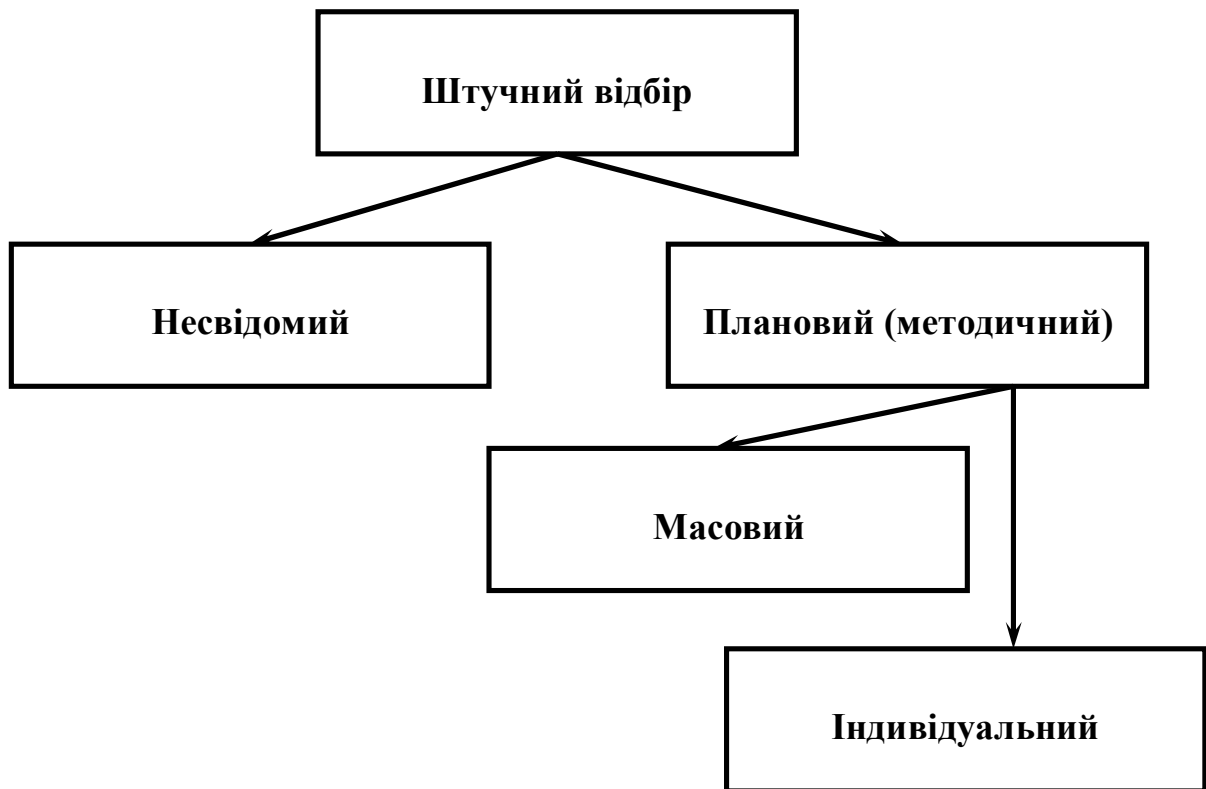


Рис. 5.1. Типи штучного відбору

Ефективність селекції залежить не лише від типу штучного відбору, але й від правильного вибору батьківських пар організмів і застосування тієї чи іншої системи схрещування організмів – гібридизації. **Гібридизація** – це процес одержання нащадків внаслідок поєднання генетичного матеріалу різних клітин або організмів. Гібриди утворюються в результаті статевого розмноження або поєднання нестатевих клітин. В останньому випадку ядра таких гібридних клітин можуть зливатися або ж залишаються відокремленими.

Гібридизація можлива як у межах одного виду (внутрішньовидова), так і між особинами різних видів і навіть родів (міжвидова, або віддалена) (рис. 5.2). У свою чергу, внутрішньовидове схрещування буває спорідненим і неспорідненим.

Споріднене схрещування – це гібридизація організмів, які мають безпосередніх спільних предків. Залежно від ступеня генетичної спорідненості таке схрещування може бути більш або менш тісним. Найтісніші форми спорідненого схрещування спостерігають серед самоzapильних рослин і гермафродитних тварин, яким притаманне самоzapліднення. В організмів із перехресним заплідненням найтісніші форми спорідненого схрещування спостерігають у організмів отриманих від схрещування братів із сестрами, батьків з їхніми нащадками.

Унаслідок спорідненого схрещування з кожним наступним поколінням гібридів підвищується їхня гомозиготність. Це пояснюється тим, що чим більша генетична подібність батьківських форм, тим вища ймовірність поєднання в генотипі нащадків одних і тих самих алелей різних генів. У самоzapильних рослин

уже в 10-му поколінні спостерігають майже повну гомозиготність (до 99,9%), а при схрещуванні братів із сестрами або батьків з нащадками такий самий результат може бути досягнений після 20-го покоління. Проте 100%-ної гомозиготності за усіма генами досягти не вдається, оскільки вона порушується мутаціями, що виникають.

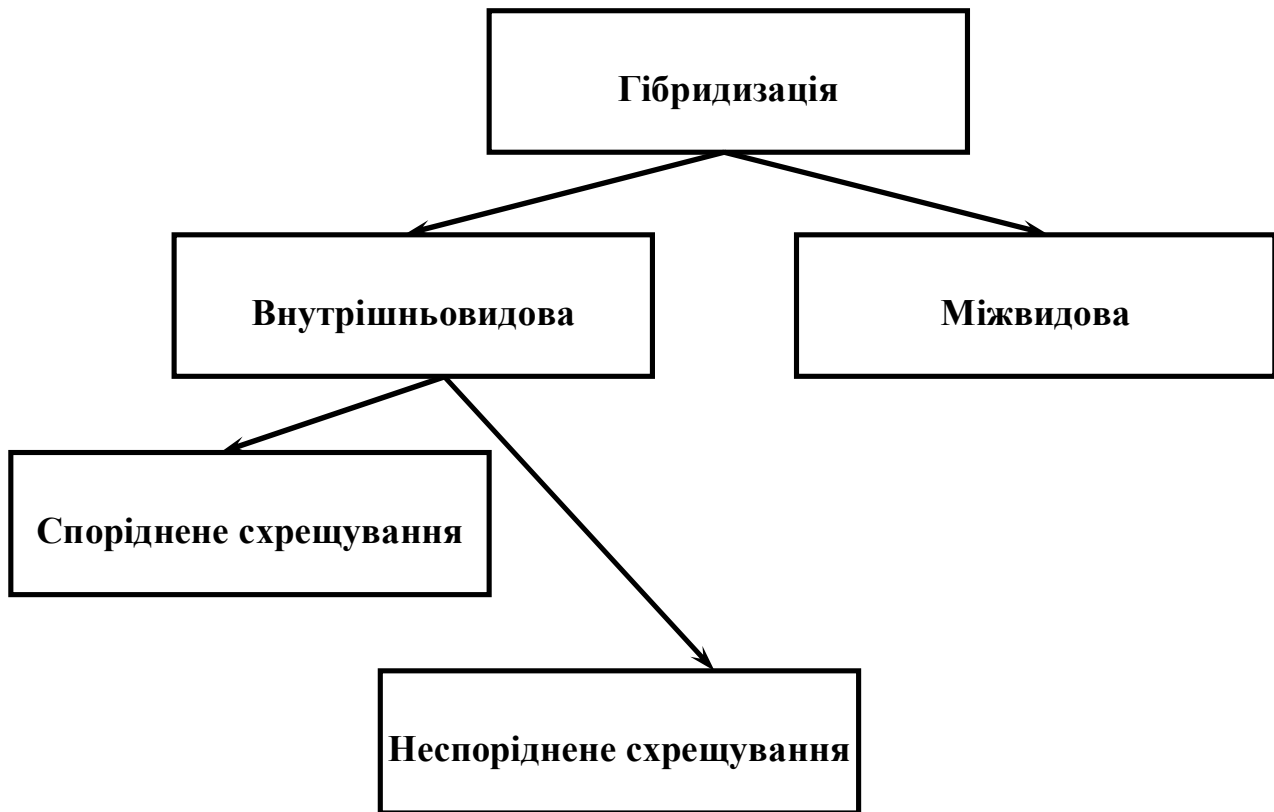


Рис. 5.2. Типи гібридизації, які застосовуються у селекції

Споріднене схрещування може призводити до негативних наслідків: ослаблення або навіть виродження нащадків. Це пояснюється підвищенням ймовірності переходу в гомозиготний стан рецесивних летальних або сублетальних алелей, які можуть проявитися у фенотипі. Таким чином, тісне споріднене схрещування часто призводить до появи нащадків з різними спадковими вадами.

Наслідки спорідненого схрещування відомі людині з давніх-давен. Наприклад, приблизно 20% людей-альбіносів є нащадками від споріднених шлюбів. Загалом у людини відомо кілька рецесивних летальних алелей, здатних у гомозиготному стані спричинити смерть. Тому шлюби між близькими родичами у багатьох народів вважаються небажаними або взагалі забороняються релігією чи законами.

У селекції споріднене схрещування застосовують для одержання чистих ліній. Воно дає можливість перевести в гомозиготний стан алелі, які визначають цінні для селекціонерів стани ознак.

