

# БІОТЕХНОЛОГІЯ

*НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК*

*за редакцією М. І. Гиль*

*Рекомендовано  
Міністерством освіти і науки, молоді та спорту України  
як навчальний посібник*

**Миколаїв**  
**Миколаївський державний аграрний університет**  
**2012**

**УДК 636.082.2**  
**ББК 46.0 + 30.16**  
**Ю32**

**Авторський колектив:**

**О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль**

Рекомендовано Міністерством освіти і науки, молоді та спорту України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів, які навчаються за напрямом підготовки «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» (лист № 1/11-2337 від 21.02.2012 р.).

**Рецензенти:**

- Дуган О. М.** – д-р біол. наук, професор, декан факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут»;
- Коцюмбас І. Я.** – д-р вет. наук, професор, член-кореспондент НААН України, Заслужений діяч науки і техніки України, директор Науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок НААН України;
- Подоба Б. Є.** – д-р с.-г. наук, головний науковий співробітник Інституту розведення і генетики тварин НААН України;
- Шаловило С. Г.** – д-р с.-г. наук, професор, завідувач кафедри технології виробництва молока і яловичини Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького.

Юлевич О. І. **Біотехнологія** : навчальний посібник / О. І. Юлевич, Ю32 С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. — Миколаїв : МДАУ, 2012. — 476 с.  
**ISBN**

У навчальному посібнику подано теоретичні основи біотехнологічних процесів, що мають розвиток і використання в народному господарстві країни та поширені у світі, а також є актуальними для галузі тваринництва агропромислового виробництва. Розкрито суть основних біотехнологічних процесів, зокрема з технологій рекомбінантної ДНК, генетичної інженерії у тваринництві, клітинної інженерії, питанням ембріогенетики та клонування у тваринництві, виробництва кормових препаратів та БАР шляхом промислових біотехнологій, впровадження й значимості інженерної ензимології. В доступній для вивчення формі розглянуто питання з технологічної біоенергетики, використання генно-модифікованих організмів та загальної біобезпеки.

Посібник містить детальну інформацію і розрахований на студентів напрямку підготовки 6.090102 – «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва».

**УДК 636.22/.28:237.1.5./075/**  
**ББК 46.0**

**ISBN**

© Миколаївський державний аграрний університет, 2012  
© Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І., 2012

# ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 1. Біотехнологія як наукова дисципліна</b> .....	8
1.1. Історичні аспекти розвитку біотехнології.....	9
1.2. Предмет, мета, завдання біотехнології.....	15
1.3. Об'єкти та методи біотехнології.....	22
1.4. Перспективи розвитку біотехнології в тваринництві.....	28
Контрольні запитання.....	31
<b>РОЗДІЛ 2. Основи молекулярної біології та молекулярної генетики</b> .....	32
2.1. Будова та властивості молекули ДНК.....	36
2.2. Передача генетичної інформації. Мутації.....	43
2.3. Розшифрування генетичної інформації.....	47
2.3.1. Транскрипція.....	52
2.3.2. Трансляція.....	60
2.4. Технологія рекомбінантних ДНК.....	63
2.4.1. Ферменти генної інженерії.....	65
2.4.2. Будова рестрикційних карт.....	72
2.4.3. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК.....	74
2.4.4. Методи конструювання рекомбінантних ДНК.....	84
2.4.5. Векторні молекули.....	89
2.4.6. Введення молекул ДНК у клітини.....	103
2.4.7. Створення і скринінг геномних бібліотек.....	106
Контрольні запитання.....	112
<b>РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія в тваринництві</b> .....	114
3.1. Способи створення трансгенних тварин.....	116
3.2. Трансгенні тварини із заданими ознаками.....	135
3.3. Види трансгенних тварин.....	143
3.4. Генетична інженерія промислово важливих продуцентів.....	148
3.4.1. Одержання рекомбінантного інсуліну.....	150
3.4.2. Одержання інтерферонів.....	153
3.4.3. Біосинтез соматотропіну.....	157

3.5. Вакцинація, лікарські засоби в тваринництві.....	160
3.5.1. Вакцини, які отримані біотехнологічними методами.....	163
Контрольні запитання.....	171
<b>РОЗДІЛ 4. Клітинна інженерія.....</b>	<b>172</b>
4.1. Культивування клітин. Історія методу.....	174
4.2. Введення клітин у культуру.....	178
4.3. Характеристика клітин, що культивуються <i>in vitro</i> .....	180
4.4. Поживні середовища і умови культивування.....	185
4.5. Системи культивування клітин.....	189
4.6. Гібридизація тваринних клітин.....	196
4.7. Моноклональні антитіла.....	202
Контрольні запитання.....	210
<b>РОЗДІЛ 5. Біотехнологія в селекції і відтворенні сільськогосподарських тварин.....</b>	<b>211</b>
5.1. Трансплантація ембріонів.....	212
5.1.1. Значення трансплантації ембріонів.....	213
5.1.2. Критерії відбору корів донорів та реципієнтів ембріонів.....	214
5.1.3. Стимулювання суперовуляції.....	218
5.1.4. Синхронізація охоти у донорів і реципієнтів.....	222
5.1.5. Методи вилучення ембріонів.....	224
5.1.6. Оцінка якості ембріонів.....	228
5.1.7. Способи пересадки ембріонів реципієнтам.....	232
5.2. Зберігання ембріонів.....	237
5.3. Отримання ембріонів <i>in vitro</i> .....	244
5.4. Методи регулювання статі тварин, визначення статі ранніх ембріонів.....	256
5.4.1. Методи попереднього відбору гамет за статтю.....	260
5.4.2. Методи визначення каріотипу і відбору ембріонів за статтю.....	263
Контрольні запитання.....	268

<b>РОЗДІЛ 6. Клонування ембріонів тварин.....</b>	<b>269</b>
6.1. Історія клонування.....	271
6.2. Види клонування.....	275
6.3. Методи одержання монозиготних близнюків.....	286
6.4. Створення партеногенетичних тварин.....	299
6.5. Створення химерних тварин (генетичних мозаїків).....	310
Контрольні запитання.....	319
<b>РОЗДІЛ 7. Промислова біотехнологія.....</b>	<b>320</b>
7.1. Кормові препарати для сільськогосподарських тварин.....	320
7.1.1. Отримання кормового білка.....	322
7.1.2. Виробництво незамінних амінокислот.....	334
7.1.3. Кормові вітамінні препарати.....	340
7.1.4. Виробництво антибіотиків.....	343
7.1.5. Кормові ліпіди.....	348
7.1.6. Ферментні кормові препарати.....	350
7.2. Біотехнологічні методи консервування кормів.....	355
7.3. Біотехнологічна інтенсифікація процесів травлення в рубці жуйних.....	358
Контрольні запитання.....	361
<b>РОЗДІЛ 8. Інженерна ензимологія.....</b>	<b>362</b>
8.1. Отримання і застосування ферментів.....	362
8.2. Імобілізовані ферменти.....	369
8.2.1. Процеси на основі іммобілізованих ферментів.....	376
8.2.2. Імобілізовані ферменти в харчовій промисловості.....	378
8.3. Біотехнологія отримання молочних продуктів.....	384
8.4. Біотехнологія отримання змінених продуктів харчування.....	391
Контрольні запитання.....	396
<b>РОЗДІЛ 9. Технологічна біоенергетика.....</b>	<b>397</b>
9.1. Біометаногенез.....	398
Контрольні запитання.....	408

<b>РОЗДІЛ 10. Генно-модифіковані організми (ГМО) і біобезпека.....</b>	<b>409</b>
10.1. Методи оцінки і прогнозування впливу ГМО на організм людини і навколишнє середовище.....	418
10.2. Природа ризиків для здоров'я людини і навколишнього середовища, пов'язаних з генно-інженерними організмами.....	419
10.3. Можливі несприятливі впливи генно-інженерних організмів на здоров'я людини, методи їх оцінювання і способи запобігання.....	422
10.4. Несприятливі наслідки вивільнення ГМО в навколишнє середовище і методи їх оцінювання.....	426
10.5. Оцінка ризиків можливих несприятливих ефектів ГМО на навколишнє середовище.....	428
10.6. Державне регулювання безпеки генно-інженерної діяльності.....	430
Контрольні запитання.....	435
<b>Словник термінів.....</b>	<b>436</b>
<b>Іменний покажчик.....</b>	<b>459</b>
<b>Предметний покажчик.....</b>	<b>462</b>
<b>Використана література.....</b>	<b>472</b>

## ВСТУП

Біотехнологія – наука, що вивчає можливості використання біологічних процесів у різних галузях сільського господарства, промисловості та медицини з метою розробки методів і технологій отримання бажаних організмів та корисних речовин. Вона складається з багатьох розділів – генетична і клітинна інженерія, мікробна технологія, репродуктивна біотехнологія, інженерна ензимологія та інші. Завдяки цьому біотехнологія охоплює широке коло питань, однак, для студентів технологічних спеціальностей аграрних вищих навчальних закладів, зокрема, технології виробництва і переробки продукції тваринництва, є сенс більшу увагу приділити тим розділам, в яких розглядаються питання, що безпосередньо пов'язані з проблемами тваринництва: отримання генно-інженерних лікувальних препаратів, вакцин, імуностимуляторів, гормонів; створення трансгенних тварин із новими властивостями; отримання *in vitro* клітин і ембріонів із цілих клітин або окремих клітинних фрагментів; використання методу трансплантації ембріонів, як самостійного напрямку – біотехнології, так і з метою досліджень можливості клонування ембріонів, партеногенетичного розвитку ооцитів, формування химерних ембріонів. Крім того, доцільно розглянути використання методів біотехнології для поліпшення кормової бази сільськогосподарських тварин, у процесах переробки продукції тваринництва та утилізації відходів агропромислового комплексу.

Однак, з'ясування досягнень сучасної біотехнології неможливе без знання основ молекулярної біології, генетичної та клітинної інженерії. Тому у підручнику спочатку розглядаються загальні принципи молекулярної генетики, мікробіології, біохімії для підготовки студентів для сприйняття матеріалів наступних розділів.

# РОЗДІЛ 1

## БІОТЕХНОЛОГІЯ ЯК НАУКОВА ДИСЦИПЛІНА

Термін «біотехнологія» було запропоновано у 1917 році угорським інженером Карлом Ереки для опису великомасштабного вирощування свиней з використанням для корму цукрових буряків. За визначенням К. Ереки, біотехнологія – це «всі види робіт, коли із сировини за допомогою живих організмів вироблюються ті чи інші продукти». Однак це цілком вірне визначення не дістало поширення. Лише у 1961 році, коли шведський мікробіолог Карл Гьорен Хеден запропонував нову назву журналу «Біотехнологія і біоінженерія», і біотехнологію пов'язали з дослідженнями у галузі «промислового виробництва товарів та послуг за участю живих організмів, біологічних систем і процесів».

Біотехнологія – це наука про використання культур клітин бактерій, дріжджів, тварин або рослин, метаболізм і біосинтетичні можливості яких забезпечують утворення специфічних речовин. За визначенням Європейської біотехнологічної федерації, створеної у 1978 році, біотехнологія на основі застосування знань і методів біохімії, мікробіології, генетики і хімічної техніки використовує властивості мікроорганізмів і клітинних культур. Вона створює можливість отримання речовин і сполук, які необхідні для життя і добробуту людини, за допомогою легкодоступних ресурсів, що постійно поновлюються.

Перспективність та ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності від одержання їжі і напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв і нових матеріалів обумовлена їх компактністю й одночасно великомасштабністю, високим рівнем механізації й продуктивності праці. Ці процеси піддаються контролю, регулюванню й автоматизації. Біотехнологічні процеси, на відміну від хімічних, реалізуються в «м'яких» умовах, за нормального тиску, активної реакції й невисоких температур середовища. Ці процеси меншою мірою забруднюють навколишнє середовище відходами і побічними продуктами, мало залежать від кліматичних і погодних умов, не потребують великих земельних площ, застосування пестицидів,



гербіцидів й інших чужорідних для навколишнього середовища агентів. Тому біотехнологія в цілому та її окремі розділи визначені серед найбільш пріоритетних напрямів науково-технічного прогресу і є яскравим прикладом «високих технологій», з якими пов'язують перспективи розвитку багатьох виробництв.

Біологічні технології перебувають нині у фазі бурхливого розвитку, але цей рівень багато в чому визначається науково-технічним потенціалом країни. Всі високорозвинені держави світу відносять біотехнологію до однієї з найважливіших сучасних галузей, вважаючи її ключовим методом реконструкції промисловості відповідно до потреб часу, і вживають заходів для стимулювання її розвитку. Біотехнологічні процеси численні за своїми історичними коріннями і за своєю структурою, вони поєднують елементи фундаментальних наук, а також ряд прикладних галузей. До них відноситься хімічна технологія, машинобудування, економіка, досягнення наук біологічного циклу, що вивчають надорганізмий рівень (екологія), біологічні організми (мікробіологія, мікологія), суборганізмів структури (молекулярна біологія, генетика). Через біологію на біотехнологію впливають хімія, фізика, математика, кібернетика, механіка. Суспільні й економічні науки також мають великий вплив на розвиток біотехнології, оскільки практичні завдання, що вирішуються нею, мають соціально-економічне значення для будь-якого суспільства.

Біотехнологія як наука, що використовує біологічні принципи в практичній роботі, виникла наприкінці XIX ст., коли досягнення мікробіології почали впроваджувати в народне господарство. Але ще від зародження цивілізації людина виступала в ролі біотехнолога, використовуючи для одержання продуктів харчування результати діяльності мікроорганізмів. Проте цей процес відбувався стихійно. З історичної точки зору біотехнологія виникла тоді, коли дріжджі уперше були використані для виробництва пива, а бактерії – для виготовлення йогуртів.

## **1.1. Історичні аспекти розвитку біотехнології**

Наука формується та еволюціонує відповідно до формування і розвитку людства. Це безпосередньо стосується і біотехнології. Питання про формування біотехнології трактується неоднозначно. На

думку одних учених (Овчинников Ю.А., Баєв А.А., Скрябін Г.К.), правомірно віднести до сфери біотехнології класичні процеси бродіння, включаючи одержання спирту, силосування. На думку інших (Аїба С., Хемфрі А.Е., Милліс Н.Ф.), умовною датою появи біотехнології можна вважати присудження компанії «Мерк Кемікал Компани» премії Мак-Гро-Хілла за досягнення в області біохімічної технології в 1947 р. Також існує думка, що початок біотехнології варто віднести до 70-х років ХХ ст., з моменту зародження генетичної інженерії. Отже, правомірно віднести виникнення сучасної біотехнології, яка розпочала формуватися на базі існуючих галузей мікробіологічної промисловості, до початку 50-х років минулого століття, а весь попередній етап, що розпочався з найдавніших цивілізацій, називати передісторією формування біотехнології.

Передісторію формування біотехнології має ряд етапів. Це емпіричний, етіологічний (зародження природничих наук у XV–XVII століттях; формування мікробіологічних виробництв і початок взаємодії науки й мікробіологічних виробництв наприкінці ХІХ – 10-х роках ХХ ст., що викликало революційне перетворення мікробіологічних виробництв). Наступний – біотехнічний (створення науково-технічних передумов для виникнення сучасної біотехнології 10–50-й роки ХХ ст.), і геннотехнічний – ера новітніх біотехнологічних процесів.

**Емпіричний** (від грец. *empeirikos* – дослідний) або доісторичний період – найбільш тривалий, охоплює близько 8000 років, з яких більш ніж 6000 років – до нашої ери і біля 2000 років – наша ера. Стародавні народи того часу інтуїтивно використовували засоби і способи виготовлення хліба, пива та інших продуктів, які в наш час ми відносимо до розряду біотехнологічних.

Шумери – перші мешканці Месопотамії (на території сучасного Іраку) створили розвинену в ті часи цивілізацію. Вони випікали хліб з кислого тіста, володіли мистецтвом готувати пиво. В цьому їм наслідували асирійці і вавилоняни, які також мешкали в Месопотамії, єгиптяни і стародавні індуси. Протягом декількох тисячоліть відомим є оцет, який за давніх-давен готували в домашніх умовах, хоча про мікроби – індуктори цього процесу, світ узнав у 1868 році завдяки роботам Л. Пастера; перша дистиляція вина здійснена у ХІІ ст.; горілку з хлібних злаків виготовляли у ХVІ ст.; шампанське відоме з ХVІІІ ст. До того ж емпіричного періоду

належить: одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів, квашення луб'яноволоконних рослин.

З найдавніших часів людство стикалося з негативними наслідками діяльності мікроорганізмів (псування продуктів, інфекційні хвороби людей і домашньої худоби). На перших етапах це були неусвідомлені, емпіричні спроби розробки методів і засобів боротьби з цими явищами. Так стали виникати методи консервування продуктів.

Таким чином, народи з давніх-давен користувалися на практиці мікробіологічними процесами, нічого не знаючи про мікроби. Емпіризм також був характерний і в практиці застосування корисних рослин і тварин.

Другий, **етиологічний** (від грец. *aitia* – причина) період формування біотехнології розпочався у другій половині XV ст. із розвитку сучасного природознавства. На становлення біології істотний вплив мали успіхи в хімії, яка із описової в цей період перетворюється на аналітичну. Відбулися зрушення у вивченні сутності процесів бродіння; виник термін ферментація, а процес бродіння стали пов'язувати з наявністю в середовищі дріжджів або ферментів. У XVI–XVII століттях спочатку в Франції, а потім повсюдно для розпушення тіста стали використовувати пивні дріжджі; пізніше зі зміною й удосконалюванням технології пивоваріння для цих цілей почали застосовувати дріжджі спиртового виробництва. У другій половині XVIII ст. було доведено здатність однієї речовини розкладати інші. Це стало початком експериментального вивчення унікальної здатності ферментів до каталізу специфічних хімічних реакцій.

Таким чином, розвиток описової мікробіології й вивчення хімічних перетворень стали важливою передумовою для становлення мікробіології й біохімії. В XIX ст. з розвитком хімічних наук було закладено основи органічної хімії. У цей період відкрили багато органічних кислот, гліцерин, холестерин, глюкозу, перші амінокислоти, здійснили синтез сечовини. Для зародження ензимології велике значення мало вивчення процесу гідролізу полісахаридів. Значний вплив на створення наукових основ мікробіологічних виробництв мали роботи Луї Пастера, який на прохання уряду Франції досліджував причини порушення технологічних процесів на виробництвах. Працюючи в галузі

прикладної мікробіології, Л. Пастер зробив ряд найбільших фундаментальних відкриттів, що заклали основи сучасної технічної мікробіології. Л. Пастер довів, що хвороби, псування продуктів, бродіння й гниття викликаються мікроорганізмами, і створив теорію про екзогенність потрапляння цих організмів у середовище. Цим було доведено неспроможність існуючої на той час теорії самозародження мікроорганізмів. Роботи Л. Пастера заклали наукові основи виноробства, пивоварства, виробництва спирту й оцту, боротьби з інфекційними хворобами. Великим досягненням даного періоду була розробка методу чистих культур, а також удосконалення середовищ для виділення й вирощування мікроорганізмів. Чисті культури стали застосовувати в сформованих мікробіологічних виробництвах.