Неспоріднене схрещування – це гібридизація організмів, які не мають тісних споріднених зв'язків, тобто це гібридизація представників різних ліній, сортів чи порід одного виду. Неспорідненими вважають особин, у яких не було спільних предків щонайменше протягом останніх шести поколінь. Неспоріднене схрещування застосовують для поєднання в генотипі нащадків генів, які зумовлюють цінні якості, властиві представникам різних ліній, порід або сортів. За своїми генетичними наслідками неспоріднене схрещування прямо протилежне спорідненому. При неспорідненому схрещуванні з кожним наступним поколінням зростає гетерозиготність нащадків. Адже зі зменшенням ступеня спорідненості організмів зростає ймовірність наявності в них різних алелей певних генів. У нащадків від неспорідненого схрещування часто спостерігають явище гетерозису, або гібридної сили.

Гетерозис – явище, за якого перше покоління гібридів, одержаних від неспорідненого схрещування має підвищену життєздатність і продуктивність порівняно з вихідними батьківськими формами. У гетерозисних форм сублетальні та летальні рецесивні алелі переходять у гетерозиготний стан, завдяки чому їхній несприятливий вплив не проявляється у фенотипі. До того ж, у генотипі гібридних особин можуть поєднуватися сприятливі домінантні алелі обох батьків. Це, у свою чергу, може зумовлювати взаємодію домінантних алелей неалельних генів.

Найчіткіше гетерозис проявляється в першому поколінні гібридів. У наступних поколіннях, завдяки явищу розщеплення ознак і переходу частини генів у гомозиготний стан, ефект гетерозису слабшає і до восьмого покоління сходить нанівець. У рослин ефект гетерозису можна закріпити вегетативним розмноженням, подвоєнням кількості хромосом або партеногенетичним розмноженням. Гетерозис може більше позначитись на одних ознаках гібридної особини, не зачіпаючи інших. Явище гетерозису широко застосовують у сільському господарстві, оскільки воно значно підвищує продуктивність рослин. Ефект гетерозису добре виражений у овочевих культур (цибулі ріпчастої, помідорів, огірків, баклажанів, цукрового буряка тощо).

Перспективним методом селекційної роботи є **віддалена гібридизація** – схрещування особин, які належать до різних видів і навіть родів з метою поєднання у генотипі гібридних нащадків цінних спадкових ознак представників різних видів. За допомогою віддаленої гібридизації створено гібриди пшениці й пирію, які відрізняються високою продуктивністю і стійкістю до полягання; пшениці й жита тощо. Відомі міжвидові гібриди й серед плодово-ягідних культур (наприклад, малини та ожини, сливи та терену).

У тваринництві також виведено численні міжвидові гібриди. Так, добре відомий гібрид кобили і віслюка – мул, який відрізняється значною силою, витривалістю та довшим терміном життя порівняно з батьківськими видами.

Проте селекціонери часто стикаються з проблемою безпліддя міжвидових гібридів, гамети яких зазвичай не дозрівають. Навіть за умови однакової кількості хромосом у каріотипах батьківських форм, їхні хромосоми можуть відрізнятися за розмірами й особливостями будови і тому нездатні кон'югувати в процесі мейозу. Особливо ускладнюється хід мейозу за умови різної кількості хромосом у

каріотипі батьківських форм. Безпліддя міжвидових гібридів у рослин можна подолати шляхом поліплоїдії. У селекції тварин розв'язати проблему безпліддя міжвидових гібридів значно складніше. Лише у окремих випадках у міжвидових гібридів тварин особини однієї чи обох статей виявляються здатними до розмноження. Так, у гібрида яка і великої рогатої худоби самці безплідні, а самки плідні. Мули взагалі нездатні до розмноження.

5.3. Селекція мікроорганізмів

Мікроорганізми (бактерії, мікроскопічні гриби, найпростіші та ін.) відіграють важливу роль у біосфері та господарській діяльності людини. З більш ніж 100 тис. видів відомих у природі мікроорганізмів людиною використовується кілька сотень, але їх кількість постійно зростає. Якісний стрибок у їхньому використанні відбувся в останні десятиліття, коли було встановлено ряд генетичних механізмів регуляції біохімічних процесів у клітках мікроорганізмів.

Ряд мікроорганізмів продукують десятки видів органічних речовин – амінокислот, білків, антибіотиків, вітамінів, ліпідів, нуклеїнових кислот, ферментів, пігментів, цукрів тощо. Всі ці речовини широко використовуються у різних областях промисловості та медицини. Такі галузі харчової промисловості, як хлібопечення, виробництво спирту, молочних продуктів, виноробство і багато інших, засновані на діяльності мікроорганізмів.

Мікробіологічна промисловість висуває до продуцентів різних сполук жорсткі вимоги, які важливі для технології виробництва, а саме: висока швидкість росту, використання для життєдіяльності дешевих субстратів і стійкість до зараження сторонніми мікроорганізмами. Наукова основа цієї промисловості – уміння створювати мікроорганізми з новими, заздалегідь визначеними генетичними властивостями й уміння використовувати їх у промислових масштабах.

Селекція мікроорганізмів (на відміну від селекції рослин і тварин) має ряд особливостей:

1. У селекціонера є необмежена кількість матеріалу для роботи: за лічені дні в чашках Петри або пробірках на поживному середовищі можна виростити мільярди клітин;
2. Більш ефективне використання мутаційного процесу, оскільки геном мікроорганізмів гаплоїдний, що дозволяє виявити будь-які мутації вже у першому поколінні;
3. Простота генетичної організації бактерій: значно менша кількість генів, їх генетична регуляція більш проста, взаємодії генів прості або відсутні.

Ці особливості мають велике значення при виборі методів селекції мікроорганізмів, які багато в чому суттєво відрізняються від методів селекції рослин і тварин. Наприклад, у селекції мікроорганізмів враховуються їх природня здатність до синтезу корисних для людини речовин (амінокислоти, вітаміни, ферменти й ін.). У випадку використання методів генної інженерії можна змусити бактерії й інші мікроорганізми продукувати ті речовини, синтез яких у природних

умовах їм ніколи не був властивий (наприклад, гормони людини й тварин, біологічно активні сполуки).

Природні мікроорганізми, як правило, мають низьку продуктивність речовин, які цікавлять селекціонера. Для використання ж у мікробіологічній промисловості необхідні високопродуктивні штами, які створюються різними методами селекції, у тому числі відбором серед природних мікроорганізмів.

Відбору високопродуктивних штамів передують цілеспрямована робота селекціонера з генетичним матеріалом вихідних мікроорганізмів. Зокрема, широко використовують різноманітні способи рекомбінації генів: кон'югацію, трансдукцію, трансформацію й інші генетичні процеси. Наприклад, за допомогою кон'югації було створено штам *Pseudomonas putida*, який здатний утилізувати вуглеводні нафти.

У селекції мікроорганізмів часто використовують трансдукцію (перенесення гену з однієї бактерії до іншої за допомогою бактеріофагів), трансформацію (перенесення ДНК, ізольованої з однієї клітини у іншу) і ампліфікацію (збільшення числа копій потрібного гена).

Так, у багатьох мікроорганізмів гени біосинтезу антибіотиків або їх регулятори знаходяться у плазмідах. Тому збільшення числа цих плазмид шляхом ампліфікації дозволяє суттєво підвищити вихід антибіотиків.

Найважливішим етапом у селекційній роботі мікроорганізмів є індукований мутагенез. Експериментальне одержання мутацій відкриває майже необмежені перспективи для створення високопродуктивних штамів. Імовірність виникнення мутацій у мікроорганізмів нижча, ніж у всіх інших організмів. Але ймовірність виділення мутацій за даним геном у бактерій значно вища, ніж у рослин і тварин, оскільки одержати багатомільйонне потомство у мікроорганізмів досить просто і швидко.

Для виявлення мутацій служать селективні середовища, на яких здатні рости мутанти, але гинуть батьківські клітини дикого типу. Проводиться також відбір за забарвленням і формою колоній, швидкості росту мутантів і диких форм і т.д. Відбір за продуктивністю (наприклад, продуцентів антибіотиків) здійснюється за ступенем антагонізму і пригнічення росту чутливого штаму. Для цього штам-продуцент висівається на газон чутливої культури. За розміром плями, де відсутній ріст чутливого штаму навколо колонії штаму-продуцента, судять про ступінь його активності (у даному випадку антибіотичної). Для розмноження відбираються найбільш продуктивні колонії. У результаті селекції продуктивність продуцентів вдається збільшити в сотні й тисячі разів. Наприклад, шляхом комбінування мутагенезу й відбору в роботі із мікроорганізмами роду *Penicillium* був збільшений вихід антибіотика пеніциліну приблизно в 10 тис. разів у порівнянні з вихідним диким штамом.

Важливим підходом у селекційній роботі з мікроорганізмами є одержання рекомбінантів шляхом злиття протопластів, або гібридизації різних штамів бактерій. Злиття протопластів дозволяє об'єднати генетичні матеріали таких мікроорганізмів, які в природних умовах не схрещуються.

Роль мікроорганізмів у мікробіологічній і харчовій промисловості, сільському господарстві та інших областях народного господарства важко

переоцінити. Особливо важливо відзначити те, що багато мікроорганізмів для виробництва цінних продуктів використовують відходи промислового виробництва і нафтопродукти, переробляючи їх і таким охороняють навколишнє середовище від забруднення.

Запитання до розділу:

1. Що таке селекція? Які завдання сучасної селекції?
2. Які є основні методи селекції?
3. Від чого залежить ефективність штучного відбору?
4. Які типи штучного відбору застосовуються у селекції?
5. Що таке гібридизація? Які організми називають гібридами?
6. Що таке споріднене схрещування і які його наслідки?
7. З якою метою споріднене схрещування застосовують у селекційній роботі?
8. Охарактеризуйте неспоріднене схрещування.
9. Які причини гетерозису? Для чого його застосовують у селекційній роботі?
10. Що таке віддалена гібридизація? Для чого її застосовують?
11. Чому міжвидові гібриди часто безплідні? Як можна подолати безпліддя міжвидових гібридів?
12. Які особливості селекції мікроорганізмів?
13. Які методи використовуються при створенні нових штамів мікроорганізмів?

6. ГЕНЕТИКА РОЗВИТКУ

Людство завжди цікавило питання: “Яким чином із заплідненої яйцеклітини виростає цілий організм і як виникає відмінність між клітинами цього організму?”. Це питання і нині залишається однією із основних проблем біології, зокрема генетики розвитку.

Під час розвитку формуються багаточисленні органи і тканини, які абсолютно не схожі один на одного. Вони необхідні для виконання певних функцій і кожна тканина відрізняється від інших. Необхідно було вирішити дві проблеми: яким чином тканини диференціюються одна від одної і яким чином диференційний стан, що характерний для кожної клітини, спадкується у ряду поколінь.

Досить тривалий час у біологічній науці мала місце думка, що процес розвитку – це простий ріст органів організму, який формується у статевих клітинах, так званий преформований організм (рис. 6.1).

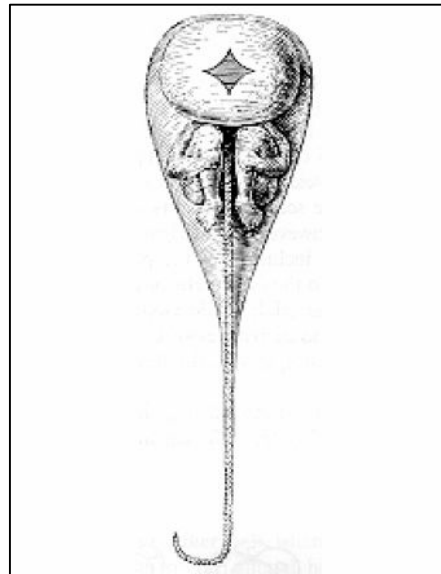


Рис. 6.1. Мініатюрна людина, сформована у сперматозоїді людини

У 1759 році була запропонована теорія епігенезу, згідно якої кожен організм розвивається у ході онтогенезу (індивідуального розвитку) не із преформованих органів, а із простого неорганізованого зародка, шляхом послідовного ряду новоутворень.

Згідно сучасних уявлень життєвий шлях будь-якого організму – це постійне оновлення усіх клітин, тканин і органів. Деталі процесу оновлення визначаються структурами, які були сформовані на попередній стадіях розвитку організму. Тобто, згідно цієї точки зору, розвиток не зупиняється у якійсь певній точці, а продовжується усе життя.

Залежність розвитку від активності генів, що знаходяться у клітинному ядрі, встановлена під час багато чисельних дослідів. Показана також роль стану цитоплазми у підтримці певного диференційованого стану клітини в цілому.

За думкою Томаса Ханта Моргана, яку він озвучив ще у 30-х роках ХХ століття, ранні стадії розвитку визначаються протоплазмою яйцеклітини, а вплив хромосом сперматозоїда прослідковується пізніше. Це значить, що у протоплазмі яйцеклітини відбуваються зміни під впливом генів самої яйцеклітини, а протягом всього періоду розвитку відбувається активація різних груп генів.

6.1. Роль клітинного ядра у процесі розвитку організму

Для встановлення ролі ядра у процесі розвитку організмів рядом дослідників були проведені численні дослідження. Так, Г. Гемерлінг провів досліди із заміною ядра у водорослі *Acetabularia*. Він використовував два види цього роду – *A. mediterranea* і *A. crenulata*, які відрізняються за формою шляпки (рис. 6.2). У період вегетативного циклу ця водоросль представляє собою велику

однойдерну клітину з довжиною ніжки до 6 см. Різні види ацетабулярії мають специфічну форму шляпки.

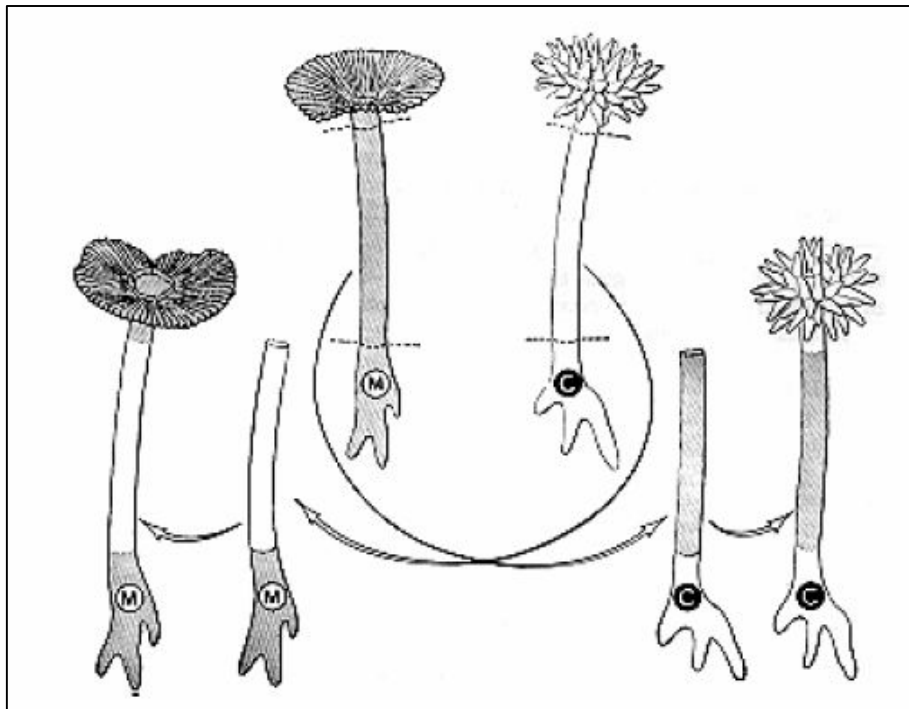


Рис. 6.2. Регенерація шляпки у ацетабулярії при перехресному схрещуванні (*A. mediterranea* – сірий колір, *A. crenulata* – білий колір)

Ядро ацетабулярії знаходиться у одному із ризоїдів. Якщо шляпку або ніжку з шляпкою відрізати, то вони знову регенерують із ризоїда, що містить ядро. При цьому зберігається форма шляпки, яка характерна для даного виду. Коли ж схрещували відрізану ніжку водорослі одного виду з ризоїдом другого виду, то регенеруюча на ніжці шляпка мала форму того виду, до якого належало ядро (рис. 6.2). Аналогічний результат отримували, коли ядро одного виду водорослі пересаджували у ізолювану ніжку іншого виду.

Астауров Б.Л., беручи за снову яскраво виражену чутливість ядра і цитоплазми до іонізуючих випромінювань, показав вирішальну роль ядра у визначенні ознак багатоклітинних організмів. В нормі у метелика-шовкопряда при заплідненні у яйцеклітину проникають кілька спермій, але з ядром яйцеклітини зливається ядро лише одного з них. Інші спермії залишаються на периферії яйцеклітини і руйнуються, не беручи участі в утворенні і розвитку зародка. Піддаючи незапліднені яйцеклітини шовкопряда тепловому шоку і рентгенівському опроміненню можна повністю зруйнувати їх ядра. При цьому не відбувається руйнування цитоплазми яйцеклітини, оскільки, у порівнянні з ядром, вона є менш чутливою до таких впливів. Якщо далі таку яйцеклітину запліднити, то відбувається злиття двох спермій, що проникли до клітини, з утворенням зиготи. Відповідно у даному випадку зигота має ядро, яке має виключно батьківське походження, а цитоплазма повністю материнська. Організми, які розвивались із таких андрогенетичних зигот завжди були самцями і доволі точно

повторювали фенотип своїх батьків. Це було особливо помітно, коли яйцеклітини належали самкам одного виду, а спермії – самцям іншого виду (рис. 6.3).