Велике значення мали роботи з вивчення мікробного антагонізму й застосуванню його в медицині. І.І. Мечниковим було створено вчення про антагонізм мікробів і науково-обґрунтовані рекомендації для азотфіксації. Тоді ж блискучими роботами С.М. Виноградського, В.Л. Омелянського, Г.А. Надсона, Б.Л. Ісаченка було закладено основи геологічної мікробіології; розпочато вивчення ролі мікроорганізмів у перетвореннях сірки, заліза, кальцію. Почали закладатися наукові основи біологічної обробки й знешкодження стоків.

Очисні споруди, відомі із часів Стародавньої Індії та Римської імперії, прийшли в занепад у середні століття. З бурхливим розвитком промисловості на рубежі ХІХ–ХХ століть вони знов стали предметом пильних досліджень. У цей період почала закладатися ензимологія. Для вивчення й застосування ферментів необхідно було розробити спеціальні «м'які» методи виділення й очищення. Розпочалося практичне застосування ферментних препаратів для підсолодження ряду речовин, з'явилися препарати для дубиння шкір.

У 70–80-х роках ХІХ ст. було закладено основи культивування рослинних клітин і тваринних тканин. Після робіт Т. Шванна й Р. Вирхова, які назвали клітину елементарним організмом, виник інтерес до вивчення живих клітин, і розпочалися експерименти по збереженню життєздатності клітин і шматочків тканин у специфічних умовах і середовищах. У 1865 р. Г.І. Мендель доповів Спільці дослідників природи свої спостереження про закономірності передачі спадкоємних ознак. На початку ХХ ст. було уведено терміни «мутації», «ген», виникла гіпотеза Сеттона-Бовері про те, що хромосоми є матеріальними носіями спадкоємних ознак. Російський

цитолог С.Г. Навашин розкрив особливості структури хромосом і заклав основи хромосомної теорії спадковості. Таким чином, у даний період впровадження наукових знань стало можливим розроблення науково-обґрунтованих біотехнологій багатьох виробничих процесів.

Третій період в розвитку біотехнології – *біотехнічний*, останній період ери передісторії сучасних біотехнологій (10–50-ті роки ХХ ст.) умовно можна розділити на два етапи. На початку першого етапу, в основному, відбувалося вдосконалення технології існуючих виробництв, а потім, завдяки успіхам у мікробіології, біохімії й інших науках того періоду, внаслідок принципових удосконалень апаратури і технологій виникла основа для організації нових виробництв. У цей період почали випускати нові екологічно чисті біодобрива і біологічні препарати для боротьби зі шкідниками та хворобами сільськогосподарських рослин, створилися виробництва ряду цільових продуктів (органічних розчинників, спиртів), розпочалися промислові випробування біотехнологічних процесів переробки та використання рослинних відходів.

Другий етап даного періоду тісно пов'язаний із біотехнологічними методами одержання ряду складних речовин – антибіотиків, ферментів, вітамінів. Революційним моментом даного періоду була промислова реалізація технології виробництва антибіотиків. Відправною точкою при цьому стало відкриття О. Флемінгом, Х. Флорі й Е. Чейном хіміотерапевтичної дії пеніциліну. Практично одночасно в Радянському Союзі З.В. Єрмольєва, вивчаючи дію лізоциму, показала, що він є чинником природного імунітету. Після другої світової війни в ході інтенсивного розвитку промислових біотехнологій було організовано виробництво амінокислот, білка одноклітинних, перетворення стероїдів, освоєно культивування клітин тварин і рослин. Інтактні клітини мікроорганізмів почали широко використовувати для одержання лікарських речовин стероїдної природи, були організовані масштабні виробництва вакцин.

Накопичені наукові факти стали спонукальним мотивом для розробки способів великомасштабного культивування клітин різного походження. Це було необхідно для одержання клітинних продуктів і самих клітин для потреб людини, і, насамперед, як лікувальних або профілактичних засоби: пеніциліну, стрептоміцину, тетрациклінів, декстрину, ряду амінокислот і багатьох інших речовин. До 1950 р. Ж. Моно (Франція) розробив теоретичні основи безперервного

керованого культивування мікробів.

У 50-ті роки після успішного використання вірусу поліомієліту для одержання вакцини, що був вирощений в культурі клітин ссавців, лінії культур клітин людини стали незамінними для виділення і культивування ряду інших вірусів, виробництва антитіл, інтерферону, протипухлинних хіміопрепаратів. Приблизно за 40 років третього періоду було вирішено основні завдання конструювання, створення і впровадження в практику необхідного обладнання, у тому числі головного з них – біореакторів. Це обладнання використовують і в наш час.

Четвертий період в біотехнології – *геннотехнічний* (від грец. *genesis* – походження, виникнення, народження) – ера новітніх біотехнологічних процесів, що розвивається протягом останніх 35–40 років, пов'язана з використанням іммобілізованих ферментів і клітинних органел, а також заснована на методах рекомбінантних ДНК. Наприкінці 60-х років іммобілізовані ферменти і клітини стали успішно застосовуватися не тільки для виробництва напівсинтетичних препаратів, а й для проведення нескладних біохімічних аналізів.

Бурхливо розвиваються в цей час генетична й клітинна інженерія, це сприяє тому, що біотехнологія поступово охоплює все нові й нові галузі виробництва, які рішуче впроваджуються в багатьох сферах діяльності людини.

Виникнення генетичної інженерії умовно відносять до 1972 року, коли в США П. Бергом була створена перша рекомбінантна молекула ДНК. Однак, необхідно зазначити, що без фундаментальної роботи Ф. Крика і Дж. Уотсона (1953 р.) щодо встановлення структури ДНК було б неможливо досягнути сучасних результатів у галузі біотехнології. З'ясування механізмів функціонування і регулювання ДНК, виділення і дослідження специфічних ферментів створили умови для формування чіткого наукового підходу до розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт. У цьому полягає сутність геннотехнічного періоду. Із середини 70-х років даною проблемою інтенсивно займаються тисячі наукових колективів і промислових компаній у всіх країнах світу. Поєднання слів «генетика» і «інженерія» свідчить про те, що настав час, коли можливим є конструювання рекомбінантних ДНК і цілеспрямоване створювання штучних генетичних програм. Знання будови апарату спадковості різних організмів дозволили маніпулювати не тільки

нуклеїновими кислотами, а й цілими хромосомами (хромосомна інженерія) і клітинами (клітинна інженерія). Для геннотехнічного періоду властивим є розробка інтенсивних процесів на основі спрямованих фундаментальних досліджень (з продуцентами антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів), одержання суперпродуцентів, створення незвичайних організмів, які ніколи не існували раніше у природі, розробка і впровадження екологічно чистих і безвідходних технологій, а також автоматизація і комп'ютеризація біотехнологічних процесів.

Впровадження новітніх методів біотехнології наразі сприяють перевороту у різних напрямках біотехнології. Ці методи дозволяють інтенсифікувати екологічно чисті біотехнології відтворення їжі та кормових препаратів, вирішувати завдання забезпечення людства матеріальними і енергетичними ресурсами, а також природоохоронні проблеми. Всі ці досягнення поставили біотехнологію на новий рівень, що якісно відрізняється від попереднього можливістю свідомо керувати клітинними процесами.

## **1.2. Предмет, мета та завдання біотехнології**

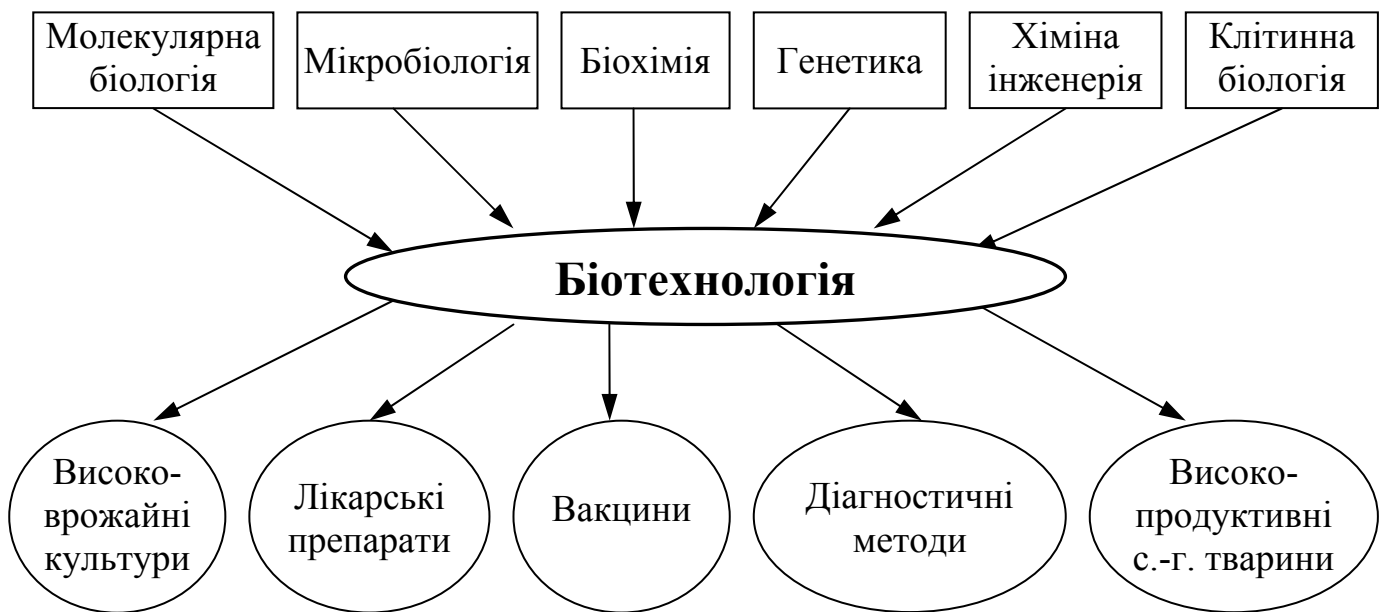
*Сучасне визначення **біотехнології** – це промислове використання біологічних процесів і агентів для одержання високоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослин та тварин із заданими властивостями.*

Біотехнологія – міждисциплінарна галузь науково-технічного прогресу. Вона досить гетерогенна за своєю теоретичною основою, оскільки досліджує не який-небудь клас об'єктів, а вирішує певне коло комплексних проблем. Питання, до вирішення яких залучають біотехнологічні розробки, досить різноманітні. Однак більшість з них прямо чи опосередковано пов'язані з глобальними проблемами, що стоять перед сучасною цивілізацією. До них відноситься забруднення навколишнього середовища, загроза екологічної кризи, виснаження запасів корисних копалин (у першу чергу джерел енергії), загроза світової енергетичної кризи, нестача продовольства.

Слова «біологія» і «біотехнологія» розрізняються лише тим, що в слові «біотехнологія» є вставка «техно». І біологія і біотехнологія стосуються живих об'єктів, але підходи до них різні. Біотехнолог досліджує живе не з чисто пізнавальним інтересом, він прагне

«примусити» працювати живі об'єкти, виробляти необхідні для людини продукти. «Навіщо брати на себе труд виготовлення хімічних сполук, якщо мікроб може зробити це за нас?», – говорив Дж.Б.С. Холдейн ще у 1929 році, передбачаючи розквіт біотехнології. У наш час відкриваються широкі перспективи і можливості для використання нових наукових досліджень та розробок на благо людини і суспільства.

Біотехнологія використовує досягнення багатьох галузей науки та створює широкий асортимент продуктів і методів (рис. 1).



**Рис. 1. Взаємозв'язок біотехнології з різними галузями науки та виробництва**

Основними цілями біотехнології можна вважати такі:

- можливість точної діагностики, профілактики та лікування інфекційних і генетичних захворювань;
- створення мікроорганізмів, що продукують різні хімічні сполуки, антибіотики, полімери, амінокислоти, ферменти;
- створення порід сільськогосподарських та інших тварин, спадкові властивості яких поліпшено;
- значне збільшення врожайності сільськогосподарських культур шляхом створення рослин стійких до шкідників, грибкових та вірусних інфекцій і шкідливого впливу навколишнього середовища;
- переробка викидів, що забруднюють навколишнє середовище.



Залежно від призначення та методів, що використовуються, розрізняють такі розділи біотехнології (табл. 1).

Таблиця 1

**Розділи біотехнології**

Розділ	Призначення	Матеріал, методи, обладнання	Метод перенесення генетичної інформації	Галузі виробництва, продукти
1	2	3	4	5
<b>Мікробна технологія</b>	Мікро-біологічний синтез продуктів, придатних для виробництва біомаси, утилізація різних речовин та матеріалів – нафти, вугілля, металу, целюлози, пластмаси	Клітини мікроорганізмів, відходи	Ріст і розмноження мікробних клітин	Виробництво антибіотиків, кормового білка, ферментів, амінокислот, дріжджів
<b>Клітинна інженерія</b>	Гібридизація соматичних клітин, перенесення ядер клітин, об'єднання ембріонів	Методи культури та гібридизації соматичних тканин	Гібридизація соматичних клітин, перенесення ядер клітин	Одержання гібридів для виробництва моноклональних антитіл, соматична гібридизація
<b>Генна (молекулярна) інженерія</b>	Конструювання біохімічними методами молекул ДНК, ізоляція та синтез генів, перенесення генів у клітину	Ферменти рестриктази, лігази, зворотної транскриптази	Рекомбінація, трансформація, трансдукція, трансгенез, клонування генів	Синтез чужорідного білка в клітині, одержання гормонів, лікарських препаратів

Продовження таблиці 1

<b>Геномна (хромосомна) інженерія</b>	Зміна кількості хромосом у геномі, створення нових ліній, форм, синтез штучних хромосом	Гібридологічний аналіз, прямі та зворотні схрещування, одержання поліплоїдів	Генетичні, цитологічні методи заміщення хромосом та збільшення їх кількості	Виділення окремих хромосом, віддалене схрещування, одержання транслокацій та делецій
<b>Ембріональна інженерія</b>	Вирощування організмів <i>in vitro</i> , одержання клонів високопродуктивних організмів, створення особин з новими властивостями, розмноження вихідного селекційного матеріалу	Пересадка органів і тканин, трансплантація ембріонів, створення гібридів	Хірургічні методи, культура тканин, методи кріоконсервації	Одержання тварин-трансплантантів з метою формування високопродуктивних стад
<b>Інженерна ензимологія</b>	Синтез і модифікація органічних сполук, біоконверсія рослинної сировини, використання іммобілізованих ферментів	Штами мікроорганізмів, ферменти імуноферментний аналіз	Методи іммобілізації ферментів, створення нових штамів	Переробка молока та м'яса, відходів харчової промисловості, створення нових джерел енергії

При цьому необхідно вирішити такі завдання:

1. Підтримка і активація шляхів обміну клітин, які сприяють накопиченню цільових продуктів за рахунок суттєвого пригнічення інших реакцій обміну в організмі, що культивується.

2. Отримання клітин, або їх складових (переважно ферментів) для спрямованої зміни складних молекул (наприклад, рестриктази, ізомерази та ін.).
3. Поглиблення і вдосконалення технології рекомбінантних ДНК і клітинної інженерії з метою отримання найцінніших результатів фундаментальних і прикладних розробок.
4. Створення безвідходних і екологічно безпечних біотехнологічних процесів.
5. Вдосконалення і оптимізація апаратурного оформлення біотехнологічних процесів для одержання максимальної кількості кінцевих продуктів за культивування природних видів, у яких спадковість змінена методами клітинної і генної інженерії.
6. Підвищення техніко-економічних показників біотехнологічних процесів порівняно з існуючими.

Досягнення у біотехнології забезпечують вирішення комплексних проблем народного господарства, охорони здоров'я і науки. Тому *новітню біотехнологію можна визначити як науку про генно-інженерні та клітинні методи й технології створення і використання генетично трансформованих біологічних об'єктів для інтенсифікації виробництва або одержання нових продуктів різного призначення.*

**Біотехнологія і медицина.** За допомогою біотехнології для потреб медицини виробляються такі препарати:

- *антибіотики* – специфічні продукти життєдіяльності, що володіють високою фізіологічною активністю відносно певних груп мікроорганізмів і до злоякісних пухлин, вибірково затримують їх ріст або повністю пригнічують розвиток. Постійний пошук нових антибіотиків пов'язаний із токсичністю існуючих препаратів; алергічними реакціями, що викликані їх використанням; зростанням стійкості патогенних мікроорганізмів до препаратів, що застосовуються;
- *гормони*, які використовують з метою лікування таких хвороб, як карликовість (гормон росту соматотропін), цукровий діабет (інсулін), безпліддя (фолікулостимулюючий і лютенізуючий гормони), олігопептидні гормони нервової системи, що знімають больові відчуття, підвищують працездатність, концентрують увагу, поліпшують пам'ять, стероїдні гормони наднирників (кортизон) для лікування ревматоїдних артритів;

- *інтерферони і інтерлейкіни* – речовини, що виділяються клітинами людини і тварини у відповідь на інфікування вірусами;
- фактори зсідання крові, особливо фактор VIII (отримують за допомогою культивування клітин ссавців) і фактор IX (отримують генно-інженерним шляхом з використання штаму *E. coli*), необхідні для терапії форми гемофілії – спадкової хвороби, за якої кров втрачає здатність зсідатися;
- *моноклональні антитіла* – продукти В-гібридомних клітин – використовують для діагностики різноманітних хвороб. Завдяки високій специфічності вони забезпечують ідентифікацію не лише виду збудника, а і його серотипу. Вони дозволяють діагностувати вагітність, виявляти схильність до діабету, ідентифікувати спадкові хвороби, їх використовують для діагностики раку і визначення його форм. Крім того, моноклональні антитіла мають і лікувальне значення, перш за все для лікування раку. Моноклональні антитіла зв'язуються із токсичними для ракових клітин сполуками і, завдяки своїй високій специфічності, вони доставляють отруту точно за адресою, не викликаючи руйнування і пошкодження здорових клітин;
- *рекомбінантні вакцини і вакцини-антигени*. Вакцинація – один із способів боротьби з інфекційними захворюваннями. Для отримання рекомбінантних вакцин звичайно використовують вірус коров'ячої віспи (вірус вісповакцини ВВВ). У його ДНК вводять чужорідні гени, що кодують імуногенні білки різних збудників (вірусу грипу, герпесу, гепатиту В й ін.) і отримують вакцини проти певних інфекцій. Вакцини-антигени створюють шляхом клонування генів збудника хвороби у *E. coli*, дріжджів, клітин комах і тварин;
- *ферменти медичного призначення*. Різноманітне використання ферментних препаратів у медицині. Їх застосовують для розчинення тромбів, лікування спадкових хвороб, видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних фрагментів, звільнення організму від токсичних речовин. У сучасній медицині відомо, що протеїнази розщеплюють денатурований білок і сприяють очищенню ран та їх загоюванню. Як носії для іммобілізації протеолітичних ферментів використовують волоконні матеріали на основі

целюлози, полівінілового спирту, поліамідне і колагенове волокно. Готують нитки, в які за формування вводять фермент, і використовують їх як шовний матеріал. Аналіз свідчить, що використання цих препаратів удвічі прискорює процес загоювання ран. Імобілізовані протеолітичні ферменти з великим успіхом застосовують при лікуванні гнійних захворювань легень і плеври, трофічних виразок, променевиких виразок шкіри.