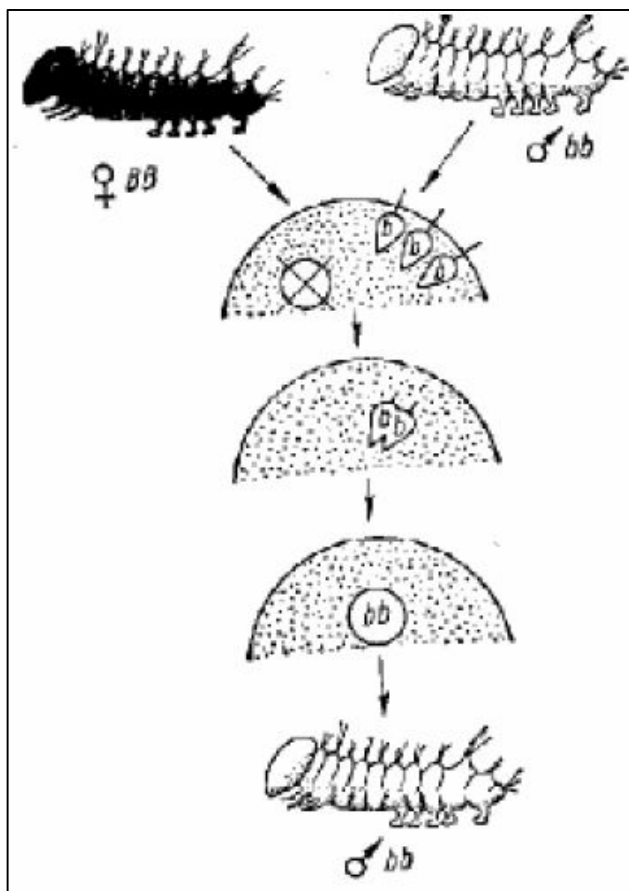


Рис. 6.3. Андрогенез у тутового шовкопряда.

Таким чином наведені досліди беззаперечно доказують провідну роль саме клітинного ядра у процесі розвитку майбутнього організму.

6.2. Тотипотентність геному

До нашого часу залишається спірним питання: “Чи супроводжується спеціалізація клітин втратою генів, які у майбутньому не потрібні для даного типу клітин?”. Наприклад, чи зберігаються у ядрі клітин кишечника гени, які необхідні для синтезу гемоглобіну – білка характерного для еритроцитів, а у ядрі нервових клітин – гени, які контролюють утворення міозину – особливого білка м’язових клітин? Якщо “непотрібні” гени втрачаються, то саме ця втрата різних генів і визначає спеціалізацію клітин. Цю гіпотезу висунув ще у 1892 році А. Вейсман. Протилежна точка зору зводиться до того, що у всіх клітинах організму зберігаються усі гени, але у тих клітинах, де їх реалізація не потрібна, гени знаходяться у неактивному стані.

Для того, щоб вирішити яка із цих двох гіпотез справедлива, англійський генетик Дж. Гердон трансплантував ядра із спеціалізованих клітин епітелію кишечника головастика (рис. 6.4) у незапліднене яйце, із якого попередньо було видалене власне ядро. При цьому необхідне використання якого-небудь ядерного

маркера, який дозволить відрізнити нащадків пересадженого ядра від нащадків ядра-хазяїна, оскільки не має впевненості, що не відбулось випадкової помилки при видаленні ядра-хазяїна. У даному випадку маркером була наявність двох ядерець у ядрах клітини-хазяїна і одного ядерця – у ядрах, які піддавались трансплантації.

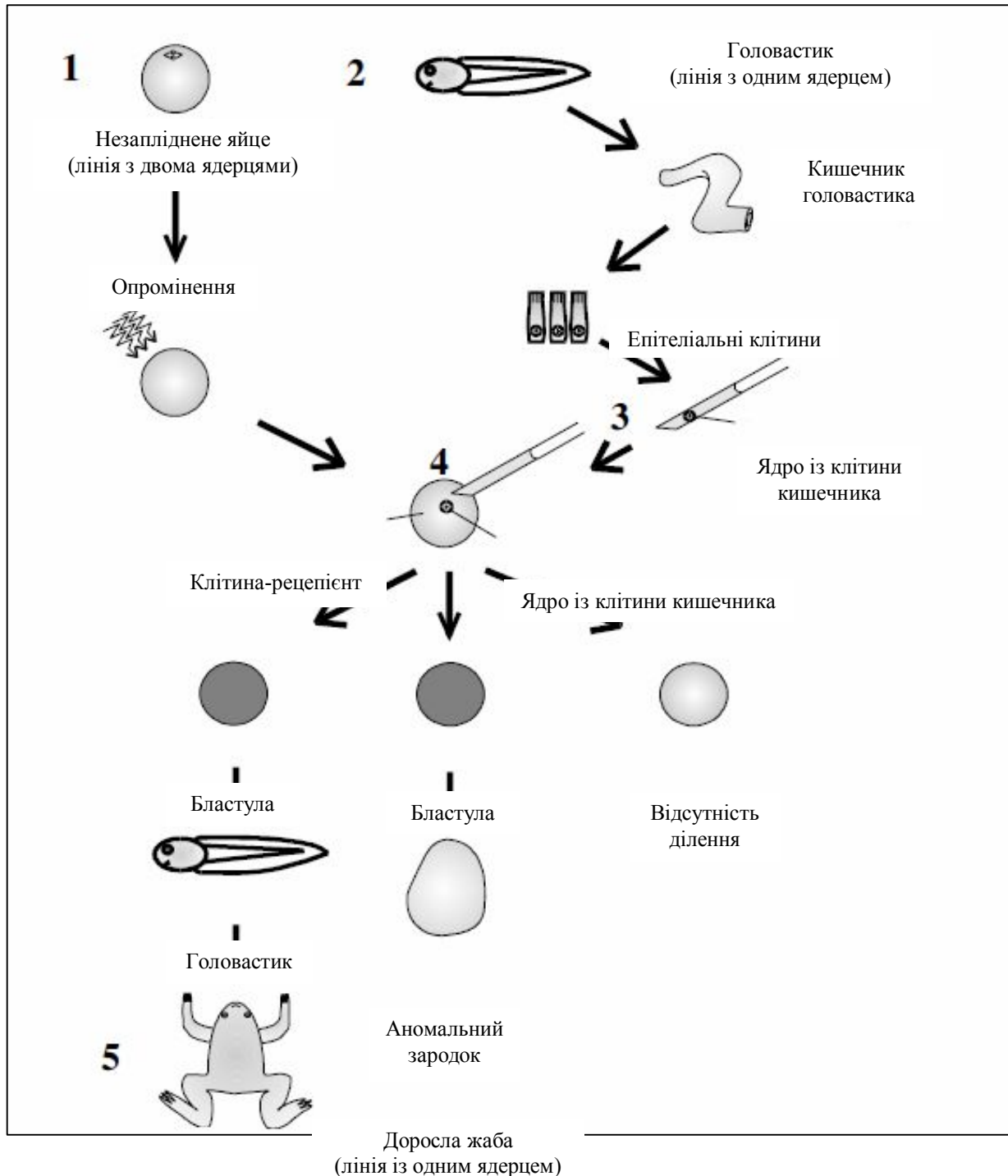


Рис. 6.4. Схема перенесення ядер із клітин кишечника головастика у незапліднене яйце жаби.

У даних експериментах приблизно із 1 % яєць, у які були перенесені ядра клітин епітелію, розвинулись дорослі жаби. Таким чином властиве диференціювання тваринних клітин не супроводжується втратою або незворотною інактивацією генів.

У лютому 1997 року у журналі “*Nature*” з’явилося повідомлення, яке дало поштовх для обговорення проблеми генетики розвитку журналістів, політиків, юристів і державних діячів: група учених із Шотландії повідомила про успішну трансплантацію ядер із диференціальних клітин у яйцеклітину вівці і отриманні нормально сформованої тварини. Ці результати відкривають шлях для фактично необмеженого вегетативно розмноження будь-якого індивідуума: любий організм у результаті трансплантації ядер із його клітин у реципієнтні клітини може дати початок мільярдам абсолютно ідентичних нащадків. Цей процес називається клонуванням.

Схема цього досліджу була аналогічною тій, яку використовував Дж. Гердон і його співробітники. Маркерами у даному випадку були масть овець і різноманітні мікросателіти у складі ДНК. Ооцити виділяли із овець шотландської чорномордої породи, а донорні клітини були виділені із клітин вим’я біломордої породи овець. Після цього за допомогою електричного імпульсу відбувалось злиття енуклеїнованого ооциту з цілою клітиною-донором. Експериментально отримані зиготи поміщали у яйцеводи самок, де вони починали ділитись і розвивались у морули, які і були пересаджені у матку чорномордих овець. Із 277 експериментально отриманих зигот лише одна пройшла усі стадії розвитку і народилось ягня, яке було біломордим (рис. 6.5).



Рис. 6.5. Овечка (на малюнку зліва), що розвивалась із клітини молочної залози, яка була взята від вівці біломордої породи і трансплантована у вівцю чорномордої породи (справа).

Той факт, що овечка виросла із яйцеклітини, яка мала ядро дорослої тварини, доказує відсутність незворотніх модифікацій генетичного матеріалу у процесі нормального розвитку.