**Біотехнологія і харчова промисловість.** Усе більшого значення набувають низькокалорійні, нешкідливі для хворих на цукровий діабет замінники сахарози, в першу чергу фруктоза – продукт перетворення глюкози за участю імобілізованої глюкозоізомерази. В деяких продуктах застосовують гліцин, що надає у комбінації з аспарагіною кислотою різні відтінки солодкого і кислого. За допомогою ферментів у харчовій промисловості освітлюють фруктові соки, виробляють безлактозне молоко, розм'якшують м'ясо. Значні можливості щодо підвищення поживної цінності надає додавання до продуктів харчування вітамінів і амінокислот.

**Біогеотехнологія.** Досягнення у біотехнології використовуються за видобутку, збагачення і переробки руд, для відокремлення і концентрування металів із стічних вод як вторинної сировини, екстракції залишкових порцій нафти з родовищ, що висихають. Значну роль у цих процесах відіграють мікроорганізми, що здатні існувати у надрах землі і здійснювати там хімічні перетворення. Здатністю перетворювати метали на розчинні сполуки володіють різні бактерії. Технології подібних процесів дуже прості: для вилучення залишків міді, урану, нікелю з «пустих» порід гірничорудного виробництва, їх обливають водою і збирають продукти життєдіяльності мікроорганізмів, що витікають – розчинні сполуки. Метод бактеріального вилучення дозволяє розглядати розробку бідних родовищ як економічно корисне виробництво.

Генно-інженерні штами псевдомонад, що здатні утилізувати сиру нафту, мають не менше двох сфер застосування: отримання білкової біомаси на основі необробленої нафти і запобігання нафтовому забрудненню навколишнього середовища, наприклад, усунення нафтових плівок на поверхні води морів і океанів.

**Біотехнологія і енергетика.** Технологічна біоенергетика – один із напрямів біотехнології, який пов'язаний з ефективним

використанням енергії, що запасасться при фотосинтезі. Це може бути досягнуто наступними чином:

- перетворення рослинної біомаси на етанол, що є екологічно чистим паливом, оскільки за його згоряння утворюються  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- отримання метану та інших вуглеводнів – важливий шлях утилізації сільськогосподарських викидів. Метан утворюється у вигляді біогазу – суміші метану і  $\text{CO}_2$ . Процес метаноутворення є високоефективним: до 90...95% вуглеводню, що використовується, перетворюється на метан. Тому метаногенні асоціації використовують для очищення стічних вод від органічних забруднень із одночасним одержанням палива;
- одержання водню як палива майбутнього залишається поки що на рівні пошукових розробок. Це абсолютно чисте паливо, за згоряння якого створюється лише  $\text{H}_2\text{O}$ . Хімічний і електрохімічний способи отримання водню неекономічні, тому дуже цікаво використовувати мікроорганізми, що виділяють водень.

### 1.3. Об'єкти і методи біотехнології

Об'єктами біотехнології є віруси, бактерії, гриби, клітини (тканини) рослин, тварин і людини, деякі біогенні та функціонально подібні до них речовини (наприклад, ферменти, простагландини, нуклеїнові кислоти та ін.). Отже, об'єкти біотехнології можуть бути як організованими часточками (віруси), так й клітинами (тканинами) або їх метаболітами (первинними, вторинними). Навіть за використання біомолекули, як об'єкта біотехнології, початковий біосинтез її відбувається здебільшого відповідними клітинами.

У наш час більшість об'єктів біотехнології становлять мікроби (рис. 2), що належать трьом надцарствам (без'ядерні, перед'ядерні, ядерні) і п'яти царствам (віруси, бактерії, гриби, рослини і тварини). Причому перші два надцарства складаються виключено з мікробів, у той час як третє – переважно з рослин і тварин.

Незважаючи на те, що представники всіх надцарств містять генетичний матеріал, різні акаріоти позбавлені якогось одного типу нуклеїнової кислоти РНК або ДНК. Вони не здатні функціонувати (в тому числі *реплікуватися*, тобто самовідтворюватися) поза межами

живої клітини і тому правомірно називати їх без'ядерними.

<b>Надцарства</b>		
Без'ядерні ( <i>Acaryotae</i> )	Перед'ядерні ( <i>Procaryote</i> )	Ядерні ( <i>Eucaryote</i> )
<b>Царства</b>		
Віруси ( <i>Vira</i> )	Бактерії ( <i>Bacteria</i> )	Гриби ( <i>Mycota</i> )
		Рослини ( <i>Plantae</i> )
		Тварини ( <i>Animalia</i> )
<b>Морфологічна елементарна одиниця</b>		
Неклітинна, організована часточка	Клітина	Клітина
<b>Тип нуклеїнової кислоти (ДНК і РНК), що міститься</b>		
ДНК або РНК (ніколи не бувають разом)	ДНК і РНК	ДНК і РНК

Рис. 2. Об'єкти біотехнології (за Єліновим Н.П., 1995)

Бактерії мають клітинну організацію і в них існують нуклеїнові кислоти обох типів – РНК і ДНК, з яких ДНК представлена у вигляді поодинокі (кільцеподібної) хромосоми. Більшість із них розмножується на поживних середовищах (поза організмом), якщо серед бактерій є безумовні (*облігатні*) паразити, що наближаються за даною ознакою до вірусів (хламідії, спіроплазми, рикетсії), то їх паразитизм відрізняється власним механізмом – його можна назвати *клітинним*, у той час як паразитизм вірусів розвивається на *генетичному рівні*. Таким чином, бактерії – це організми, що складаються з функціонально пов'язаних структур, у тому числі, генетичних. Незважаючи на те, що генетичні структури бактеріальної клітини функціонують повноцінно, вони не згруповані у формі відокремленого ядра, і тому бактерії віднесені до перед'ядерних (прокаріотичних) організмів.

Клітини грибів, рослин і тварин містять дійсне, відокремлене від цитоплазми, ядро і тому їх відносять до еукаріот.

**Віруси.** Серед мікробів віруси характеризуються найменшими розмірами і облігатним паразитизмом. Остання властивість покладена

в основу класифікації їх на віруси бактерій (бактеріофаги або просто фаги), віруси рослин і віруси тварин. Структурно віруси – це організовані часточки, що містять лише один тип нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), не володіють власним обміном речовин, але здатні до реплікації в клітинах організму-господаря або інтеграції з його геномом.

Поза організмом вірус існує у вигляді **віріону** – структурного утворення, що складається з нуклеїнової кислоти і білка, які не пов'язані між собою ковалентними зв'язками. Білок, що є навколо вірусної нуклеїнової кислоти у вигляді оболонки, називається **капсидом**. Форма віріону визначається його капсидом.

Нуклеїнові кислоти – речовини спадковості вірусів. За типом нуклеїнової кислоти розрізняють ДНК-вмісні віруси, до яких належать віруси віспи, герпесу, більшість вірусів бактерій і РНК-вмісні віруси (*ретровіруси*), до яких належать віруси рослин, грипу людини, сказу, поліомієліту, СНІДу та ін.

**Бактерії** – істоти клітинної організації, в яких ядерний матеріал не відокремлений від цитоплазми елементарними мембранами. Більшість бактерій одноклітинна, найменший діаметр їх 0,2...10,0 мкм.

Усі бактерії становлять єдине царство *Bacteria*, хоча одні з них – археобактерії (*Archaeobacteria*) суттєво відрізняються від інших, еубактерій (*Eubacteria*) (від грец. *eu* – добрий). Очевидно, археобактерії є більш стародавніми представниками прокариот ніж еубактерії. Вони існують у середовищах з екстремальними умовами – високі концентрації неорганічних солей, підвищена температура, оксид та двооксид вуглецю – як єдине джерело вуглецю. До археобактерій належать метаногенні бактерії, які є анаеробними мікроорганізмами, що існують у відстійниках стічних вод населених пунктів, у гною, в рубці жуйних.

Стосовно здатності мікроорганізмів споживати живий білок *in vitro* або *in vivo* використовують термін **патогенність** (від грец. *pathos* – хвороба, *genesis* – виникнення, походження), тобто здатність викликати захворювання. Тому всі бактерії за патогенністю поділяються на дві великі групи – сапрофітні (нехвороботворні, від лат. *saprotetes* – гниття, гниль) і патогенні (хвороботворні). Між ними існують проміжні види – облігатні і факультативні паразити (від лат. *obligatus* – обов'язковий, безумовний, *facultativus* – факультативний, можливий у певних умовах). Відповідно, облігатні, або безумовні



паразити, не розвиваються поза організмом чи важко розвиваються на поживних середовищах із природними білками. Факультативні паразити ростуть і розвиваються у зовнішньому середовищі, але за певних умов (наприклад, при зниженні захисних сил макроорганізму) вони можуть стати причиною інфекційного захворювання.

**Гриби.** До царства нижчих еукаріот *Mycota* належать мікроміцети, тобто мікроскопічні гриби (наприклад, дріжджі, пеніцили, аспергили та ін.) і макроміцети, які формують у процесі росту і розвитку плодові тіла, що спостерігаються візуально.

Слід зазначити, що гриби схожі як з рослинами (апикальний, верхівковий від лат. *apicis* – верхівка, маківка, ріст, міцна клітинна стінка, наявність вакуолей і поперечних перетинків у багатьох з них), так і з тваринами (гетеротрофний тип живлення, потреба у вітамінах, наявність хітину або хітозану, синтез глікогену). Тобто гриби еволюційно виникли раніше, до розходження рослин і тварин у самотійні царства. Але лише для грибів властива міцеліальна будова і абсорбційний спосіб живлення як наслідок такої будови (*осмотрфія*). Грибам властиві також явища *дикаріозису* (окреме існування двох ядер в одній клітині, здатних до одночасного подвоєння та імітування диплоїдного ядра) і *гетерокаріозису* (існування різнорідних ядер в одній клітині).

**Рослини.** Царство рослин включає підцарства багряннок (*Rhodophyta*), водоростей (*Phycophyta*) і вищих рослин (*Embryophyta*). У перших двох відсутня диференціація тіла на органи і тканини – вони є листатими та існують головним чином у воді. Тіло вищих рослин поділено на органи і тканини. У наш час нараховують сотні тисяч видів рослин, багато з яких використовують у різних галузях народного господарства.

Для рослин характерні: здатність до фотосинтезу, наявність целюлози, біосинтез крохмалю. Для соматичних клітин рослин властива **тотипотентність**, тобто спроможність повністю реалізувати свій потенціал розвитку аж до створення цілої рослини.

Будь-який вид рослин здатний у відповідних умовах створити неорганізовану масу клітин, що подвоюються – *калюс* (від лат. *callus* – мозоль), особливо під впливом рослинних гормонів. Масове виробництво калюсів з подальшою регенерацією пагонів придатне для великомасштабного виробництва рослин. Загалом калюс являє собою основний тип рослинної клітини, що культивується на поживному середовищі. Калюсна тканина з будь-якої рослини може

рекультивуватися тривалий час.

Важливими біооб'єктами є також *протопласти* (клітини бактерій, грибів, рослин, що позбавлені клітинної оболонки) рослинних клітин.

**Клітини тварин.** Висока диференціація та спеціалізація еукаріотичних клітин тварин пояснюють ті труднощі, з якими доводиться стикатися дослідникам і працівникам, що мають справу з подібним матеріалом.

На початку ХХ ст. Р. Гаррісон і А. Каррель установили факт можливого культивування клітин тварин *in vitro*, тобто вони довели здатність тваринних клітин до незалежного життя в поживному середовищі поза живого організму. З урахуванням усіх особливостей тваринних клітин (на відміну, наприклад, від рослинних і бактеріальних) інколи неможливо відмовитися від них, щоб уникнути якихось надзвичайних утруднень, тому що тільки з їх допомогою можливо отримати певний особливий продукт (речовину). Наприклад, моноклональні антитіла, одержання трансгенних тварин і т.ін.

Для реалізації біотехнологічних процесів важливими **параметрами біооб'єктів** є: чистота, швидкість розмноження клітин і репродукції вірусних часток, активність і стабільність біомолекул або біосистем. Варто мати на увазі, що за створення сприятливих умов для обраного біооб'єкта біотехнології такі ж умови можуть бути сприятливими, наприклад, і для мікробів або забруднювачів. Це віруси, бактерії й гриби, що знаходяться у культурах рослинних або тваринних клітин. За таких умов мікроби є шкідниками виробництва у біотехнології.

Швидкості розмноження клітин і репродукції вірусних часток прямо пропорційно позначаються на зростанні клітинної маси та утворенні метаболітів. У цьому разі переважна більшість мікроорганізмів вигідно відрізняється від клітин рослин і тварин.

Активність і стабільність в активному стані біооб'єктів – одні з найважливіших показників їх придатності для тривалого використання в біотехнології. Таким чином, незалежно від систематичного положення біооб'єкта на практиці використовують або природні організовані часточки (фаги, віруси) і клітини із природною генетичною інформацією, або клітини зі штучно заданою генетичною інформацією, тобто в будь-якому разі використовують клітини мікроорганізмів, рослин, тварин або людини.

Біотехнології властиві свої *специфічні методи* – це великомасштабне глибинне культивування біооб'єктів у періодичному, напівбезперервному або безперервному режимі; вирощування клітин рослинних і тваринних тканин в особливих умовах. Біотехнологічні методи культивування біооб'єктів за допомогою спеціального обладнання, – це, наприклад, ферментери для вирощування бактерій та грибів для одержання антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів. У подібних ферментерах вирощують деякі клітини людини (бласти) для одержання білка інтерферону. Рослинні клітини частіше вирощують у стаціонарних умовах на середовищі з ущільненою (наприклад, агаризованою) підкладкою в скляних або поліетиленових ємностях, хоча деякі види рослинних клітин можна культивувати в спеціальних ферментерах.

У скляних ролерах культивують і більшість тваринних клітин або, наприклад, у курячих ембріонах. Інші методи, що використовуються в біотехнології, є загальними. До них відносяться методи мікробіології, біохімії, біоінженерії, органічної хімії та інших наук.

Проте, варто особливо виділити методи клітинної та генної інженерії, коли в експериментальних умовах вдається створювати клітини зі заздалегідь відомими властивостями. Так, здійснено соматичну гібридизацію клітин картоплі й томату (гібрид названий «помато»), перенесення генетичної інформації про синтез людського або тваринного гормону інсуліну в бактеріальні клітини (кишкової палички), здатних потім продукувати поліпептидні ланцюги інсуліну. Ці генно-інженерні методи покладені в основу сучасної біотехнології. Однак, навіть у разі реалізації генно-інженерних розробок змінена спадкоємна інформація на рівні молекул інкорпорується потім у клітинах, з якими доводиться мати справу в біотехнологічному процесі. Із цього можна вивести уявлення про рівні біотехнології: клітинний та молекулярний. У першому випадку справу мають із клітинами, наприклад, актиноміцетів – за одержання антибіотиків, мікроміцетів – за одержання лимонної кислоти, тварин – за виготовлення вірусних вакцин, людини – за виготовлення інтерферону. У другому випадку справу мають із молекулами, наприклад, з нуклеїновими кислотами. Це так звана «рекомбінантна ДНК-біотехнологія» (рДНК-біотехнологія), що базується на генній інженерії або на використанні окремих ферментів (ферментних

систем), наприклад, протеаз – для виготовлення мийних засобів, ліпаз – для модифікації смаку молочних продуктів і т.ін. Однак, необхідно пам'ятати, що на початковій або кінцевій стадії молекулярний рівень трансформується в клітинний. Так, ферменти продукуються клітинами, а за генно-інженерних розробок реципієнтом нової генетичної інформації стає, також, клітина.

#### **1.4. Перспективи розвитку біотехнології в тваринництві**

Нині завдяки успіхам у фундаментальних науках виникла можливість розвитку принципово нових ефективних методів впливу на організм тварин та їх спадковість.

Головні розділи біотехнології у тваринництві – генетична та клітинна інженерія. Методи генетичної інженерії, що найбільш детально розроблені на мікроорганізмах, забезпечують можливість спрямованої зміни їх генотипу. На відміну від спонтанних мутацій ці зміни можна заздалегідь планувати. Так, у мікроорганізми зовсім виразно вбудовують гени, що відповідають за синтез інтерферону, соматотропіну, деяких незамінних амінокислот. Можливості подальшого розвитку цього напрямку величезні. Ведуться дослідження і розробки з виділення та клонування певних генів, їх вбудовування в геном. Якщо генетична інженерія в мікробіології стала реальністю та набуває більш практичного значення, то для тварин застосування цих методів тільки починається. Однак встановлено, що можливо виділити певні гени з генома тварин і вбудувати їх у геном іншої особини. Виникає перспективне завдання – використати свійських тварин як живих реакторів, ферментерів для виробництва найцінніших біологічно активних речовин.

Однак, існуючі методи введення в геном тварин чужорідного генетичного матеріалу ще недостатньо досконалі і ступінь імовірності вбудовування цих генів і їх експресії невеликий та обчислюється декількома відсотками. Тому особливе значення для розвитку генно-інженерних робіт у тваринництві набуває відпрацювання методів вилучення з яєчників, культивування і запліднення дозрілих ооцитів *in vitro* з наступним їх розвитком та трансплантацією самкам. Поєднання цих двох методів створює

оптимальні умови для широкого впровадження генної інженерії в практику селекційно-племінної роботи у тваринництві. Ймовірно, що у найближчій перспективі методами генетичної інженерії будуть створені нові форми сільськогосподарських тварин.

Розширення можливостей генної інженерії пов'язано із відкриттями в процесах регулювання дії генів. Мікрохірургія на яйцеклітинах та ембріонах і рекомбінація ДНК у принципі надають можливість більш інтенсивної селекції тварин. Сполучення генетичного маніпулювання із уже широко розповсюдженими методами тривалого зберігання сперми та ембріонів дає селекціонеру небачені можливості значно ефективнішої селекції.

Разом із тим, у цієї системи, що ґрунтується на методах генетики популяцій, є обмеження через пошук бугаїв-поліпшувачів на підставі оцінки за їх нащадками серед великої кількості тварин.

Поряд із розвитком методів генетичної інженерії у тваринництві перспективними є способи клітинної інженерії.

Уже накопичено великий досвід культивування соматичних клітин тварин *in vitro*, розроблено оптимальні середовища та режими культивування, відпрацьовано способи тривалого зберігання клітин за низьких температур. Розробка цих методів створює міцну основу для розгортання теоретичних і прикладних робіт із клітинної інженерії сільськогосподарських тварин, які матимуть все зростаюче народногосподарське значення.

На перше місце варто поставити вже досить добре розроблений метод поділу раних ембріонів. З розвитком трансплантації в руках дослідників з'явилася достатня кількість раних ембріонів, що дало потужний імпульс роботам з маніпуляції цими об'єктами.

Один з методів клітинної інженерії – трансплантація раних ембріонів, одержання ідентичних близнюків, химерних тварин. Ці методи вже широко впроваджуються в практику селекції сільськогосподарських тварин і прискорюють генетичне поліпшення порід.

Генетична й клітинна інженерія широко використовуються у ветеринарії. Значні втрати за відтворення худоби й птиці пов'язані з різними захворюваннями. Особливо великий збиток наносять інфекційні захворювання. Для боротьби з рядом хвороб успішно застосовують різні вакцини. Методами генної інженерії можливо створити такі вакцини, які не вдається одержати традиційними методами. Ці вакцини можуть бути більш безпечними, дешевими й

стабільними порівняно з існуючими.

Для одержання рекомбінантних продуктів використовують бактерії, гриби і все частіше клітини тварин. Це дозволяє одержувати штучним шляхом білки, що в нормі продукуються тільки тваринами. Потрібні гени були перенесені у відповідні організми, в яких і виявляли експресію.

Наразі дослідження спрямовані на створення системи ферментів для одержання глюкози із целюлози. Гени, що контролюють виділення ферментів, які знайдені в грибах, що ростуть повільно, були клоновані та перенесені в бактерії і дріжджі, які швидко ростуть. Це дозволило створити ефективну технологію одержання із целюлози деревини легкоперетравних вуглеводів. Проводяться роботи з одержання ферментів, що беруть участь у гідролізі лігніну, що дозволяє створити технологію його розщеплення на більш прості молекули. Це надалі дасть можливість одержувати біогаз або одноклітинний протеїн, що забезпечить розроблення технології обробки грубих, целюлозовмісних кормів.

Для вирішення проблеми повноцінної годівлі тварин за участю рекомбінантних мікроорганізмів проводиться промисловий синтез білків і амінокислот, збагачення рослинних кормів мікробним білком. Перспективним шляхом у цьому напрямі вважається створення штамів, які сприяють більш ефективному силосуванню сільськогосподарських культур, що містять багато крохмалю (наприклад, люцерна). Ще однією можливістю забезпечити жуйних білками є спрямована модифікація мікроорганізмів, що існують у рубці.

Утилізація відходів тваринницьких комплексів і виробництв із переробки продукції тваринництва також здійснюється за допомогою біотехнологічних мікробіальних процесів, для вдосконалення яких та збільшення інтенсивності треба, в першу чергу, поліпшити властивості мікроорганізмів за рахунок модифікації їх генів, або створення рекомбінантних бактерій.

Однак, поряд з перевагами, які можливо отримати при використанні досягнень біотехнології, слід згадати і про наслідки, що можуть бути викликані бурхливим розвитком нової галузі. Тому виникає необхідність відповіді на запитання:

- Чи не будуть організми, що створені методами генної інженерії небезпечно впливати на інші живі організми або на навколишнє середовище?

- Чи не викличе створення і розповсюдження генетично модифікованих організмів зменшення природного генетичного різноманіття?
- Чи необхідно патентувати тварин, що виведені генно-інженерними методами?
- Чи не зазнає шкоди традиційне сільське господарство від використання досягнень біотехнології?

### ***Контрольні запитання***

1. На підставі яких подій можливо поділити історію формування біотехнології на певні етапи?
2. Які галузі науки та виробництва пов'язані з біотехнологією?
3. Вкажіть основні цілі біотехнології.
4. На підставі чого розрізняють розділи біотехнології?
5. Які завдання можна вирішувати за допомогою біотехнології?
6. Які медичні препарати отримують за допомогою біотехнології?
7. Яким чином біотехнологія допомагає вирішувати енергетичні проблеми?
8. Які об'єкти біотехнології розрізняють?
9. Які методи застосовують у біотехнології?
10. Які досягнення генетичної інженерії перспективні для тваринництва?

## РОЗДІЛ 2

# ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГЕНЕТИКИ

Живий організм являє собою відкриту термодинамічну систему, що самовідтворюється, у якій шляхи перетворення речовини й енергії обумовлюються генетичною інформацією, що реалізується через генетичний код. У такому визначенні М. Барб'єрі (1998 р.) сформулював один з фундаментальних принципів біології кінця ХХ ст. Можливість появи цього глобального узагальнення пов'язана з трьома найбільшими досягненнями в біологічних дослідженнях попереднього століття. Біохіміками було визначено функціональну роль білків, генетикам удалося підняти завісу над світом генетичної інформації, а молекулярні біологи встановили, що зв'язок між цими двома світами здійснюється через генетичний код.

Відповідно до сучасних уявлень уся генетична інформація живого організму утримується в його генах і, як будь-яка інша інформація, містить у собі *повідомлення*, у цьому разі, повідомлення для молекулярних об'єктів, здатних їх сприйняти. Сама можливість сприйняття генетичної інформації визначається тим, що повідомлення організовані за допомогою системи правил (*генетичного коду*), «зрозумілих» об'єктам, для яких ці повідомлення призначені. Отримавши генетичне повідомлення, молекулярний об'єкт його декодує відповідно до правил, що лежать в основі функціонування його складових частин. Навіть часткове невиконання цих правил може призвести до важких порушень життєдіяльності організму.

Під час передачі генетичної інформації з існуючих каналів зв'язку від генів до сприймаючих молекулярних об'єктів має місце її багаторазове декодування й перекодування аж до остаточного втілення у фенотипічних ознаках. Відбувається *експресія генів*, тобто реалізація генетичної інформації.

Клітина є тією найменшою частиною організованої матерії, що ще зберігає всі ознаки живого. У ній відбуваються основні події, пов'язані з експресією генів. Лише в клітині може повноцінно реалізовуватися генетична інформація, що є в генах. Зв'язок між



генами й внутрішньоклітинним генетичним оточенням нерозривний. Компоненти клітини, розпізнаючи гени, зчитують укладену в них інформацію й декодують її. При цьому вони підтримують гени в робочому стані і їх відтворюють, створюючи точну копію носія інформації, гарантію існування самих себе.

«*Omnia mea mecum porto!*<sup>1</sup>» – цей девіз повною мірою стосується одноклітинних організмів. У багатоклітинних генетичних систем це не так. У цьому разі окремі клітини, що складають організм, стають залежними один від іншого, створюючи нерозривну єдність на певному рівні – соми, або тіла. Між клітинами відбувається контрольований генами перерозподіл функцій. При цьому клітини різних частин багатоклітинного організму можуть настільки розрізнятися морфологічно, що без проведення спеціального аналізу на молекулярному рівні їх неможливо віднести до однієї генетичної системи, єдиного організму.

Перехід до багатоклітинності змінив стосунки організму з навколишнім світом на новий рівень складності. Численні зв'язки між рецепторами організму й зовнішніми впливами, з одного боку, а також внутрішніми аналізаторами інформації, що надходить, з іншого забезпечують максимальну пристосованість організму до умов існування. Життя не прощає помилок. Усе, що неадекватно реагує на сигнали середовища існування, *елінується* (виключається, видаляється) природнім відбором. Чим ефективніше система налаштована на навколишній світ (у тому числі й на внутрішнє середовище організму), тим складніше й витонченіше її морфологічне втілення, її внутрішній зміст.

В основі розвитку будь-якого багатоклітинного організму, становлення системи його органів і тканин лежить поділ (*проліферація*) клітин. Генетична програма забезпечує протікання складної сукупності біохімічних реакцій, що супроводжують створення точної копії генетичного апарату кожної соматичної клітини, її ріст і подвоєння. Оскільки за кожного ділення клітин весь глобальний біохімічний процес циклічно повторюється, він дістав назву **клітинного циклу**. Індивідуальний (онтогенетичний) розвиток, як правило, починається з першого подвоєння стимульованого до цього яйця (яйцеклітини) і завершується тільки з настанням його смерті – розпаду організму як цілого внаслідок обриву ключових

---

<sup>1</sup> Все своє ношу із собою (лат.)

внутрішніх зв'язків між системами його життєзабезпечення. Основна внутрішня подія життя організму – поділ клітин – є під суворим внутрішнім і зовнішнім генетичним контролем. Навіть ізольована соматична клітина здатна лише до обмеженої кількості поділів у поживному середовищі. Кількісний контроль числа клітинних поділів лежить в основі *органогенезу* (формування органів і тканин). Порушення механізмів контролю проліферації клітин призводить до нестримного подвоєння клітин, утворення безформної клітинної маси – пухлини, здатної задушити організм зсередини. Однак, у процесі нормального онтогенетичного розвитку змінюється не тільки число соматичних клітин, а й їх якісний склад.

Здатність органів і тканин здійснювати свої специфічні функції цілком залежить від наявності в них спеціалізованих клітин. Зокрема, організм дорослої людини складається з  $\sim 10^{14} \dots 10^{15}$  клітин більш ніж 100 різних типів. На дуже ранніх стадіях розвитку зародка багатоклітинного організму клітини, з яких він складається, зовні схожі одна на одну. У міру продовження онтогенезу шляхи багатьох з них далеко розходяться. Відбувається *диференціація клітин*, набуття ними спеціалізованих функцій. Морфологічні різниці, що виявляють у спеціалізованих клітин, обумовлюються особливим складом і внутрішньоклітинною організацією їх молекул. Поява таких особливостей на молекулярному рівні також контролюється генами. У спеціалізованих (диференційованих) клітинах або їхніх попередниках крім генів, що здатні до експресії в клітинах усіх типів, працюють особливі групи генів. Перехід експресії одних груп генів на інші, залучення до експресії нових генів і припинення роботи старих у клітинах, що диференціюються, також перебуває під точним генетичним контролем.

Ще однією важливою подією індивідуального розвитку організму є повне заміщення одних груп клітин іншими. При цьому кінцеві стадії процесу заміни контролюються самими клітинами, що заміщуються. На певній стадії розвитку ембріона усередині клітин, які видаляються, у відповідь на сигнали тканин, що їх оточують, відбувається активація групи генів, що призводять їх до саморуйнування – *апоптоз*. Апоптоз є одним із проявів принципу самоочищення організму, коли для становлення й збереження цілого багатоклітинний організм жертвує невеликою частиною своїх соматичних клітин. Дійсно, іншим не менш важливим у цьому процесі є захист організму від клітин з безповоротно ушкодженим

генетичним апаратом, оскільки в цьому разі виникає небезпека їхнього неконтрольованого росту й загибелі цілого організму. Якщо пошкодження генетичного апарату клітини неможливо відновити, клітина вчиняє самогубство.

Відповідно до центрального постулату молекулярної біології прийнято вважати, що генетична інформація, необхідна для індивідуального розвитку організму, укладена в його генах, які являють собою послідовності нуклеотидів молекул ДНК і РНК. Гени містять інформацію про складові частини організму: сукупності великого числа високо- і низькомолекулярних хімічних сполук, що утворюють його клітини, тканини й органи. При цьому дані про структуру майже всіх низькомолекулярних сполук, що називаються *метаболітами*, закодовані в генах не прямо, а побічно. Фактично ця інформація є лише програмою біосинтезу метаболітів. Сама ж структура й взаємодія метаболітів один з одним обумовлюються біологічними каталізаторами білкової природи – ферментами, які й здійснюють необхідні взаємоперетворення – *метаболізм*.

Генетична інформація про структуру білків і ферментів схована в генах не так глибоко. Завдяки існуванню універсального триплетного генетичного коду, послідовності нуклеотидів генів однозначно визначають послідовності амінокислот поліпептидних ланцюгів певних білків. Декодування інформації про структуру білків і нуклеїнових кислот, що супроводжується їхнім біосинтезом, є найважливішим проміжним (але не кінцевим) результатом функціонування (експресії) генів будь-якого організму.

У нормі експресія генів забезпечує існування організму як цілого від початкових до завершальних стадій індивідуального розвитку – від перших поділів стимульованої яйцеклітини до природної смерті організму. Однак, більш широкий підхід до проблеми експресії генів повинен ураховувати не тільки біохімічні наслідки їхньої роботи на молекулярному, надмолекулярному й організменному рівні, але й генетично детерміновані поведінкові реакції груп особин у популяції, а отже, і механізми генетичного контролю розвитку самих популяцій, включаючи цивілізацію.

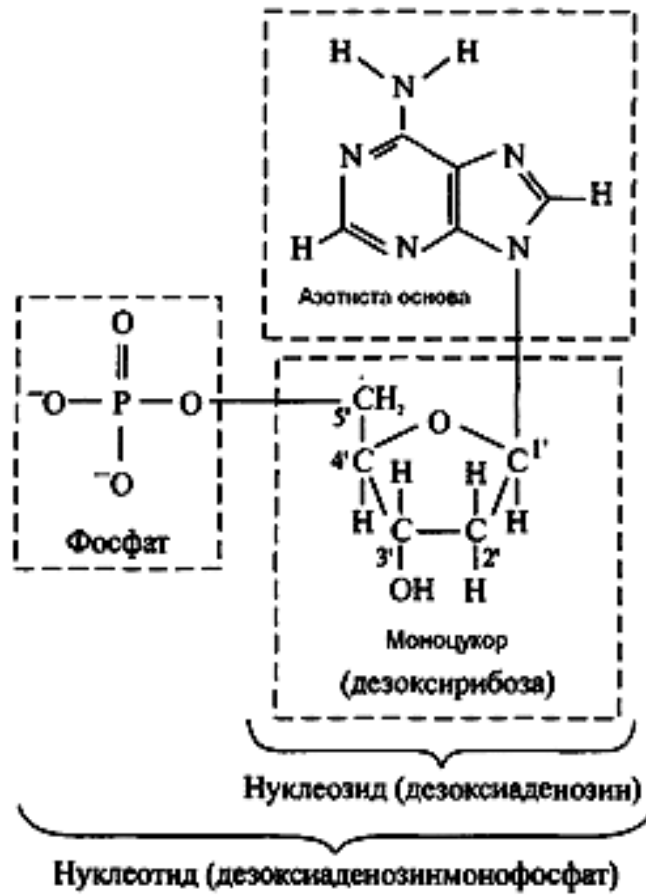
## 2.1. Будова та властивості молекули ДНК

Перші дані про хімічні властивості ДНК виникли в 1868 р. На початку 40-х років ХХ ст. було встановлено, що молекула ДНК – це лінійний полімер. Мономерними одиницями її є нуклеотиди, що складаються з азотистих основ, пентози (п'ятивуглеводного цукру) і фосфатної групи (рис. 3, а). Фосфатна група приєднана до 5'-атома вуглецю моноцукру, а органічна основа – до 1'-атома. Основи ДНК бувають двох типів: пуринові [аденін /А/ і гуанін /Г/] і піримідинові [цитозин /С/ і тимін /Т/] (рис. 3, б). У ДНК моноцукор представлено 2'-дезоксирибозою, що містить лише одну гідроксильну групу (ОН), а у РНК – рибозою, яка має дві гідроксильні групи. Нуклеотиди поєднані один з одним фосфодієфірними зв'язками, при цьому фосфатна група 5'-атома вуглецю одного нуклеотиду пов'язана з 3'-ОН-групою дезоксирибози сусіднього нуклеотиду. На одному кінці полінуклеотидного ланцюга є 3'-ОН-група (3'-кінець), а на іншому 5'-фосфатна група (5'-кінець).

У 1953 році Джеймс Уотсон і Френсис Крік на підставі даних рентгеноструктурного аналізу кристалів ДНК зробили висновок, що нативна ДНК складається з двох полінуклеотидних ланцюгів, які створюють між собою спіраль (рис. 4). Полімерні ланцюги з'єднані водневими зв'язками, що утворюються між комплементарними основами А-Т (два зв'язки), Г-С (три зв'язки) протилежних ланцюгів (рис. 5). Тому вуглеводно-фосфатний остов молекули має регуляторну структуру. Протилежно цьому послідовність пуринових і піримідинових основ уздовж ланцюга у вищому ступені нерегулярна, кожна молекула ДНК певного типу характеризується власною послідовністю.

Пуринові та піримідинові основи згорнуті усередині подвійної спіралі і розташовані паралельно одна до одної і перпендикулярно до осі спіралі. Два ланцюги утримуються поряд завдяки водневим зв'язкам між парами основ. Аденін завжди спаровується із тиміном, а гуанін – із цитозином. Сувору специфічність спаровування обумовлює *комплементарність*, тобто взаємну відповідність послідовності основ у двох ланцюгах. Ланцюги молекули ДНК антипаралельні: один з них має напрямок 3'→5', інший – 5'→3'. Отже, якщо перевернути спіраль на 180°, то її зовнішній вигляд залишиться незмінним.