Отже **тотипотентність** (від латинського *totus* – увесь, цілий і *potentia* – сила), здатність окремих клітин організму у процесі реалізації генетичної інформації не тільки до диференціювання, але й до розвитку у цілий організм. Тотипотентні запліднені яйцеклітини рослин і тварин. Для соматичних, тобто нестатевих клітин тварин і людини характерна тканнна специфічність на ранніх стадіях ембріонального розвитку, і тому вони не мають тотипотентності (крім деяких клітин кишковопорожнинних). Однак стовбурові клітини у тканинах, що оновлюються у межах одного типу тканини можуть розвиватися у різних напрямках. Наприклад, стовбурові клітини кровоутворюючої тканини ссавців дають початок таким різним спеціалізованим клітинам як еритроцити і лейкоцити. Соматичні клітини рослин здатні в певних умовах повністю реалізувати свій потенціал розвитку з утворенням цілого організму, що говорить про збереження усієї генетичної програми розвитку у вегетативних клітинах рослин. Спеціалізовані клітини різноманітних органів рослин (листка, кореня, квітки, ендосперму насіння тощо) здатні до розмноження у штучному середовищі поза організмом. При створенні оптимального співвідношення фітогормонів (цитокінінів і ауксинів) у поживному середовищі клітини, що культивуються можуть утворювати ростки або перетворюватися в результаті так званого соматичного ембріогенезу у зародкоподібні структури (ембріюїди), які потім розвиваються у цілий організм. Здатність соматичних клітин рослин проявляти тотипотентність залежить, крім відповідних гормональних умов середовища, і від цілого ряду інших факторів, у першу чергу, від генотипу. Тотипотентність соматичних клітин лежить в основі їх використання у генетичній і клітинній інженерії.

6.3. Детермінація

Відомо, що кожна клітина організму знаходиться у деякому детермінованому стані. Детермінація – важливий процес, у результаті якого клітини із однаковим набором генів починають відрізнятися за зовнішніми ознаками або за фенотипом. Перед ученими-генетиками постали ряд питань: “На якій стадії розвитку зародка відбувається детермінація?”, “Наскільки стійкий такий стан клітини?”, “Чи спадкується такий стан усіма клітинами, що походять від детермінованої клітини-попередника?”, “Чи можна змінити детермінованість і переключити клітини на розвиток у нових напрямках?”.

Щоб знайти відповіді на ці запитання видатний швейцарський генетик Е. Хадорн використав плодову мушку дрозофілу. Відомо, що під час розвитку вищих комах, у тому числі мух, відбувається досить цікавий поділ клітин за їх функціями. Клітини одного типу починають диференціюватися з перших етапів ембріонального розвитку – із таких клітин утворюється тіло личинки камахи із усіма його органами. Клітини другого типу обособлені – вони складають так звані імагінальні диски або зачатки дорослих органів. Не дивлячись на те, що клітини імагінальних дисків знаходяться у постійному контакті із сусідніми диференціюючими клітинами, вони знаходяться у ембріональному стані протягом

усього личинкового періоду. У цей час вони діляться. У процесі метаморфозу значна частина личиночних органів розсмоктується або лізується. Одночасно із цим клітини імагінальних дисків втрачають свій ембріональний стан і починають диференціюватись, перетворюючись у спеціалізовані тканини дорослої мухи. Із кожного імагінального диску утворюється окрема частина тіла камахи. Наприклад, для кожної із шести майбутніх ніг існує окремий диск, а голова утворюється із трьох пар дисків.

Імагінальні диски личинки можна ізолювати і пересадити у порожнину тіла іншої личинки. Коли личинка-хазяїн перетворюється на лялечку, то відбувається диференціювання трансплантата у відповідний орган. Наприклад, якщо трансплантовано імагінальний диск, який відповідає за розвиток ока мухи, то у череві личинки-хазяїна розвивається повністю сформоване око.

У результаті багатьох дослідів Е. Хардон виявив, що кожен імагінальний диск представляє собою свого роду мозаїку із різних груп клітин. Наприклад, із одних ділянок чоловічого генітального диска утворюється сім'яний канал, із інших – різні елементи чоловічого статевого органу, із третіх – анальні пластинки і задня кишка. Відповідно майбутнє різноманіття клітин детерміноване вже на личинковій стадії.

Цікаві результати були отримані після трансплантації імагінальних дисків зразу у дорослих мух. Клітини цих дисків необмежено ділились і розростались. Якби розвиток цих імагінальних дисків відбувався у нормальній личинці, то їх клітини перестали б ділитись з початком метаморфозу – під дією екдистерона (гормону комахи) вони б почали диференціюватись у структури дорослих комах. Необмежений ріст клітин імагінальних дисків, трансплантованих у череві дорослих мух, продовжувався 6 років. Оскільки муха дрозофіла живе біля місяця, то досліджувані клітини імагінальних дисків пересажували у нову муху через кожні 2 тижні. При цьому клітини перенесли більше 160 пересадок. Не дивлячись на те, що трансплантати існували у дорослих мухах роками, вони зберегли свій вихідний ембріональний характер і не диференціювались. Якщо ж ізолювати частину трансплантата і ввести його у личинку, то клітини піддавались метаморфозу і нормально диференціювались у структури дорослого організму. При цьому, якщо кілька років назад для трансплантації були взяті імагінальні диски крила, то формувалось крило. Таким чином стан детермінації може відтворюватись довгий час без яких-небудь змін. Ця властивість детермінованих клітин передається досить тривалий час завдяки клітинній спадковості або певного стану ядерно-цитоплазматичних відносин (або наявності у цитоплазмі епігенетичних факторів).

У деяких випадках нормальний стан детермінованості у досліді Е. Хардона різко змінювався. Дуже рідко із клітин генітального імагінального диска після тривалого розмноження у череві дорослої мухи формувались органи голови або кінцівки, тобто клітини більше не диференціювались у відповідності із детермінацією їх батьківських клітин – відбулась трансдетермінація. Набутий трансдетермінований стан у подальшому досить тривалий час передається іншим клітинам за рахунок клітинної спадковості.

Явище трансдетермінації, так як і результати трансплантації ядер, отримані Дж. Гердоном свідчать, що у основі диференціювання клітин не лежить незворотній стан генів, а тим більше їх втрата. Очевидно також і те, що у основі любого детермінованого стану лежить збалансована система ядерно-цитоплазматичних відношень. Як може сформуватись така система краще всього показують результати самого ранньому розвитку організму.

6.4. Ранній ембріональний розвиток дрозофіли

Ще у 1950-ті роки сформувалось уявлення про морфогени як про речовини, які індукують утворення певних частин тіла. Передбачали, що ці речовини дифундують через тканину і їх розподіл диктує той чи інший шлях розвитку клітини. Пізніше теорія морфогенів отримала значний розвиток. За сучасними уявленнями морфоген виділяється із локального джерела і під час подальшої дифузії у тканини утворюється градієнт його концентрації. У кожній групі клітин свій набір і концентрація морфогенів, тобто своя інформація про подальший розвиток – це генетики розвитку називають позиційною інформацією.

Краще всього вивчені градієнти морфогенів, які утворюються у розвиваючомуся яйці дрозофіли. Відомо, що у дрозофіл яйце дозріває у особливій камері – фолікулі. Ця камера містить ооцит – дозріваюче яйце і 15 великих підтримуючих клітин, функція яких синтезувати продукцію і перекачувати її у ооцит. У них функціонують так звані “гени із материнським ефектом”, тобто такі гени, які функціонують у підтримуючих клітинах ооцитів – у організмі матері ще до запліднення яйця сперматозоїдом і інформація з них передається у ооцит. Один із таких генів – *bicoid*. Гомозиготні за мутацією цього гену самки відкладають яйця, у яких не розвиваються нормальні ембріони, навіть якщо ці яйця запліднені спермієм, що містить нормальний алель гену *bicoid*. Цілком очевидно, що продукти цього необхідного для розвитку гену, синтезуються у самки і відкладаються у яйці.

Виявляється, що білки, які кодуються генами, що функціонують у ході дозрівання яйця і транспортуються туди із підтримуючих клітин, розподіляються по осі яйця, утворюючи градієнти, характерні для продуктів кожного гена. На рис. 6.6 показаний розподіл продукту гену *bicoid* у межах яйця. Він займає строго визначену ділянку. Щоб продукт гену *bicoid* зайняв це місце необхідна діяльність і інших генів, при мутації яких цей продукт розподіляється неправильно. Так у нормальному яйці РНК гену *bicoid* розміщується у вузько локальній ділянці (рис. 6.6 а). Але у ряду мутантів розподіл цієї РНК у яйці сильно змінений: у результаті мутації гену *exuperantia* РНК гену *bicoid* більш або менш рівномірно розподілена по всьому яйцю із невеликим градієнтом від переднього полюса до заднього. У мутантів за геном *swallow* градієнт цього морфогена виражений сильніше, тобто його розподіл наближається до нормального: у передній частині яйця виявлено велику скупченість РНК *bicoid* і невелика її кількість розподілена по всій цитоплазмі (рис. 6.6 б, в).