*a*



*б*

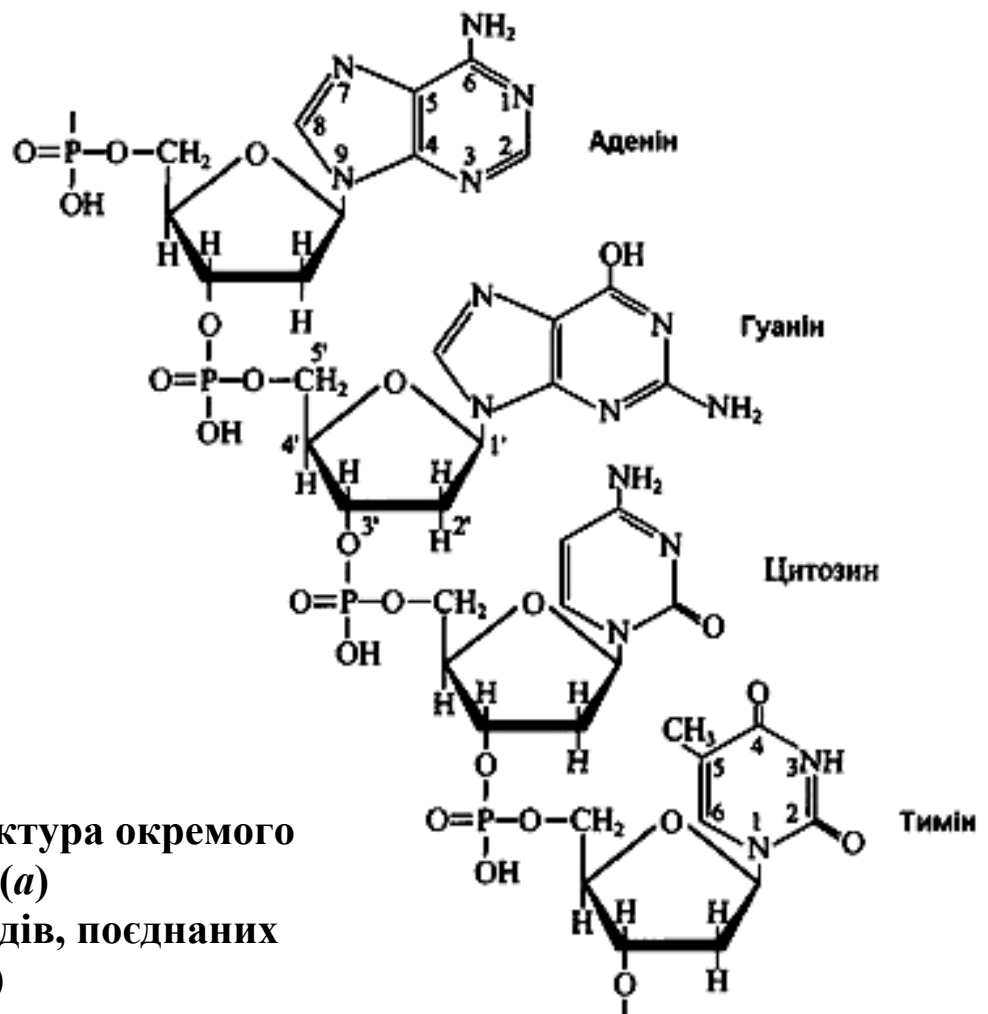
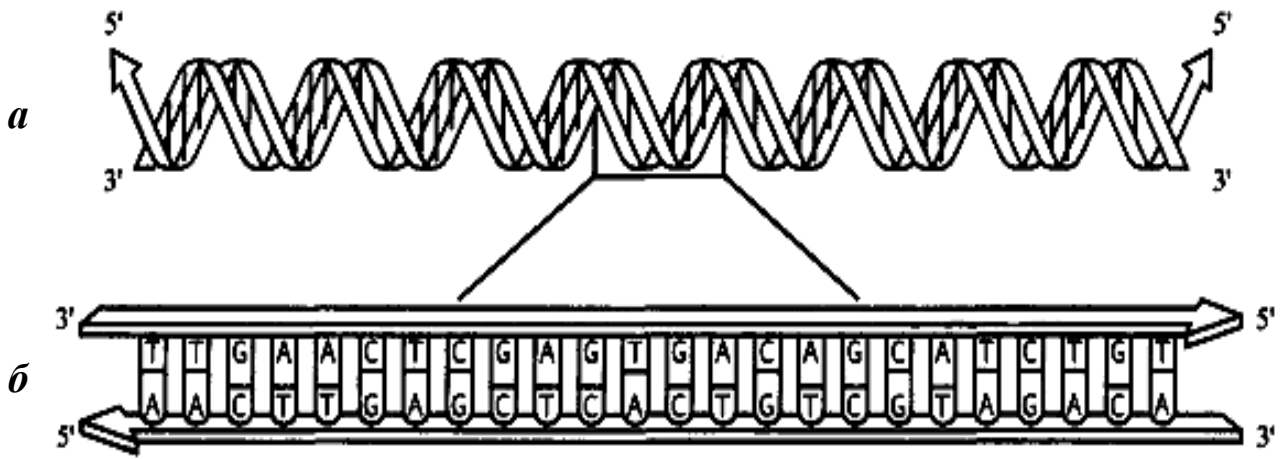


Рис. 3. Структура окремого нуклеотиду (*a*) та нуклеотидів, поєднаних у ланцюг (*б*)



Десять пар нуклеотидів = один оберт спіралі

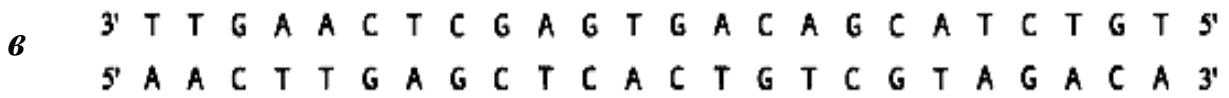


Рис. 4. Способи схематичного зображення молекули ДНК

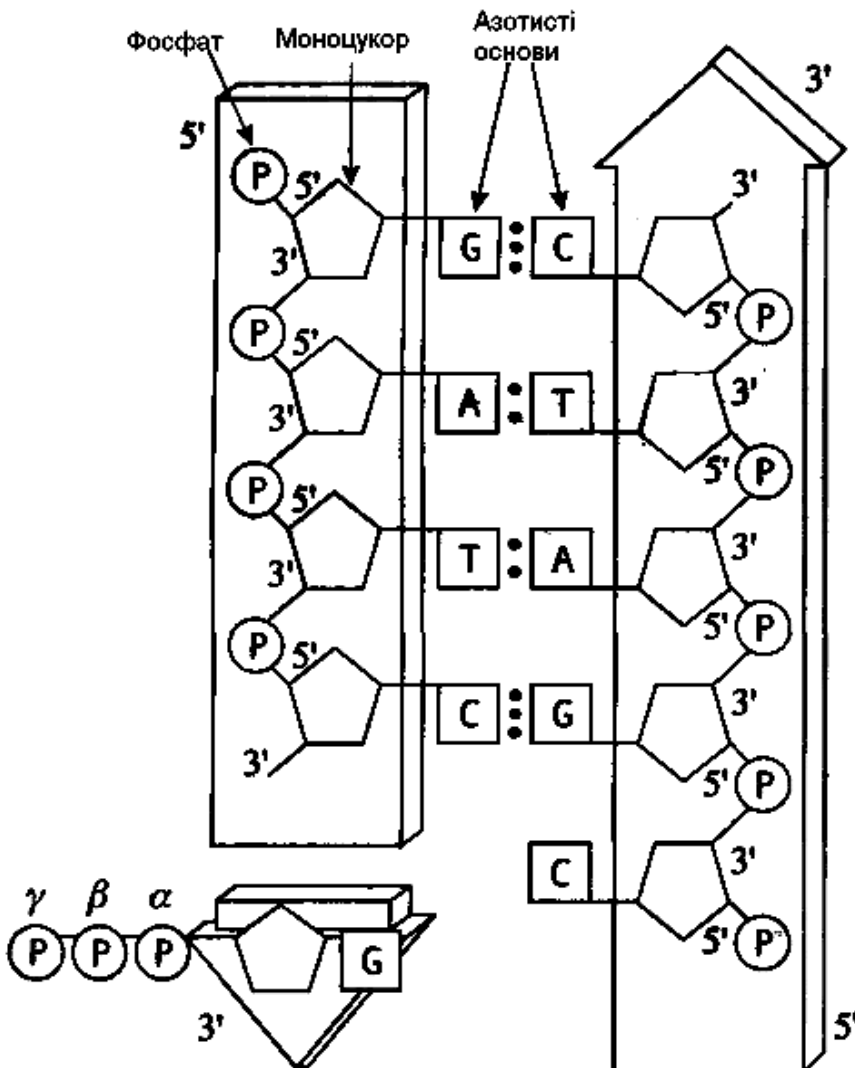


Рис. 5. Основні блоки, що складають дволанцюгову молекулу ДНК

Діаметр спіралі – 20 Å (1 ангстрем =  $10^{-10}$  м). Відстань між сусідніми основами вздовж спіралі – 3,4 Å, вони повернуті одна відносно другої на  $36^\circ$ , таким чином, на один виток спіралі кожного з ланцюгів припадає 10 нуклеотидів, що відповідає 34 Å (рис. 4, а, б).

Довжина дволанцюгової ДНК, як правило, вимірюється числом пар комплементарних нуклеотидів (п.н.). Для молекул ДНК, що складаються з тисяч або мільйонів пар нуклеотидів, прийнято одиниці т.п.н. та м.п.н. відповідно.

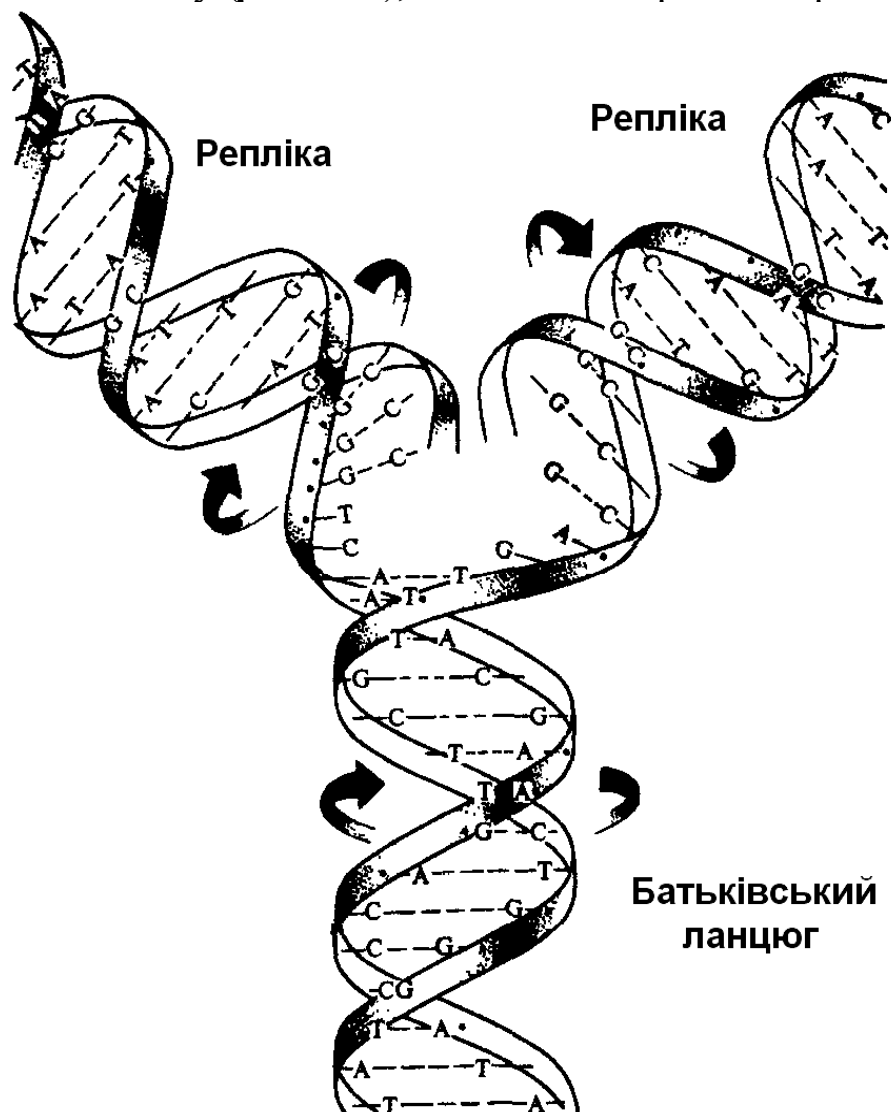
Носій генетичної інформації повинен задовольняти дві основні вимоги: відтворюватися (*реплікуватися*) з високою точністю і *детермінувати* (кодувати) синтез білкових молекул. Модель ДНК Уотсона-Крика повністю відповідає цим вимогам. По-перше, згідно з принципом комплементарності, кожен ланцюг ДНК може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

**Реплікація.** Кожна мономерна одиниця, що приєднується до ланцюга, що синтезується, знаходиться у формі дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфату (див. рис. 3); фосфатна група, що пов'язана з 5'-вуглеводним атомом дезоксирибози, позначається буквою  $\alpha$ , до неї приєднані  $\beta$ -фосфат і далі –  $\gamma$ -фосфат. Під час реплікації  $\beta$ - і  $\gamma$ -фосфатні групи відщеплюються у вигляді пиррофосфату, а  $\alpha$ -фосфатна група поєднується з 3'-ОН-групою останнього нуклеотиду ростучого ланцюга. Синтез ДНК як у прокариот, так і в еукариот здійснюється за участю багатьох різних ферментів. Основну роль відіграє ДНК-полімераза, яка послідовно приєднує нові ланки до ростучого полінуклеотидного ланцюга за принципом комплементарності й каталізує утворення фосфодієфірних зв'язків.

У бактерій реплікація ДНК починається з особливої точки молекули, що називається точкою начала (або *сайтом ініціації*) реплікації (*ori*, від англ. *origin*). У ДНК еукариот існує декілька таких сайтів, і реплікація може починатися в кожному з них. Сегменти еукариотичної ДНК, що при цьому створюються, скріплюються один з одним за допомогою особливих ферментів. Крім того, в еукариот є спеціальний фермент *теломераза*, який поновлює кінці (теломери)

хромосом.

Механізм реплікації був запропонований Дж. Уотсоном і Ф. Криком – авторами теорії подвійного ланцюга ДНК. Він передбачає розплетення двох ланцюгів ДНК таким чином, щоб кожен з них міг бути матрицею для зборки іншого ланцюга відповідно до принципу комплементарності. На матричному або батьківському ланцюгу поодинокі нуклеотиди вишиковуються певним чином, а їх наступна полімеризація призводить до утворення нового або дочірнього ланцюга (*репліки*), комплементарного першому (рис. 6).



**Рис. 6. Реплікація молекули ДНК за напівконсервативним механізмом**

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



Як уже зазначалося, для реплікації необхідне локальне розплетення подвійної спіралі в тій частині молекули, де ДНК в даний момент є матрицею для синтезу дочірніх ланцюгів ДНК. Ця розплетена частина молекули називається **реплікативною вилкою**.

Реплікація супроводжується пересуванням реплікативної вилки вздовж молекули ДНК і синтезом нових ланцюгів на кожному із старих. Але ланцюги ДНК антипаралельні, і логічно припустити, що один із дочірніх ланцюгів росте у напрямку  $5' \rightarrow 3'$ , а інший – в протилежному,  $3' \rightarrow 5'$ .

Оскільки молекула ДНК несиметрична, для реплікації в двох напрямках необхідно два різних ферменти реплікації – дві ДНК-полімерази.

За допомогою однієї ланцюг росте в напрямку  $5' \rightarrow 3'$ , і тоді кожен наступний мономер забезпечує сам себе енергією для приєднання до ростучого ланцюга (носієм енергії є трифосфатна група). Такий ріст на полімерному ланцюгу називається «ростом з хвоста». Інша полімераза нарощує ланцюг «з голови», тобто приєднує новий мономер до багатого на енергію  $5'$ -кінця ростучого ланцюга. Цей мономер, у свою чергу, використовує власний трифосфат для приєднання наступного нуклеозидтрифосфату.

Однак, у прокариот і в еукаріот знайдено, виділено і охарактеризовано лише  $5' \rightarrow 3'$  ДНК-полімерази. Виникає проблема синтезу іншого ланцюга ДНК. Дослідження виявили, що під час реплікації бактеріальної ДНК спочатку на деякий час створюються фрагменти завдовжки 1000...2000 нуклеотидів. Ці фрагменти дістали ім'я їх першовідкривача – фрагменти Оказаки. За реплікації еукаріотичної ДНК довжина фрагментів Оказаки становить 100...200 нуклеотидів. Було також показано, що синтез фрагментів відбувається в напрямку від  $5'$  до  $3'$  кінця, надалі вони з'єднуються у довгі ланцюги ДНК. Так виникло уявлення згідно з яким синтез ДНК здійснюється у напрямку  $5' \rightarrow 3'$  (від хвоста до голови). Але на одному з ланцюгів нова ДНК синтезується безперервно, а на іншому – фрагментами, що з'єднуються між собою в єдину полімерну молекулу. Перший з ланцюгів називається лідируючий, а інший – відстаючий. Таким чином, на відстаючому ланцюгу синтез відбувається в напрямку  $5' \rightarrow 3'$ , а сам ланцюг росте в напрямку  $3' \rightarrow 5'$ .

Основні принципи і механізми реплікації схожі у прокариот і еукаріот. Найкраще вивчена реплікація у *E. coli*. Основним ферментом реплікації у *E. coli* є ДНК-полімераза III. Швидкість

синтезу ДНК за її допомогою становить 1000 нуклеотидів за секунду. Аналогом ДНК-полімерази III в клітинах еукаріот вважають ДНК-полімеразу  $\alpha$  (альфа), швидкість реплікації еукаріотичної ДНК у 10 разів повільніша і становить 100 нуклеотидів за секунду.

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

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

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

Для синтезу лідируючого ланцюга, який іде безперервно, праймер необхідний лише на початку полімеразної реакції. Полімераза, що здійснює синтез відстаючого ланцюга, потребує праймера перед синтезом кожного фрагменту. Існує спеціальний фермент, що синтезує праймери. Він називається РНК-праймаза і створює короткі РНК-праймери завдовжки близько 10 нуклеотидів. Після синтезу фрагментів Оказакі праймер треба видаляти.

Для видалення праймерів і забудови створених проломів починає діяти особлива система *репарації* (відновлення) ДНК.

Основна роль у цьому належить ДНК-полімеразі I *E. coli* і аналогічним ферментам інших організмів. ДНК-полімеразу I можна розглядати як два ферменти на одному поліпептидному ланцюгу. Перший називається *фрагментом Кленова* і володіє полімеразною і коригувальною (3'→5'-екзонуклеазної) активністю. Інший фрагмент здатний відщеплювати нуклеотиди в напрямку 5'→3', тобто в напрямку синтезу ДНК. Ця 5'→3'-екзонуклеазна активність і надає можливість видаляти праймер.

Синтез ДНК на відстаючому ланцюгу складається, таким чином, з таких етапів:

- РНК-праймаза синтезує праймери на певній (що дорівнює довжині фрагментів Оказаки) відстані один від одного;
- ДНК-полімера III синтезує фрагменти ДНК, починаючи із 3'-кінця праймера і закінчуючи на 5'-кінці попереднього праймера;
- ДНК-полімераза I подовжує синтез фрагментів ДНК у напрямку 5'→3', одночасно видаляє праймер у тому ж напрямку;
- фрагменти ДНК «скріплюються», тобто створюється фосфодієфірний зв'язок між початком попереднього і кінцем наступного фрагментів.

## 2.2. Передача генетичної інформації. Мутації

Існування біологічних видів, а отже, і феномена життя цілком залежить від точності передачі генетичної інформації як по вертикалі – від організмів-батьків нащадкам, так і по горизонталі – від однієї соматичної клітини до іншої в процесі онтогенетичного розвитку багатоклітинних організмів. У попередньому розділі було розглянуто основні механізми функціонування головної генетичної системи, що забезпечує відтворення генетичної інформації шляхом подвоєння молекул ДНК, – системи реплікації, точність функціонування якої вражає уяву. Для правильної передачі генетичної інформації дуже важливі й молекулярні механізми, що забезпечують розбіжність хромосом, що подвоїлися, між дочірніми клітинами в про- і еукаріот, в останньому випадку за мітози й мейози. Однак, жодна з існуючих генетичних систем не працює безпомилково. Тому не менш важливу роль у життєдіяльності організму відіграє його *система репарації* (виправлення) помилок, що випадково виникають за реплікації ДНК і після її завершення.

Проблема точності передачі генетичної інформації в ряді поколінь клітин і організмів має й інший бік. Надмірне консервування генетичної інформації, що є в окремих генетичних локусах, може бути шкідливою для організму й виду в цілому. Зокрема, одним із механізмів, що лежать в основі виникнення різноманітності антитіл, є запрограмовані зміни генів імуноглобулінів, які закріплюються в геномі лімфоцитів у результаті їхнього відбору в онтогенезі. Іншим добре відомим прикладом такого роду є генетична мінливість вірусу грипу. Нарешті, абсолютний консерватизм у передачі генетичної інформації з вертикалі зробив би неможливим філогенетичний розвиток організмів, їхні еволюційні перетворення, що забезпечили, в остаточному підсумку, ту різноманітність біологічних видів, що сьогодні спостерігаються в природі. Еволюційно сформовані відносини між точністю функціонування вищезгаданих генетичних систем і частотою помилок, що виникають за відтворення генетичної інформації окремих генетичних локусів, чітко збалансовані між собою, і вже встановлено, що в ряді випадків є регульованими. Зміни генома, що запрограмовані або випадково успадковуються, названі **мутаціями**, можуть супроводжуватися колосальними кількісними і якісними змінами в експресії генів.