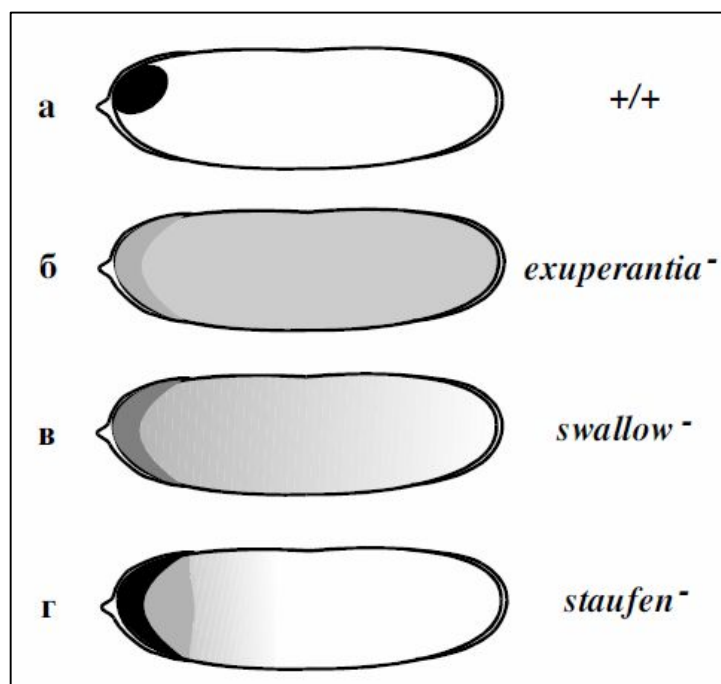


Рис. 6.6. Розподіл матричної РНК гена *bicoid* по довжині яйця мухи дрозофіли у нормальній лінії (чорна пляма (а) і у мутантів за геном *exuperantia* (б), *swallow* (в) і *staufen* (г).

Дуже близьке до норми розподілення РНК *bicoid* виявлено у мутантів за геном *staufen* (рис. 6.6 г): у них РНК *bicoid* взагалі не переходить у задню частину ембріона.

Таким чином РНК гена *bicoid* синтезується ще у підтримуючих клітинах ооцитів у материнському організмі і надходить до яйцеклітин. Далі за допомогою продуктів інших генів, у даному випадку це гени *exuperantia*, *swallow* і *staufen*, РНК *bicoid* займає певне положення у цитоплазмі яйця, тобто створюється певний градієнт у розподілі цього морфогена. У випадку мутації будь-якого з трьох перерахованих генів розподіл РНК *bicoid* змінюється, що призводить до серйозних порушень розвитку організму.

Відомо, що до яйця потрапляє РНК, синтезована із великої кількості генів. Оскільки кожна із цих РНК ще і розподіляється на чітко визначене місце у яйці в результаті активності інших генів, то стає очевидним наскільки велике число генів приймає участь у формуванні яйця.

При дозріванні яйця мухи дрозофіли у організмі матері утворюються чотири незалежні системи:

- 1). Передньо-задній градієнт білків гена *bicoid*;
- 2). Градієнт білка гена *nanos*, розміщений у задній частині яйця і необхідний для розвитку черевця мухи;
- 3). Термінуюча система – градієнти білка гену *torso*, розміщені на обох полюсах яйця і необхідні для формування головної і хвостової частини тіла;
- 4). Дорзо-вентральна система, яка залежить від активування рецепторного білка гена *toll* (рис. 6.7).

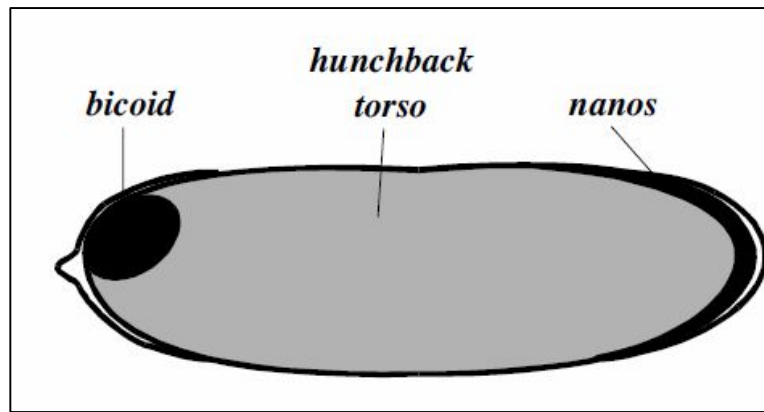


Рис. 6.7. Розподіл морфогенів РНК по поздовжній осі яйця дрозозфіли.

У свою чергу, після того як продукти таких генів як *bicoid* займуть правильне положення у яйці, вони вступають у взаємодію із іншими генами, що активуються після запліднення і утворення зиготи (зиготичні гени). Білки гена *bicoid* зв'язуються із контролюючими районами зиготичних генів і активують їх. Зрозуміло, що клітина, яка виникла у області локалізації морфогену *bicoid*, буде мати його вплив і розвиток піде у певному напрямку. Якщо ж клітина розміщена у задній частині ембріона, де немає морфогена *bicoid*, вона буде розвиватись у іншому напрямку. Таким чином набір певних білків, які накопичуються у цитоплазмі клітини на даній стадії розвитку, здатен активувати певний набір генів, завдяки чому підтримується диференціальний стан клітин або розвиток організму просувається далі.

Яким чином білковий продукт одного гену може взаємодіяти із іншим геном? Виявилось, що регуляторні частини генів містять специфічні групи нуклеотидів (мотиви), що мають спорідненість до певних поєднань амінокислот (доменам) у молекулах білків. Приєднання різних білкових факторів на відповідні мотиви у ланцюгу ДНК призводить до зміни її просторової організації і початку транскрипції кодуючої частини гена (якщо білок є активатором) або блокуванню транскрипції (якщо білок є інактиватором).

На рис. 6.8 зображений фрагмент (біля 700 пар нуклеотидів) регуляторної частини гена *even-skipped (eve)*, який контролює розвиток правильної сегментації тіла дрозозфіли. Видно, що мотиви нуклеотидів, які зв'язуються активуючими білками генів *bcd* і *hb* часто перекриваються із мотивами, до яких приєднуються білки, що пригнічують транскрипцію (гени *Kr* і *gt*).

Ці дані свідчать про те, що розміщення білків, які синтезуються у материнському організмі у певній частині яйця (рис. 6.7) має першочергове значення для процесу активування генів під час розвитку ембріона. Зрозуміло, що ген *eve* буде функціонувати у тій частині ембріона, у якій міститься багато материнських білків *bcd* і *hb* і не буде функціонувати у клітинах, які містять надлишок білків *Kr* і *gt*.

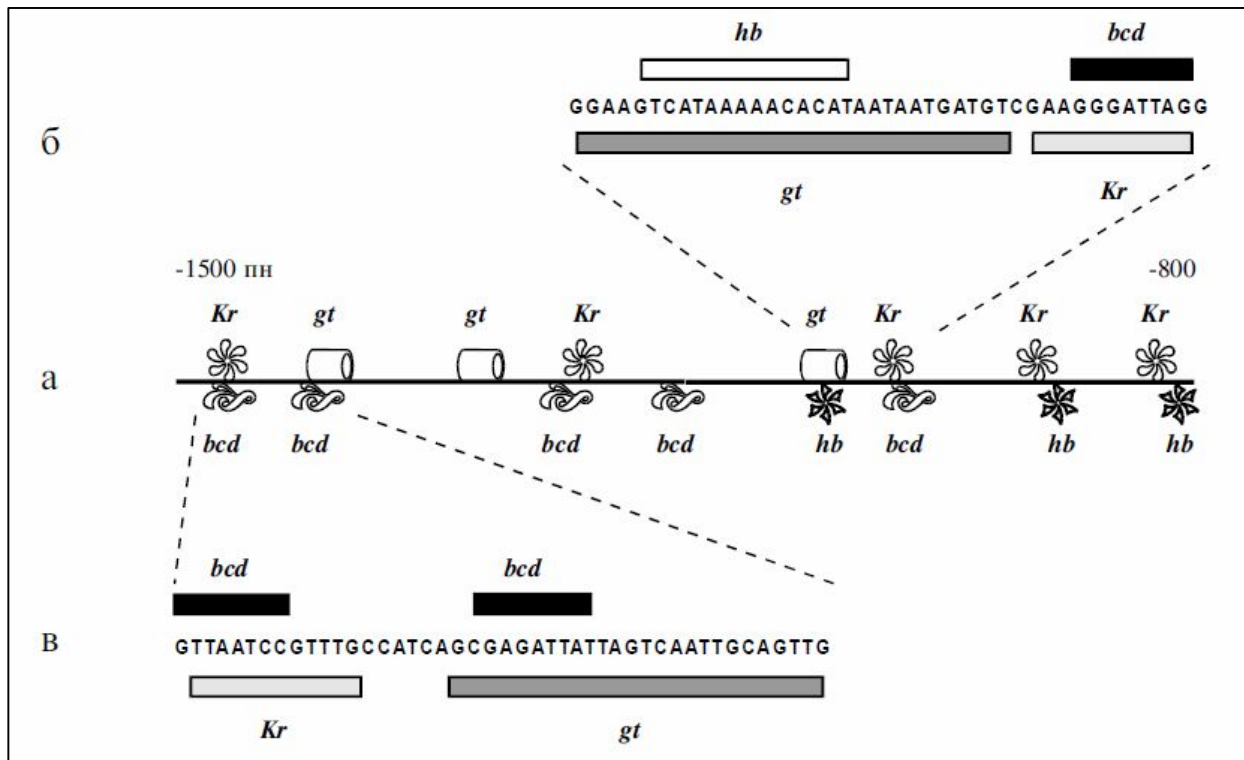


Рис. 6.8. Частина регуляторної ділянки гена *eve* довжиною 700 пар нуклеотидів (від -800 до -1500 пн).