**Мутації** – це успадковані зміни структури генома. Оскільки основу будь-якого генома складають нуклеїнові кислоти – ДНК або РНК, то під дією мутацій відбувається, насамперед, зміна структури геномних нуклеїнових кислот. Процес виникнення мутацій, заснований на різних механізмах, називають **мутагенезом**. Залежно від факторів, що викликають мутації, останні прийнято поділяти на *спонтанні* й *індуковані*. Вважається, що спонтанні мутації виникають мимовільно протягом усього життя організму в нормальних для нього умовах навколишнього середовища. При цьому широке розповсюдження дістала думка про те, що спонтанні мутації в еукаріотичних клітинах виникають із частотою  $10^{-9} \dots 10^{-12}$  на нуклеотид за клітинну генерацію. Тепер, однак, стає ясно, що такі цифри не відображають реальності. Вони не враховують того факту, що частоти спонтанних мутацій можуть істотно (на кілька порядків) змінюватися від локуса до локуса й, швидше за все, вказують на нижню межу частоти мутацій в окремих найбільш стабільних ділянках генома.

Індукованими мутаціями називають спадкові зміни генома, що виникають у результаті тих чи інших *мутагенних впливів* у штучних

(експериментальних) умовах або за несприятливих впливів навколишнього середовища. Серед найважливіших мутагенних факторів насамперед слід назвати *хімічні мутагени* – органічні й неорганічні речовини, що викликають мутації, а також *іонізуюче випромінювання*. За детального розгляду спонтанних та індукованих мутацій стає зрозумілим, що між цими двома типами немає істотних різниць. Дійсно, більшість спонтанних мутацій виникає в результаті мутагенного впливу, що їх індукує, але не реєструється експериментатором. Більш достовірною можна вважати класифікацію мутацій, у якій ураховуються молекулярні процеси, що лежать в основі їхнього виникнення.

У класифікації, заснованій на розмірах сегментів генома, що піддаються перетворенням, мутації поділяють на *геномні*, *хромосомні* й *генні* (рис. 7). За геномних мутацій в організмі-мутанті відбувається раптова зміна числа хромосом, кратна цілому геному. Якщо через  $2n$  позначити число хромосом у вихідному диплоїдному геномі, то в результаті геномної мутації, названої *поліплоїдизацією*, відбувається утворення поліплоїдних організмів, геном яких представлений  $4n$ ,  $6n$  і т.д. хромосомами. Залежно від походження хромосом у поліплоїдах розрізняють *алополіплоїдію*, у результаті якої відбувається об'єднання за гібридизації цілих неспоріднених геномів, і *аутополіплоїдію*, для якої характерно адекватне збільшення числа хромосом власного генома, що кратне  $2n$ . За геномних мутацій відбуваються також зміна числа окремих хромосом у геномі (*анеуплоїдія*), наприклад, трисомія ( $2n + 1$ ), моносомія ( $2n - 1$ ). Зменшення числа хромосом у каріотипі вдвічі має назву – *гаплоїдія*. В цьому разі соматичні клітини гаплоїдного організму містять одинарний (гаплоїдний) набір хромосом ( $n$ ).

Великі перебудови структури окремих хромосом дістали назву *хромосомних аберацій*. Розрізняють міжхромосомні аберації. До міжхромосомних перебудов належать транслокації – обмін ділянками між різними хромосомами. До внутрішньохромосомних перебудов відносяться: делеції – випадання ділянки хромосоми в середній її частині (у разі випадання кінцевої ділянки виникає кінцева делеція – дефішенсі); дуплікації – подвоєння певної ділянки хромосоми, інколи багаторазове поєднання – мультиплікація (або ампліфікація) ділянки; інверсія – виникнення в результаті розриву хромосоми одночасно в двох місцях із поворотом створеної ділянки на  $180^\circ$ ; фрагментація – відбувається внаслідок розриву хромосом у декількох місцях

одночасно із утворенням окремих фрагментів хромосом з наступною втратою тих, що не містять центроміри.

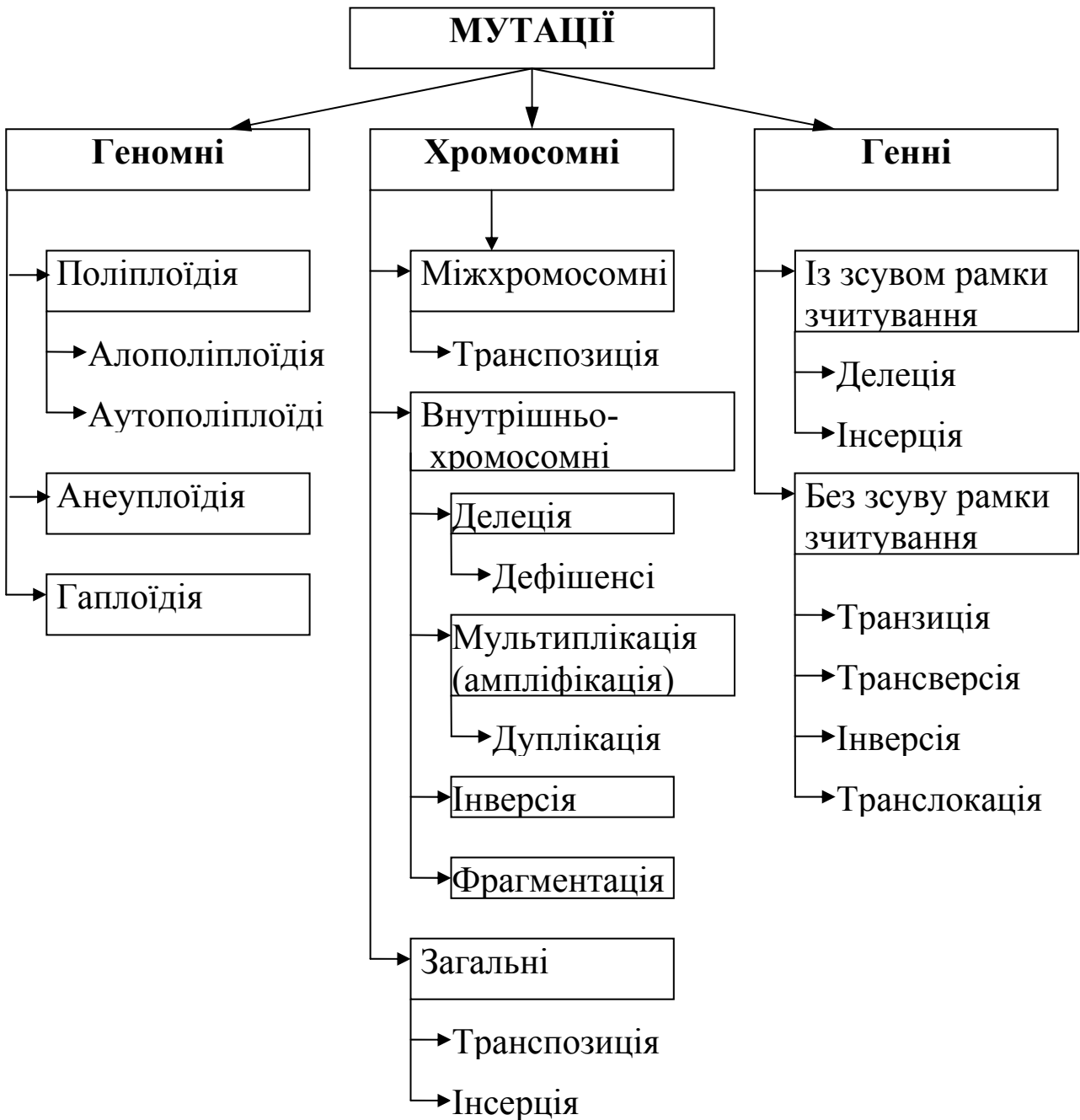


Рис. 7. Види мутації

**Транспозиція** – зміна локалізації невеликих ділянок генетичного матеріалу та **інсерція** (вставка) – внесення додаткових фрагментів хромосоми – можуть відбуватися як за міжхромосомними так і внутрішньохромосомними перебудовами.

На генному рівні зміни первинної структури ДНК генів під дією мутацій менш значні, ніж за хромосомних мутацій, однак генні мутації трапляються частіше. Внаслідок генних мутацій відбуваються

заміни, делеції й вставки одного або декількох нуклеотидів, місенс-мутації, сіменс-мутації й нонсенс-мутації різних частин гена. У разі, коли під дією мутації змінюється лише один нуклеотид, говорять про *точкові мутації*. Оскільки до складу ДНК входять азотисті основи тільки двох типів – пурини й піримідини, всі точкові мутації із заміною основ поділяють на два класи: *транзиції* (заміна пурину на пурином або піримідину на піримідин) і *трансверсії* (заміна пурину на піримідин або навпаки). Завдяки виродженості генетичного коду є три генетичні наслідки точкових мутацій: збереження смислу кодона (*синонімічна заміна нуклеотиду*), зміна смислу кодона, що приводить до заміни амінокислоти у відповідному місці поліпептидного ланцюга (*місенс-мутація*) або утворення безглузлого кодона з передчасною термінацією (*нонсенс-мутація*). У генетичному коді є три безглузди кодони: *амбер* – UAG, *охр* – UAA і *опал* – UGA. Відповідно до цього отримують назву й мутації, що приводять до утворення безглузди триплетів (наприклад амбер-мутація).

За впливом на експресію генів мутації розподіляють на дві категорії: мутації типу *замін* пар основ і типу *зсуву рамки зчитування* (*frameshift*). Останні являють собою делеції або вставки нуклеотидів, число яких не кратне трьом, що пов'язане із триплетністю генетичного коду. Первинну мутацію іноді називають *прямою мутацією*, а мутацію, що відновлює вихідну структуру гена, – *зворотною мутацією*, або *реверсією*. Повернення до вихідного фенотипу мутантного організму внаслідок відновлення функції мутантного гена нерідко відбувається не за рахунок дійсної реверсії, а внаслідок мутації в іншій частині того ж гена або навіть іншого неалельного гена. У цьому разі зворотню мутацію називають *супресорною*. Генетичні механізми, завдяки яким відбувається супресія мутантного фенотипу, досить різноманітні.

### 2.3. Розшифрування генетичної інформації

Переважає більшість генів містить у закодованому вигляді інформацію про синтез білків. *Білки* – це біологічні молекули, що беруть участь практично у всіх процесах, які протікають у живих системах. Вони є каталізаторами різноманітних біохімічних реакцій, здійснюють транспортування речовин усередині клітин і між клітинами, регулюють проникність клітинних мембран, з них

будуються різні структурні елементи. Білки беруть участь у здійсненні рухових функцій, забезпечують захист від інфекцій і токсинів, регулюють синтез інших генних продуктів. Основною структурною одиницею білків є амінокислоти. Всі амінокислоти мають подібну хімічну будову. До центрального атома вуглецю ( $\alpha$ -вуглець) приєднані атом водню (H), аміногрупа ( $\text{NH}_3^+$ ), карбоксильна група ( $\text{COO}^-$ ) і R-група (бічний ланцюг). Існує 20 різних бічних груп і відповідно 20 амінокислот. У таблиці 2 показано одно- і трилітерні позначення амінокислот. З'єднуючись один з одним пептидними зв'язками, амінокислоти утворюють поліпептидний ланцюг. Пептидний зв'язок утворюється між карбоксильною групою однієї амінокислоти й аміногрупою іншої. Перша амінокислота білкової молекули має вільну аміногрупу (N-кінець), а остання – вільну карбоксильну групу (C-кінець).

Таблиця 2

#### Амінокислоти та їх позначення

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



Довжина білкових молекул варіює від 40 до більше 1000 амінокислотних залишків, при цьому залежно від їхньої послідовності та амінокислотного складу молекули білків набувають різної форми (конфігурацію, конформацію). Більшість функціонально активних білків складається із двох і більше поліпептидних ланцюгів (субодиниць), як ідентичних, так і дещо різних.

Білкові молекули створюють складні просторові структури, але загальний принцип їх організації полягає в тому, що структури вищого порядку визначаються безпосередньо структурою нижчого порядку, тобто послідовністю амінокислот у білкової молекулі. Таким чином, у молекулі ДНК записана інформація про первинну структуру білкової молекули.

Структура ДНК не залежить від послідовності пар нуклеотидів, але саме ця послідовність несе інформацію про послідовність амінокислот у білковій молекулі. Ген та його продукт *колінеарні* (від лат. *con* – разом і *linea* – лінія), тобто *колінеарність* – це відповідність між послідовністю нуклеотидів у молекулі ДНК і послідовністю амінокислот у молекулі білка.

Поєднання трьох нуклеотидів розміщених поряд, формує генетичний код. Кожен триплет нуклеотидів, або *кодон*, визначає введення в поліпептидну структуру однієї амінокислоти. Те, що кодони створенні з трьох нуклеотидів, пов'язане з необхідністю кодувати 20 амінокислот. Два нуклеотиди надають лише 16 варіантів кодонів  $4^2 = 16$ , (4 – кількість нуклеотидів, 2 – кількість нуклеотидів поєднана), кількість їх недостатня для кодування 20 амінокислот, у той час, як за поєднання трьох нуклеотидів маємо 64 варіанти:  $4^3 = 64$ . З них 61 кодон визначають амінокислоти, а три – є сигналами, що свідчать про закінчення синтезу, а один – AUG (в РНК замість Т /тиміну/ утворюється U /урацил/) *старт-кодон*, який кодує ще і амінокислоту метіонін.

Експериментальне підтвердження триплетної природи коду було отримано на початку 60-х років у генетичних експериментах, проведених С. Бреннером і Ф. Криком. Дослідження здійснювалися на бактеріофагу T4. За допомогою акридинів було отримано мутанти зі вставками або делеціями нуклеотидів ДНК. Проведеними схрещуваннями виявили, що вставляння або випадання одної пари нуклеотидів обов'язково викликають утворення аномальних білків з порушеною функцією. Такий самий ефект спостерігається під час вставляння або делеції двох пар нуклеотидів у межах одного гена.

Якщо всередині незначної частини гена відбувається три вставляння або делеції, білок, що синтезується, часто зберігає активність.

Для генетичного коду характерна така особливість, як *виродженість* – це означає, що кілька кодонів кодують одну і ту ж амінокислоту (табл. 3).

Таблиця 3

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

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

Завдяки виродженості помилки, що виникають при зчитуванні, не завжди супроводжуються перекрученням генетичної інформації і порушенням *експресії* – процесу реалізації генетичної інформації, що міститься в ДНК.

В усіх випадках дво-, три- і чотириразової виродженості зміна відбувається тільки в третьому нуклеотиді триплету. Наприклад, зміни третього нуклеотиду в кодонах, що відповідають за синтез гліцину, не викликає відповідної зміни його поліпептидної структури, оскільки специфічність кодонів визначається головним чином першими двома нуклеотидами.

Кодони не здатні перекриватися, це означає, що залежно від точки старту можливі три варіанти зчитування генетичної інформації. Якщо для зчитування використовується лише одна рамка, то при додаванні або віддаленні одного або двох нуклеотидів відбувається зсування «рамки зчитування». При цьому нуклеотидна послідовність нової рамки стане зовсім іншою і в ній буде закодована послідовність амінокислот, що позбавлено функціонального смислу. У разі трьох вставок або делецій активність білка відновлюється. При цьому відбувається додавання або втрата однієї амінокислоти, але рамка зчитування відновлюється.

Основні властивості генетичного коду:

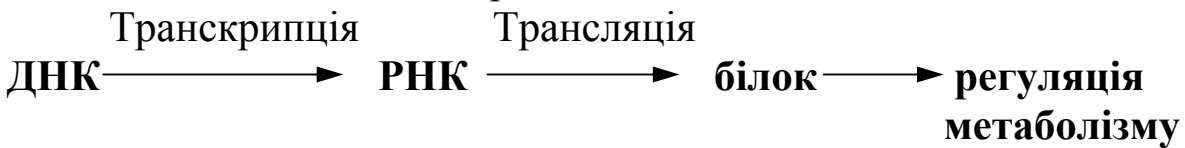
1. *Триплетність* – доказана в генетичних експериментах і підтверджена біохімічним синтезом. Одна амінокислота визначається послідовністю з трьох нуклеотидів – кодону.
2. *Код не перекривається*. Кодони ідуть один за одним без розділових знаків, тобто два кодони не мають загальних нуклеотидів. Зчитування інформації починається із фіксованого нуклеотиду, який задає необхідну рамку.
3. *Код вироджений*. Більшість амінокислот кодується більш ніж одним кодоном, а кожен кодон визначає лише одну амінокислоту. Кодони, що відповідають одній тій самій амінокислоті, називаються кодонами – синонімами. Більшість синонімів розрізняється лише останньою основою триплету, тобто код вироджений за третьою основою. Можливо біологічний сенс виродженості генетичного коду полягає в тому, що ефект мутацій зводиться до мінімуму. За такої організації коду заміна основи виникла випадково, що із значною вірогідністю приведе до заміни на подібну амінокислоту або ж заміни не відбудеться зовсім.

4. *Код універсальний.* Генетичний код розшифрований внаслідок досліджень у безклітинних системах, отриманих з бактерій, тому було необхідно підтвердити, що результати, які отримані *in vitro*, справедливі *in vivo*. Прямий доказ універсальності отримано за порівняння нуклеотидних послідовностей ДНК і відповідних амінокислотних послідовностей. Виявилося, що в усіх бактеріальних і еукаріотичних геномах для кодування амінокислот використовуються одні ті ж набори триплетів нуклеотидів. Універсальність коду (за незначним винятком) свідчить про його раннє походження в еволюції. Можливо, на ранніх етапах лише дві перші основи були для розпізнавання, а роль третьої основи визначилася пізніше. У певний час код був «заморожений» в його сучасному вигляді. Будь-яка мутація, що змінює код, змінює послідовність амінокислот у більшості білків. Багато з цих змін можуть бути летальними. Отже, має існувати сильний тиск проти таких мутацій. Однак, в останні роки за вивчення процесу біосинтезу білка в мітохондріях були виявлені відхилення від універсального коду. Наприклад, для всіх геномів в ДНК мітохондрій кодон UGA читається так саме, як UGG і тому є не кодоном-термінатором, а кодоном для триптофану. Також, виявлено специфічні зміни коду мітохондріальної ДНК для окремих видів. Так, у дріжджів кодон CUA кодує треонін замість лейцину, у ссавців AUA має таке саме значення, як й AUG, і визначає метіонін замість ізолейцину, а кодони AGA та AGC не кодують аргінін, а є термінаторами.