(а – показано ланцюг ДНК, вище і нище якого відповідними символами позначені ділянки приєднання білків, що кодуються генами *Kr*, *gt*, *bcd* і *hb*; б і в – зображені послідовності нуклеотидів, які зв'язуються із даними білками)

Одним із генів, які відіграють головну роль на ранніх етапах ембріонального розвитку є *BX-C* (комплекс *Bithorax*). Відомо, що більшість представників тваринного світу (включаючи круглих червів) мають сегментовану будову (рис. 6.9), тобто їх тіло складається із серії сегментів. У савців сегментована будова спостерігається лише на самих ранніх етапах ембріогенеза і ці сегменти носять назву сомітів.

На узагальненій схемі (рис. 6.9, б) видно, що як личинка, так і доросла муха мають загальний принцип сегментації. Вони мають головний сегмент (HEAD), три грудних сегменти (Т1, Т2, Т3), а також 8 черевних від АВ1 до АВ8. Кожен сегмент як личинки, так і мухи має свій набір органів, за якими даний сегмент відрізняється від інших.

У мухи дрозофіли личинки мають яскраво виражені сегменти, а у дорослих мух сегментацію можна помітити навіть неозброєним оком, особливо черевця. Можна виділити всього 12 сегментів: один головний, три грудних і вісім черевних. Кожен сегмент має унікальний набір диференційованих морфологічних структур. Наприклад, мезоторакальний сегмент несе пару крил і пару ніг, метоторакальний – пару ніг і пару гальтерів – особливих булавовидних утворень, що допомагають тримати рівновагу під час польоту. Характерний набір можна знайти і на сегментах личинки (рис. 6.9).

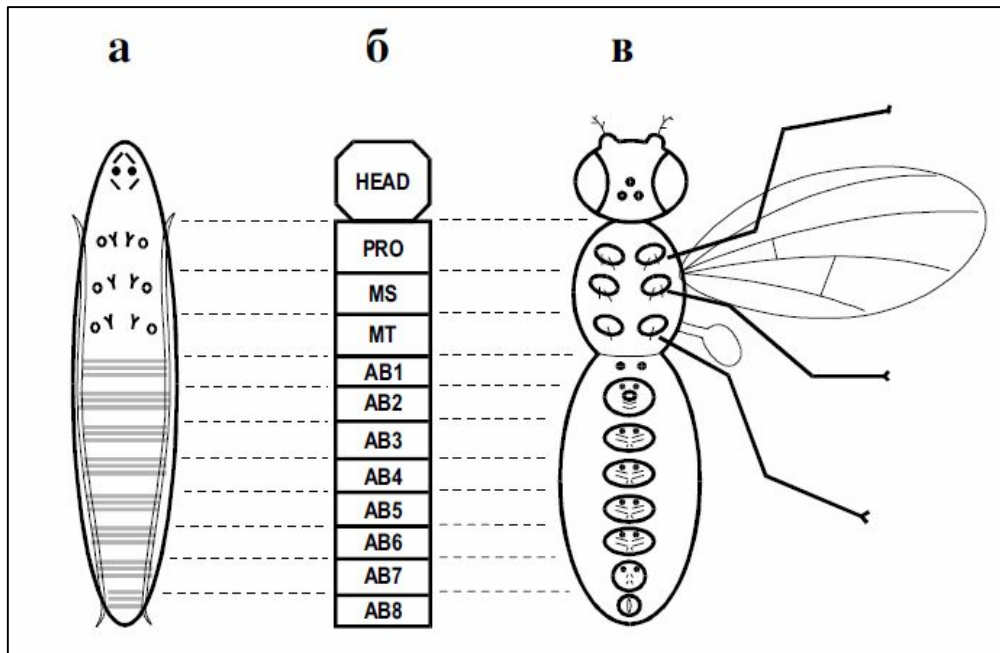


Рис. 6.9. Схема сегментованої будови личинки (а) і дорослої мухи дрозофіли (в).

За думкою видатного американського ученого Едварда Льюїса, мухи еволюціонували від комах, що мали чотири крила, а комахи, в свою чергу, походять від членистоногих, які мали велику кількість ніг. У ході еволюції мух у них повинні були б сформуватись декілька груп генів: ті, що пригнічують розвиток ніг на черевних сегментах багатоного-подібних предків, а також генів, що пригнічують розвиток другої пари крил. Повинна була б також з'явитись група генів, яка б відповідала за формування нових структур – гальтерів і черевних сегментів.

Одним із генів, які впливають на ці процеси і є ген *VX-C*. Проводячи ряд досліджень Е. Льюїс видалив ген *VX-C*. Організм мухи без цього гена розвивається до кінця періоду ембріонального розвитку і потім гине. Вивчивши мертвий ембріон, Е. Льюїс отримав вражаючі результати. Організм мав дуже характерну морфологію: у нього були лише другі торакальні сегменти (або мезоторакальні, рис. 6.9). Якби цей досліджуваний ембріон вижив і перетворився на дорослу муху, то вона мала б 10 пар крил і 10 пар ніг. Е. Льюїс зробив висновок, що функція гена *VX-C* заключається у інактивації генів, які відповідають за формування ніг і крил у всіх слідуєчих сегментах після другого торакального і у формуванні усіх структур на черевних сегментах.

У подальших експериментах виявилось, що *VX-C* містить три різних гени: *Ubx*, *abd-A* і *Abd-B* (рис. 6.10). Кожен із них контролює формування певної групи сегментів.

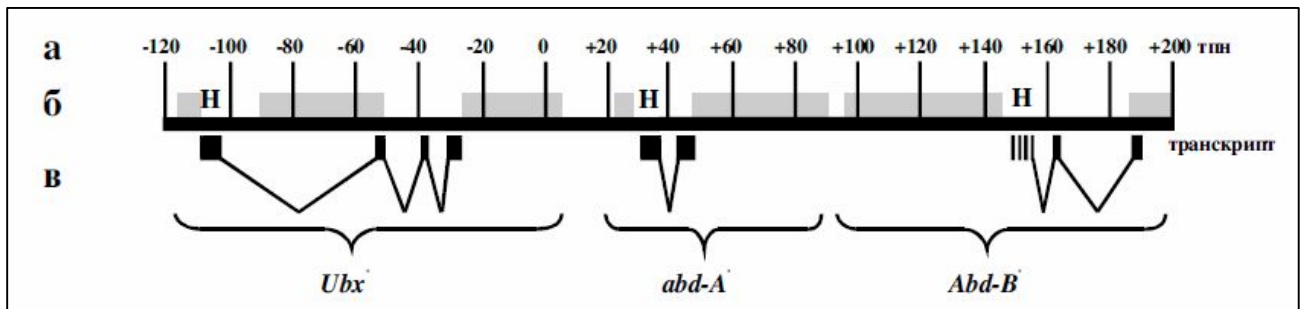


Рис. 6.10. Схема організації комплексу генів BX-C: *Ubx*, *abd-A* і *Abd-B*.

(а – відстань на карті ДНК від стартової точки початку клонування гена (0), тобто масштаб довжини ДНК у тисячах пар нуклеотидів; б – затемнені ділянки – регуляторні послідовності генів, Н – райони локалізації гомеодоменів; в – екзон-інтронна структура. Кодуючі ділянки генів у вигляді чорних прямокутників розміщені у відповідних ділянках генетичної карти. Між ними розміщені некодуючі нітрони. Екзони з'єднані між собою зигзагоподібними лініями. Лише РНК, яка була синтезована із екзонових ділянок, здатна транслюватись у білок).

Мутації цих генів заставляють розвиватись відповідні сегменти у попередній і генетичний порядок мутантів грубо відповідає просторовому порядку органів по осі тіла (рис. 6. 11).

Так, якщо усі три гени видалені (*Ubx*⁻, *abd-A*⁻ і *Abd-B*⁻, рис. 6.11), то нормально розвивається лише перший торакальний (Т1) і дев'ятий черевний (А9) сегменти, розвиток яких контролюється іншими генами, усі інші сегменти (Т3 і усі послідувачі черевні) розвиваються як як більш ранні Т2. Якщо ген *Ubx* функціонує нормально, але пошкоджуються гени *abd-A* і *Abd-B*, то спостерігається нормальний розвиток усіх грудних сегментів, а усі черевні сегменти представлені лише самим першим А1. При пошкодженні гена *Abd-B* відбувається нормальний розвиток усіх грудних сегментів, далі черевних сегментів А1, А2 і А3, а усі інші представлені сегментом А4 (рис. 6.11).

У молекулярно-генетичних експериментах було виявлено, що усі три гени комплексу BX-C мають гомологічні один одному ділянки, тобто фактично однакові послідовності нуклеотидів (більше 90 % подібності). Послідовність ДНК довжиною 180 пар нуклеотидів, яка мала найбільшу гомологію, назвали гомеодоменом.

Зараз знайдені сотні генів, які мають гомеодомен: у людини, мишей, птахів, жаб, черв'яків, жуків. Фактично усі представники тваринного світу, які хоча б на деяких етапах раннього розвитку проходять стадію сегментованого зародка, мають гени, що володіють гомеодоменом. А у мухи дрозофіли знайдено біля 100 генів, які мають у своєму складі гомеодомен. 180 пар нуклеотидів гомеодомена кодують фрагмент поліпептиду довжиною у 60 амінокислот, який закручений у 4 α-спіралі, кожна з яких відокремлена одна від одної нахилом осі обертання. Третя із цих спіралей розміщується у великій бороздці ДНК, впізнає певну послідовність нуклеотидів і зв'язується із нею. Такими властивостями структури володіють ДНК-зв'язуючі білки – фактори транскрипції. Процеси взаємодії нуклеотидів ДНК і амінокислот білка – фактора транскрипції організовані так, що певна послідовність нуклеотидів зв'язується тільки з певною послідовністю

амінокислот. Тому нуклеотиди у гомеодомені і розміщені у такій консервативній послідовності у представників різних типів, класів, родів і видів тварин. Наприклад, із 60 амінокислот, які кодуються гомеодоменом мухи дрозофіли і жаби ксенопуса 55 виявились однаковими.

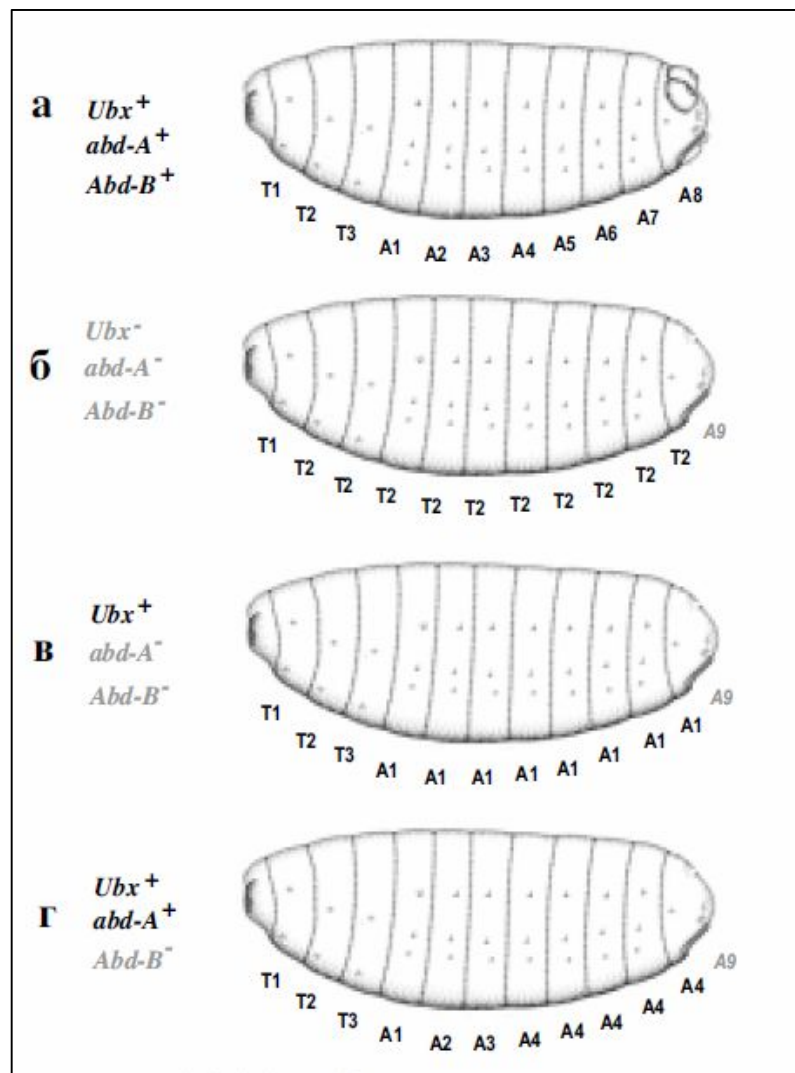


Рис. 6.11. Схема порушень диференціювання клітин у результаті мутацій генів *Ubx*, *abd-A* і *Abd-B*.

(а – усі три гени працюють нормально, у ембріона нормально розвинуті грудні сегменти (Т1 – Т3) і черевні (А1 – А8); б-г – порушення сегментації ембріона у результаті мутації одного, двох чи усіх трьох генів).

Розглянуті вище дані безсумнівно свідчать про те, що розвиток організму – це процес послідовного включення все більш складних генних систем. При цьому продукти одних генів знаходять спеціальні місця у регуляторних районах інших генів, зв'язуються з ними і переводять їх у активний стан. І так – суцільна послідовність включень і виключень генів.

Запитання до розділу:

1. Яка суть теорії епігенезу?
2. Що розуміють під розвитком будь-якого організму, згідно сучасних уявлень?
3. Яка роль клітинного ядра у процесі розвитку організму? Які були проведені дослідження для встановлення цієї ролі?
4. Які існували гіпотези щодо наявності (відсутності), активації (деактивації) генів під час диференціювання клітин?
5. Чи супроводжується диференціювання клітин втратою або незворотною інактивацією генів? Чому? Якими дослідженнями була отримана відповідь на це питання?
6. Що таке детермінація клітин?
7. Що таке морфоген?
8. Які системи утворюються у дозріваючому яйці мухи дрозофіли?
9. Завдяки чому підтримується диференціація клітин у процесі розвитку?
10. Яким чином білковий продукт одного гену може взаємодіяти із іншим геном?
11. Що таке гомеодомен?
12. Який висновок можна зробити на основі розглянутого матеріалу?

ЛІТЕРАТУРА:

Основна:

1. *Алиханян С.И., Акифьев А.П., Чернин Л.С.* Общая генетика. – М.: Высшая школа, 1985. – 448 с.
2. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть: У 4 т. – К.: Логос, 2001.
3. Генетика / Под ред. академика РАМН В.И. Иванова. – М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. – 638 с.
4. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
5. *Гуляев Г.В.* Генетика. – М.: Колос, 1984. – 351 с.
6. *Гуттман Б., Гриффитс Э., Сузуки Д., Куллис Т.* Генетика – М.: Фаир-Пресс, 2004. — 443с.
7. *Дубинин Н.П.* Общая генетика. – М.: Наука, 1986. – 559 с.
8. *Жимухев И.Ф.* Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2006. – 478с.
9. *Игнатова О.А., Скороцька О.І.* Генетика (Частина 1. Загальна та молекулярна генетика): Конспект лекцій до вивч. дисципліни для студ. напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання. – К.: НУХТ, 2009. – 83 с.
10. *Инге-Вечтомов С.Г.* Генетика с основами селекции. – М.: Высш.шк., 1989. – 447с.
11. *Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С.* Клітинна та генна інженерія. К.: Фітосоціоцентр, 2010. – 208 с.
12. *Петухов В.Л., Короткевич О.С., Стамбеков С.Ж., Жигачев А.И., Бакай А.В.* Генетика. – Новосибирск: СемГПИ, 2007. – 628 с.
13. *Пехов А.П.* Биология и общая генетика. – М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 1994. – 439с.
14. *Стрельчук С.І., Демідов С.В., Бердишев Г.Д., Голда Д.М.* Генетика з основами селекції. – К. : Фітосоціоцентр, 2000. – 292с.
15. *Ткачук З.Ю., Морозов М.М., Пилипчук О.Я.* Основи загальної генетики. – К. : Вища шк., 1995. – 178с.
16. *Тоцький В.М.* Генетика: У 2 т. – Одеса: Астропринт, 1998.
17. *Щелкунов С.Н.* Генетическая инженерия. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Додаткова:

1. *Браун В.* Генетика бактерій. – М.: Наука, 1968. – 446 с.
2. *Глазер В.М., Каменева С.В., Миронова Т.Н.* Большой практикум по генетике микроорганизмов. – М.: Изд. Моск.ун-та, 1977. – 119с.
3. *Губаревич А.И.* Генетика. – Мінськ: Наука и техника, 1984. – 148 с.
4. *Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М.* Генетика: Энциклопедический словарь / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований. — Минск : Тэхналогія, 1999. — 448с.
5. *Кайданов Л.З.* Генетика популяций. – М.: Высшая школа, 1996. – 320с.

6. *Костишин С.С., Марченко М.М., Руденко С.С.* Нуклеїнові кислоти: біохімія, генетика, екологія. – Чернівці: Рута, 1998. – 224с.
7. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.092900 “Промислова біотехнологія” та “Біотехнологія біологічно активних речовин” напряму 0929 “Біотехнологія” денної та заочної форм навчання / Уклад.: В.Д.Веренко, О.А. Ігнатова, О.П. Манджос. – К.: НУХТ, 2007. – 58 с.
8. *Хедрик Ф.* Генетика популяцій. – М.: Техносфера, 2003. – 588с.
9. Сборник методик по генетике микроорганизмов. – М.: Медицина, 1970. – 247 с.
10. *Стент Г., Кэлиндар Р.* Молекулярная генетика. – М.: Мир, 1981. – 590с.

Навчальне видання

ГЕНЕТИКА (ЧАСТИНА 2)

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ
до вивчення дисципліни
для студентів
напряму 6.051401 «Біотехнологія»
денної та заочної форм навчання

Укладач: Скроцька Оксана Ігорівна

Видання подається в авторській редакції

Підп. до друку 08.07.10. Ум. друк. арк. 6,13. Наклад 150 пр.
Зам. № 094-10А

РВЦ НУХТ. 01601 Київ-33, вул. Володимирська, 68
www.book.nuht.edu.ua

Свідоцтво про реєстрацію серія ДК № 1786 від 18.05.04 р.