### 2.3.1. Транскрипція

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

Таким чином, потік генетичної інформації у клітині здійснюється за таким напрямом:



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

Існують три основних типи РНК: інформаційна, або матрична (іРНК, мРНК), яка є матрицею для синтезу білка. Кожному структурному гену (або групі генів) відповідає власна молекула мРНК; транспортна (тРНК), що переносить амінокислоти в активованій формі до рибосом, де здійснюється синтез молекули білка; рибосомна (рРНК) – необхідний компонент рибосом. Усі вони відіграють важливу роль у процесі розшифровки генетичної інформації. У більшості прокариотів транскрипція всіх РНК здійснюється за допомогою одного ферменту – РНК-полімерази. В еукаріот мРНК, рРНК і тРНК транскрибуються різними РНК-полімеразами.

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

У ході транскрипції новосинтезована молекула РНК від'єднується від ДНК і подвійна спіраль ДНК відновлюється. Щоб забезпечити транскрипцію тільки окремих сегментів ДНК, повинні існувати якісь сигнальні послідовності, що вказують, де починається (*ініціюється*) транскрипція й де вона зупиняється (*термінується*). Сигнал ініціації звичайно розташовується перед послідовністю, що кодує, а сигнал термінації – слідом за нею. Ділянка ДНК, що передує гену, який транскрибується, називається 5'-фланкуючою послідовністю, а розташована за ним – 3'-фланкуючою.

Цикл транскрипції можна поділити на чотири основні стадії, до кожної з яких входить багато елементарних подій:

- зв'язування з ДНК ;
- *ініціація* ланцюга РНК;
- ріст (*елонгація*) ланцюга РНК;
- *термінація* (припинення) росту ланцюга РНК.

Цикл транскрипції починається із приєднання РНК-полімерази до *промотору* – певної ділянки ДНК, що визначає місце початку синтезу РНК. При зв'язуванні РНК-полімерази з промотором створюється так званий закритий промоторний комплекс, в якому ДНК зберігає двоспіральну структуру. Закритий комплекс може обертатися у відкритий, причому цей процес – зворотний. Після утворення відкритого комплексу РНК-полімераза розплітає приблизно один виток подвійної спіралі ДНК в районі стартової точки – нуклеотиду, з якого починається комплементарне копіювання матриці. У відкритому комплексі зв'язок РНК-полімерази із ДНК суттєво зміцнюється.

Наступна стадія, ініціація, здійснюється за наявності субстратів РНК-полімерази, нуклеозидтрифосфатів і полягає в утворенні перших декількох ланок ланцюга РНК. Ріст ланцюга РНК відбувається в напрямку 5'→3', як і під час реплікації ДНК, а РНК-полімераза пересувається вздовж матричного ланцюга в напрямку 3'→5'.

Ефективність ініціації на різних промоторах, їх «сила», суттєво розрізняється: з деяких промоторів за період поділу клітини може ініціюватися всього одна-дві молекули РНК, в той час як на інших – ініціювання відбувається кожні одну-дві секунди.

На стадії елонгації в ДНК розплетено біля 18 п.н. Близько 12 нуклеотидів матричної нитки ДНК створює гібридну спіраль з наростаючим кінцем ланцюга РНК. Відповідно до руху РНК-полімерази вздовж матриці попереду неї здійснюється розплітання, а

позаду – відновлення подвійної спіралі ДНК. Одночасно відбувається звільнення синтезованої РНК із комплексу з матрицею і з РНК-полімеразою. Максимальна швидкість елонгації становить близько 50 нуклеотидів за секунду.

На відміну від ДНК-полімерази РНК-полімераза не володіє здатністю до самокорекції. У зв'язку з цим надійність транскрипції значно нижча, ніж надійність реплікації. Частота помилок під час синтезу РНК дорівнює: одна на  $10^6$  нуклеотидів. Низька надійність синтезу РНК компенсується клітиною значною кількістю копій РНК-транскриптів з одного гена.

Термінація транскрипції також ретельно регулюється, як й ініціація. За відсутності спеціальних білкових факторів термінації РНК-полімераза здатна зупинити синтез РНК на тих термінаторах, нуклеотидна послідовність в районі яких відрізняється двома особливостями. По-перше, за ходом транскрипції знаходиться ділянка, яка містить багато GC нуклеотидів і для неї здатна центральна симетрія, по-друге, слідом йде ділянка, що складається з 4...8 розташованих поряд аденінів (полі-А). Транскрипція закінчується наприкінці полі-А послідовності, або одразу після неї. Вважають, що після проходження РНК-полімеразою першої ділянки, в РНК-продуктів виникає «шпилька», що призводить до зупинки ферменту і звільнення РНК-продукту.

**Регуляція транскрипції.** Всі процеси, що відбуваються в бактеріальній клітині, – створення амінокислот, нуклеотидів, реплікація, трансляція, звільнення енергії – потребують участі білків. Однак, енергетичних ресурсів клітини не вистачає для одночасного здійснення транскрипції і трансляції всіх *структурних генів* (гени, в яких закодована інформація про структуру кінцевого продукту). Тому постійно відбувається експресія лише тих генів, які кодують білки, що підтримують основні клітинні функції, а транскрипція інших структурних генів регулюється.

**Регуляція транскрипції у бактерій.** У бактерій часто білки одного метаболічного шляху кодуються суміжними структурними генами. Нуклеотидна послідовність, у якої закодовано більше одного білка, називається *опероном*. Звичайно оперон перебуває під контролем єдиного промотору, і при його транскрипції утворюється одна довга молекула мРНК, що кодує кілька білків. За трансляції такої мРНК, у якої стоп-кодон послідовності, що кодує один білок, є сосудом зі старт-кодоном гена наступного білка, синтезується набір

дискретних білків.

У більшості структурних генів *E. coli* є два сайти зв'язку для РНК-полімерази. Один з них, звичайно, являє собою нуклеотидну послідовність

ТАТААТ

АТАТТА

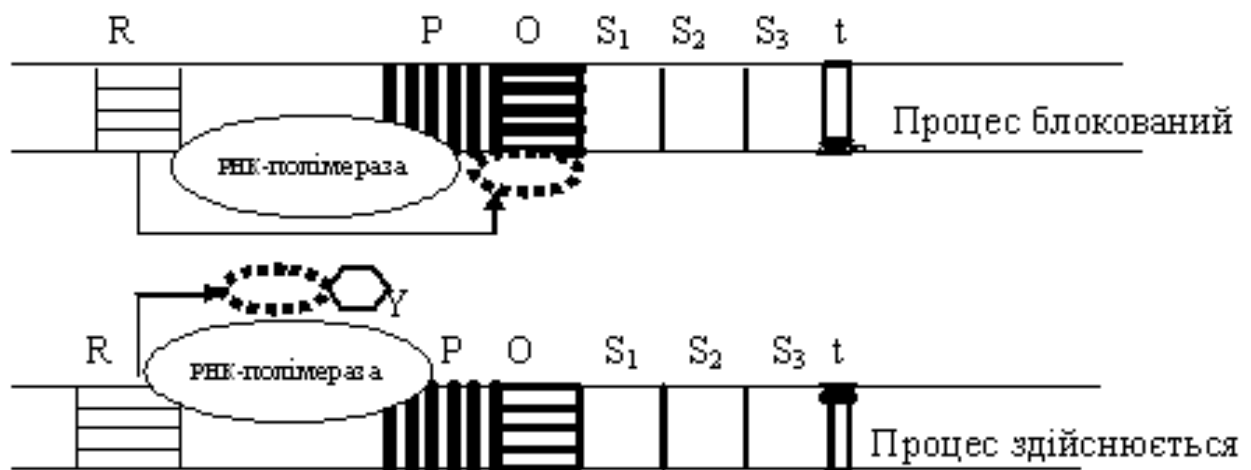
(ТАТА-бокс, або бокс Прибнова), а інший –

ТТГАС

ААСТГ.

ТАТА-бокс і послідовність ТТГАС розташовані за 10 (ділянка -10) і 35 (ділянка -35) нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції відповідно (нуклеотид +1). Звичайно, від ділянки між ТАТА-боксом і нуклеотидом +1 набагато залежить, чи буде відбуватися транскрипція даного оперона. Для вмикання й вимикання різних оперонів у ході еволюції сформувалася безліч регуляторних систем.

Відповідно до моделі оперона нуклеотидна послідовність містить, якнайменш, чотири компоненти регулювання: структурний ген (або гени, що контролюють взаємозв'язані біохімічні функції  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ), ген-регулятор (R), ген-оператор (O), ген-промотор (P) (рис. 8).



**Рис. 8. Модель оперона:** R – ген регулятор, P – ген промотор, O – ген оператор, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>- структурні гени, t – термінуюча ділянка, Y – речовина-індуктор



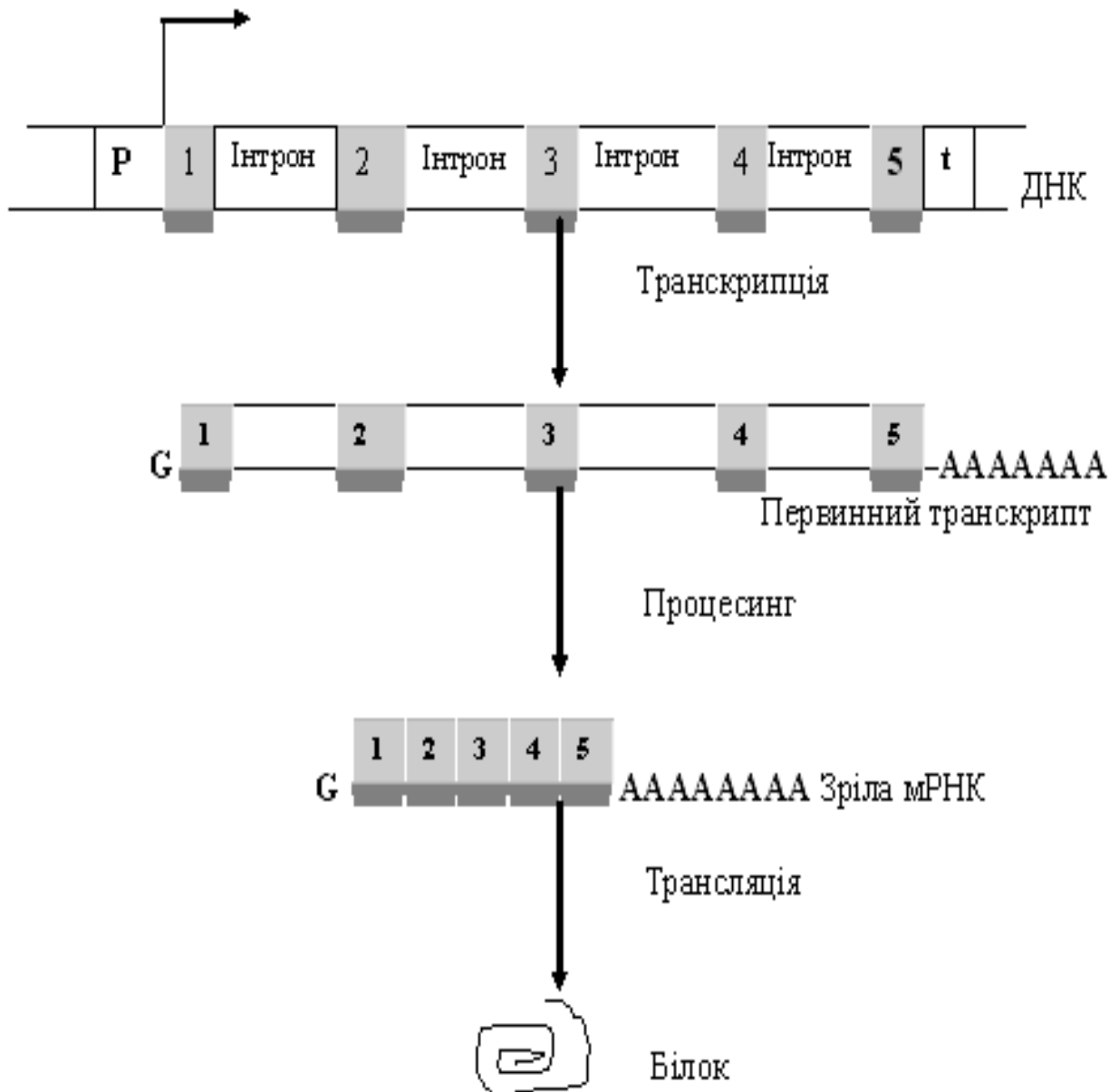
Ген-регулятор визначає структуру білка репресора. Білок-репресор здатний зв'язуватися з геном-оператором (O), у цьому разі процес зчитування інформації припиняється, оскільки РНК-полімераза не може пересуватися вздовж молекули ДНК. Ген-оператор (O) відповідає за порядок зчитування інформації, ген-промотор (P) є початковою ділянкою для зв'язування РНК-полімерази, ферменту, який каталізує транскрипцію ДНК в мРНК.

Якщо у середовище додати речовину-індуктор (Y), то білок репресор блокується, втрачає здатність з'єднуватися з геном-оператором і процес транскрипції здійснюється. Звичайно індуктор руйнується клітинними ферментами. Коли його концентрація знижується, репресор зв'язується з операторною ділянкою, і транскрипція знову припиняється. Операторна ділянка специфічна для кожного оперона, а індуктор взаємодіє тільки з певним репресором.

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

**Регуляція транскрипції у еукаріот.** У еукаріот більшість структурних генів складається з декількох дискретних ділянок, що кодують (*екзонів*), розділених ділянками, що не кодують (*інтронами*). По завершенні транскрипції еукаріотичного структурного гена інтрони вирізають із первинного продукту транскрипції за допомогою ферментів (*процесинг*), а екзони скріплюються один з одним «торець у торець» (*сплайсинг*) з утворенням функціональної мРНК (рис. 9). Звичайно довжина екзонів становить від 150 до 200 нуклеотидів, а довжина інтронів варіює від 40 до 10000 нуклеотидів. Деякі еукаріотичні структурні гени взагалі не мають інтронів.

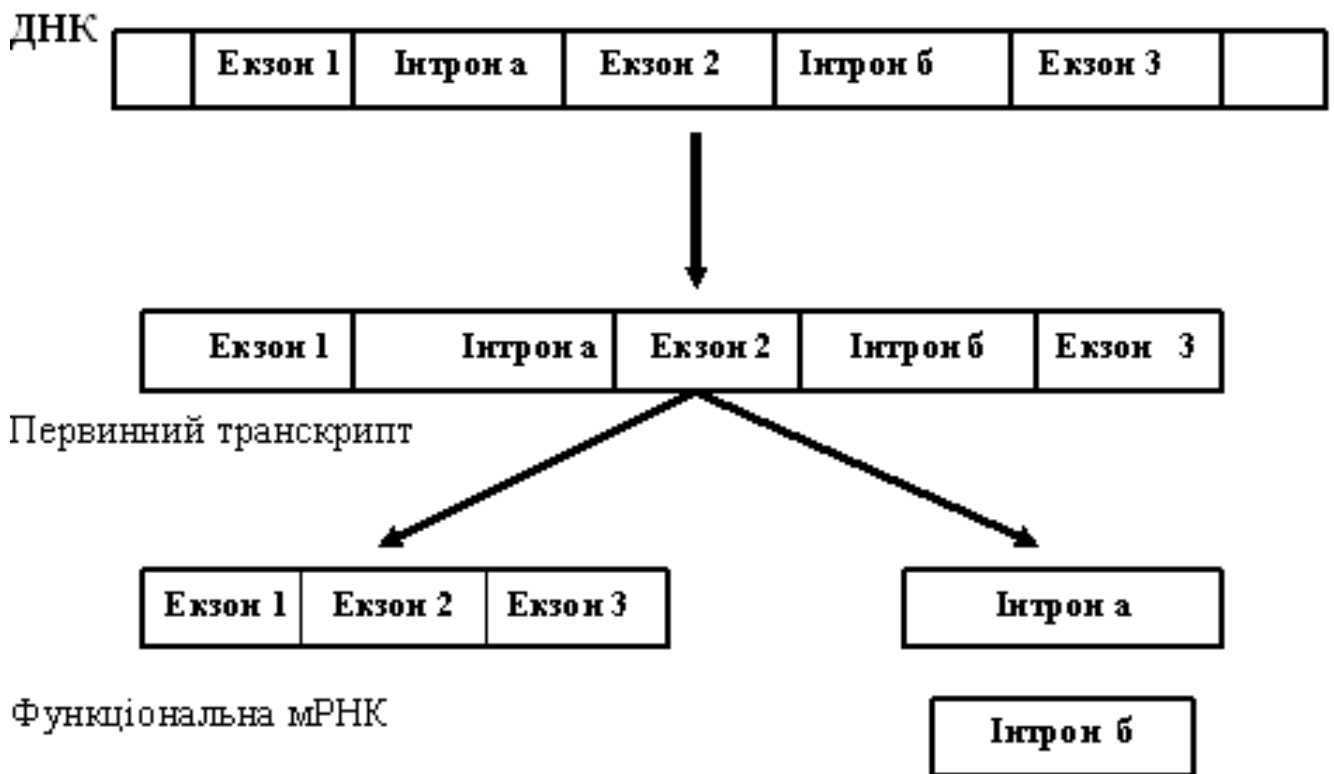
Іноді сплайсинг мРНК може проходити альтернативним шляхом. Наприклад, в одній тканині функціональна мРНК може утворюватися за з'єднання всіх екзонів первинного транскрипта, а в іншій якийсь екзон буде вирізаний разом із фланкуючими його інтронами й утвориться інша функціональна мРНК. Завдяки альтернативному сплайсингу в різних тканинах можуть утворюватися різні продукти того самого структурного гена (рис. 10, 11).



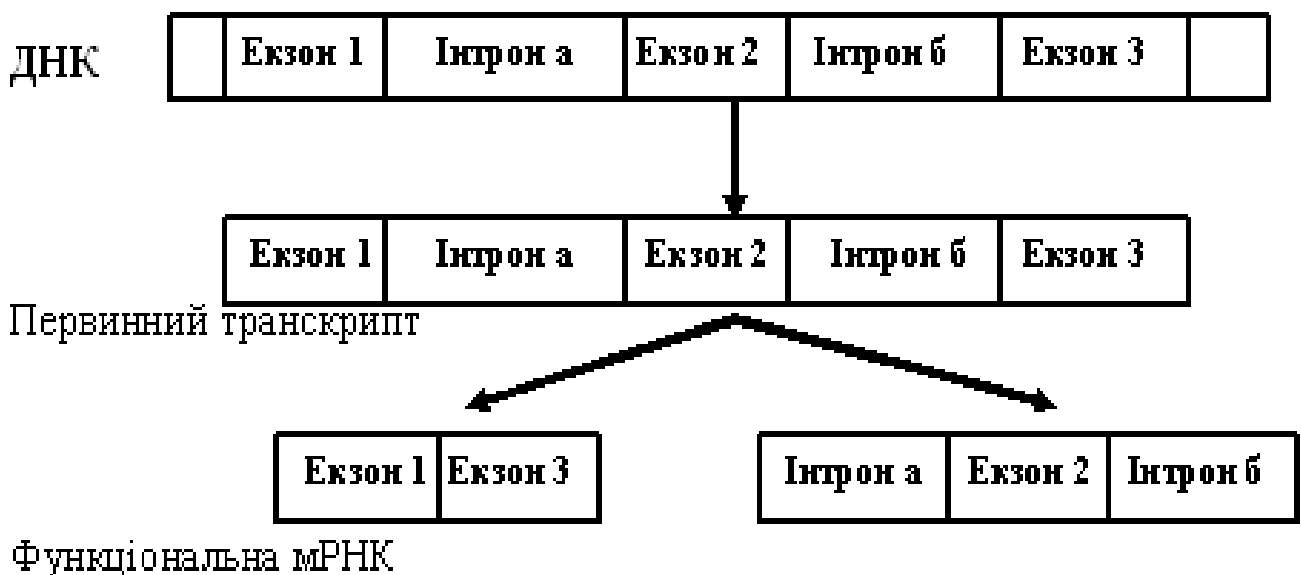
**Рис. 9. Схематичний процес реалізації інформації еукаріотичного структурного гена: 1, 2, 3, 4, 5 – структурні гени**

Для включення й вимикання транскрипції різних еукаріотичних структурних генів використовується безліч різноманітних високоспецифічних процесів. Але так чи інакше регуляція транскрипції в еукаріот здійснюється за допомогою специфічних білків і факторів транскрипції. Багато хто з них зв'язується безпосередньо з нуклеотидною послідовністю завдовжки менше 10 п.н., що називається регуляторним елементом. На відміну від прокариот в еукаріот оперони здебільшого відсутні, тобто кожний еукаріотичний структурний ген має власний набір регуляторних елементів. Істотну роль у регуляції транскрипції в еукаріот, крім

опосередкованої взаємодією між ДНК і білками, грають також білок – білкові взаємодії.



*Рис. 10.* Сплайсинг первинного транскрипту в еукаріот



*Рис. 11.* Альтернативний сплайсинг первинного транскрипту в еукаріот

Незважаючи на індивідуальність набору регуляторних елементів у структурних генів еукаріот, кожен з них має промоторну ділянку (ТАТА-бокс, або бокс Хогнесса) з восьми нуклеотидів, що включає послідовність ТАТА; послідовність ССААТ (САТ-бокс); ділянку з повторюваних дінуклеотидів GC (GC-бокс). Ці елементи перебувають на відстані 25, 75 і 90 п.н. від сайту ініціації, відповідно. Транскрипція структурного гена еукаріот починається зі зв'язування із ТАТА-боксом фактора транскрипції, що являє собою комплекс, принаймні, з 14 білків. Надалі з ними зв'язуються інші фактори транскрипції, і, нарешті, з усім цим транскрипційним комплексом зв'язується РНК-полімераза II. Далі, за участі додаткових факторів, відбувається ініціація транскрипції.

### 2.3.2. Трансляція

**Трансляція** – це процес декодування мРНК, внаслідок якого інформація з мови послідовності основ мРНК переводиться на мову амінокислотної послідовності білка. В цьому процесі погоджено взаємодіють більше сотні видів макромолекул. Крім рибосом необхідні молекули тРНК, ферменти, що активують, розчинні фактори та мРНК.

У клітині, що активно синтезує білки, містяться до 60 різних видів тРНК. тРНК – це лінійна одноланцюгова молекула завдовжки від 75 до 93 нуклеотидів. У ній є декілька взаємокомплементарних ділянок, що спаровуються між собою. За допомогою специфічних ферментів (аміноацил-тРНК – синтетаз) до 3'-кінця тРНК приєднується відповідна амінокислота. Для кожної із двадцяти амінокислот, з яких складаються всі білки, існує принаймні одна специфічна тРНК. На іншому кінці молекули тРНК розташована послідовність із трьох нуклеотидів, що називається *антикодоном*. Вона розпізнає специфічний кодон у мРНК і визначає, яка саме амінокислота буде приєднана до зростаючого поліпептидного ланцюга (рис. 12).

Синтез білка здійснюється шляхом послідовної поліконденсації окремих амінокислотних залишків, починаючи з аміно-(N)-кінця поліпептидного ланцюга у напрямку карбоксильного (C)-кінця. Транскрипції передують активація тРНК – приєднання амінокислоти до 3'-кінцевого аденозину молекули тРНК з утворенням аміноацил-тРНК.

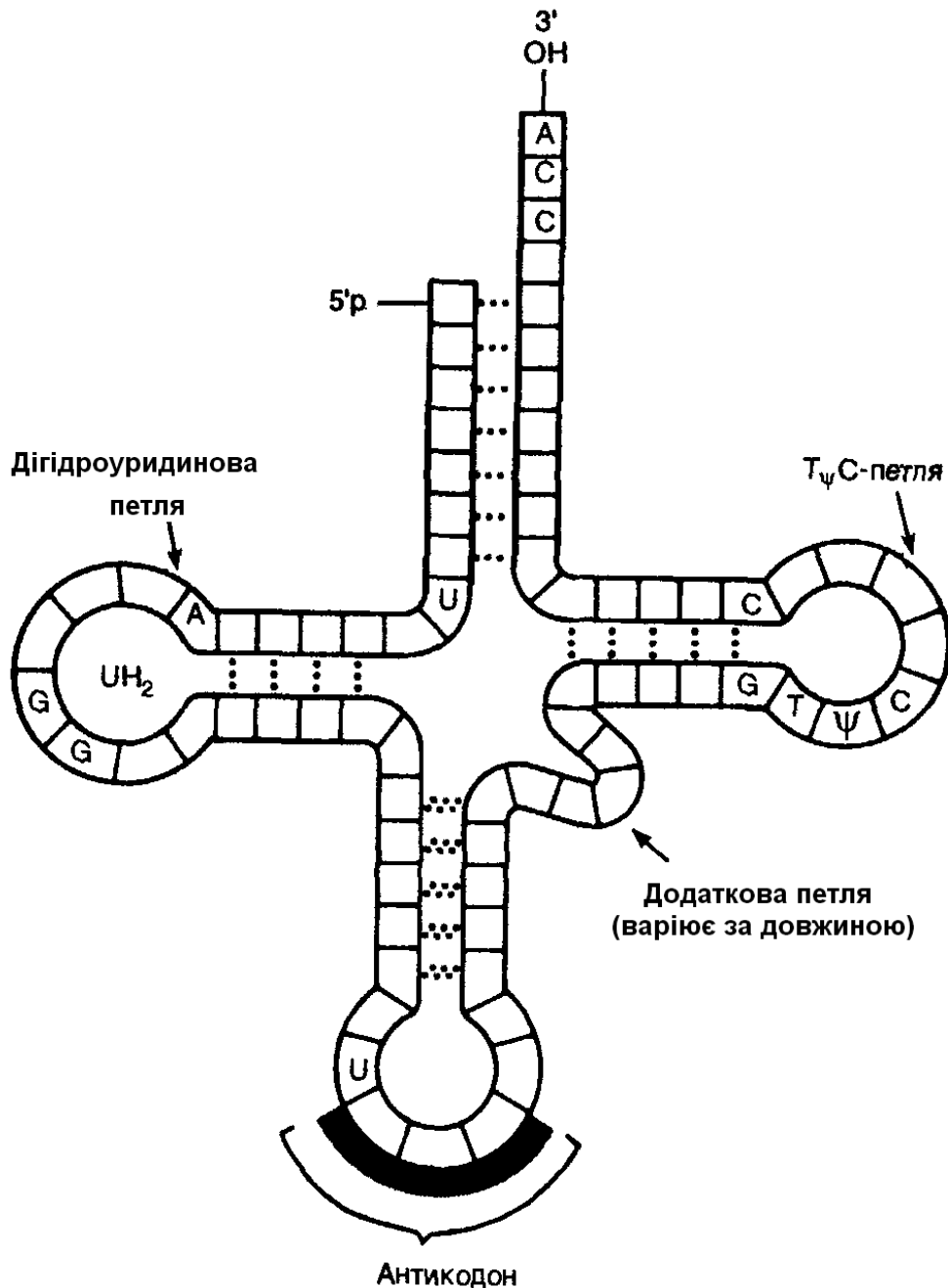


Рис. 12. Будова молекули тРНК

Синтез білка відбувається за три стадії:

- 1 – ініціація забезпечує зв'язування ініціаторної тРНК із сигналом початку трансляції в мРНК, при цьому ініціаторна тРНК займає Р-ділянку рибосоми, одну з двох ділянок зв'язування тРНК;
- 2 – елонгація починається зі зв'язування аміноацил-тРНК з іншою ділянкою зв'язку на рибосомі (А-ділянкою) з наступним утворенням пептидного зв'язку із другої аміноацил-тРНК, що поєднана з ініціаторною тРНК. Діпептидил-тРНК пересувається з А-ділянки у Р-ділянку, нова амінокислота зв'язується з А-

ділянкою, що звільнилася, і починається новий цикл реакції елонгації;

- 3 – термінація відбувається коли стоп-кодон (сигнал термінації) в молекулі тРНК зчитується фактором звільнення білка, що викликає відокремлення завершеного поліпептидного ланцюга від рибосоми.

Яким чином молекула тРНК розпізнає власну амінокислоту? Існує спеціальний набір ферментів, так званих аміноацил-тРНК-синтетаз, що приєднують амінокислоти до відповідних молекул тРНК. Кожній з амінокислот відповідає власна особлива синтетаза: вона приєднує аденін до аденінової тРНК, гліцин – до гліцинової та ін.

Аміноацил-тРНК-синтетаза виконує роль адаптера, здійснює високоспецифічну підгонку однієї молекулярної поверхні до іншої.

Молекули тРНК відіграють роль кінцевих адаптерів за переведення інформації, що закодована в нуклеотидній послідовності, на мову білка. Таким чином, генетичний код розшифровується за допомогою двох взаємопов'язаних наборів адаптерів.

Матрична мРНК може бути представлена десятками різних типів молекул, а рРНК – усього двома типами. Більша рРНК утворює із білками рибонуклеопротеїдний комплекс, названий великою рибосомною субодиницею, а рРНК меншого розміру комплекс, названий малою рибосомною субодиницею. Під час синтезу білків субодиниці поєднуються з утворенням рибосоми. В еукаріот обидві рибосомні субодиниці крупніші, ніж у прокаріот.

Усі етапи білкового синтезу стають можливими внаслідок того, що трансляція здійснюється великим мультиферментним комплексом – рибосомою, що складається з молекул білків і РНК. Протягом усього процесу синтезу білка зростаючий поліпептидний ланцюг, мРНК і чергова аміноацил-тРНК залишаються прикріпленими до рибосоми. В рибосомах обох типів є борозенка, яка утримує зростаючий поліпептидний ланцюг, і борозенка, що утримує молекулу мРНК. Довжина борозенок така, що у першій розміщується до 30 амінокислот, а у другій – до 35 нуклеотидів РНК.

У рибосомі є дві ділянки, що зв'язують молекули тРНК. Одна з них утримує молекулу тРНК, що приєднана до зростаючого кінця поліпептидного ланцюга; тому її називають пептидил-тРНК-сполучною ділянкою, або Р-ділянкою. Інша затримує щойно прибулу

молекулу тРНК, що навантажена амінокислотою; її називають аміноацил-тРНК-сполучною ділянкою, або А-ділянкою. До обох ділянок молекула тРНК прикріплюється лише в тому разі, якщо її антикодон паруються із комплементарним до нього кодоном мРНК. А- і Р-ділянки розташовані дуже близько одна до одної і так, що дві пов'язані з ними молекули тРНК спаровуються із двома сусідніми кодонами в молекулі мРНК

Якщо А-ділянка рибосоми занята одним із стоп-кодонів: UAA, UGA або UAG, то спаровування аміноацил-тРНК, як правило, не відбувається. Нормальні клітини не містять тРНК з антикодонами, комплементарними сигналам термінації. Останні розпізнаються білковими факторами звільнення, що свідчить про те, що білки здатні розпізнавати тринуклеотидні послідовності з високим ступенем точності.

Зв'язування фактора звільнення змінює активність пептидилтрансферази, тому вона тепер приєднує до пептидил-тРНК не вільну аміногрупу амінокислоти, а молекулу води. Внаслідок цього карбоксильний кінець поліпептидного ланцюга відокремлюється від молекули тРНК. Оскільки зростаючий поліпептид утримується на рибосомі лише за рахунок зв'язку з молекулою тРНК, завершений білковий ланцюг виявляється звільненим і, після відокремлення від рибосоми, потрапляє у цитоплазму.

## 2.4. Технологія рекомбінантних ДНК

Технологія рекомбінантних ДНК (її називають також молекулярним клонуванням або генною інженерією) – це сукупність експериментальних процедур, що дозволяє здійснювати перенесення генетичного матеріалу (ДНК) з одного організму до іншого. Ніякого єдиного, універсального набору методик тут не існує, але найчастіше експерименти з рекомбінантною ДНК здійснюють за такою схемою:

- з організму – донора потрібних генів – екстрагують чужорідну ДНК, піддають її ферментативному гідролізу (розщеплюють, розрізають) і з'єднують (лігують, скріплюють) з іншою ДНК (вектора для клонування) з утворенням нової, рекомбінантної молекули;

- цю конструкцію вводять у клітину-реципієнт, де відбувається її реплікація й передача нащадкам. Цей процес називається **трансформацією**;
- ідентифікують і відбирають клітини, що несуть рекомбінантну ДНК (трансформовані клітини);
- одержують специфічний білковий продукт, синтезований клітинами-реципієнтами, що є підтвердженням клонування шуканого гена.

Необхідність маніпулювання генами диктується конкретними завданнями фундаментальних і прикладних досліджень. Для розуміння молекулярних механізмів функціонування окремих генів і взаємозалежних генетичних систем велике значення має робота з ізольованими генами. Такі дослідження дозволяють визначити границі генів, виділити їх у чистому вигляді й ідентифікувати елементи структури, істотні для функціонування. Доказом функціональної значимості виділеної ділянки генома може бути тільки його нормальна експресія в модельній генетичній системі. Тому наступним етапом дослідження виділеного гена завжди є переміщення його в таку генетичну систему, де експресія гена легко виявляється. Результати експресії оцінюють або за появою білкового продукту, що кодується досліджуваним геном, або за зміною функцій біологічної системи внаслідок появи в ній нової ферментативної або іншої активності.

У цей час за допомогою методів генної інженерії отримано дані про структуру й функціонування генів різноманітних організмів, що дало можливість перейти на якісно новий рівень генетичних досліджень. Це, по-перше, можливість перенесення гена в нове для нього генетичне оточення з подальшою його експресією, що веде до зміни властивостей організму, у геном якого вводиться ген (наприклад, створення продуцентів біологічно активних речовин або трансгенних тварин), а також здійснення генотерапії спадкових і придбаних захворювань шляхом штучного заміщення мутаційних алелей. По-друге, стало реальним конструювання нових генів шляхом об'єднання *in vitro* як відомих, так і нових, штучно синтезованих послідовностей нуклеотидів. Цей підхід використовується в білковій інженерії для дослідження функціональної значимості окремих амінокислот і доменів у поліпептидних ланцюгах ферментів, а також для створення нових білків. По-третє, у сучасній біотехнології з'явилася можливість застосовувати ізольовані гени в складі генно-



інженерних конструкцій для одержання продуктів харчування і біологічно активних речовин білкової природи.

Оскільки в експериментальних умовах неможливо працювати з однією копією гена, одержання необхідного числа ідентичних копій гена або його частин є першим і одним із основних завдань генної інженерії. Для його вирішення використовують метод **молекулярного клонування**. Сутність методу полягає в тому, що нуклеотидна послідовність, яку необхідно виділити або розмножити, ковалентно вбудовується в молекули нуклеїнової кислоти, які здатні до самореplikації, і називаються *векторами*. Далі така послідовність нуклеотидів у складі вектора вводиться в клітини про- або еукаріотичного організму, і ці гібридні клітини *в селективних умовах*, що забезпечують збереження вектора усередині клітин, вирощують на поживному середовищі. У результаті створюється клон клітин, теоретично утримуючих ідентичні векторні молекули з однією й тією ж вставкою чужорідної послідовності нуклеотидів. Оскільки об'єднання молекул послідовності нуклеотидів, що клонуються, і вектора є не чим іншим, як рекомбінацією *in vitro*, такі гібридні молекули називають *рекомбінантними молекулами*. У наш час розроблено численні методи, що дозволяють виділяти певні послідовності нуклеотидів зі складної суміші фрагментів хромосомної ДНК, а також здійснювати обмін між точно визначеними фрагментами генів й інших послідовностей нуклеїнових кислот. У всіх цих реакціях, як правило, використовуються високоочищені препарати нуклеїнових кислот і ферментів нуклеїнового обміну.

Конструювання рекомбінантних молекул здійснюється за допомогою цілого арсеналу ферментів – обов'язкового й незамінного інструменту практично всіх етапів цього складного процесу.

### **2.4.1. Ферменти генної інженерії**

У генетичній інженерії використовують ферменти, отримані з бактерій або клітин тварин, що культивуються *in vitro*, і заражені вірусами. Ці ферменти дозволяють проводити різні маніпуляції з молекулами ДНК: розрізати у певних місцях, з'єднувати різні за походженням фрагменти, синтезувати нові послідовності, що не існують у природі та ін.. До основних ферментів генної інженерії належать: ДНК-полімерази; РНК-полімерази; рестриктази; лігази;

зворотна транскриптаза або ревертаза і нуклеази.

**ДНК-полімерази.** В основі *реплікації* ДНК (створення копій, самоподвоєння) покладено принцип компліментарності – спарування певних нуклеотидних основ (гуанін до цитозину, аденін до тиміну) і матричний спосіб синтезу дочірньої ДНК. Реплікація починається з певної ділянки дволанцюгової молекули ДНК (*реплікаційної вилки*) і здійснюється одночасно у двох ланцюгах, що поступово роз'єднуються. Дочірній ланцюг синтезується за допомогою ферментів – ДНК-полімераз (див. розділ 2.1).

У клітинах кишкової палички *E. coli* знайдено три різних ДНК-полімерази, які розрізняються за швидкістю каталізу реакції синтезу нових ланцюгів ДНК, а також за нуклеазною активністю.

Швидкість реплікації в хромосомах прокариот становить 1000 нуклеотидів за секунду, а для еукаріот – близько 100 нуклеотидів.

ДНК-полімераза I – не є основним ферментом реплікації, але вона володіє функцією корекції, оскільки вилучає нуклеотиди, що були включені у ланцюг помилково. Функції ДНК-полімерази II ще не з'ясовані. Активність цього ферменту низька і становить лише 5% активності ДНК-полімерази I.

Головним білком при синтезі і реплікації нового ланцюга ДНК хромосоми є ДНК-полімераза III, що є дійсним ферментом реплікації хромосом. Молекули цього ферменту полімеризують до 15000 нуклеотидів за хвилину за температури 37°C.

**РНК-полімерази.** Незважаючи на високу ферментативну активність, ДНК-полімерази не здатні ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль виконують РНК-полімерази. Фермент РНК-полімераза знаходить промотори, активізує матрицю ДНК і відбувається локальне розплетення подвійної спіралі ДНК. Однак, основна роль РНК-полімераз полягає у каталізі процесу транскрипції (тобто створенні РНК на підставі ланцюгу ДНК). У прокариот процес транскрипції каталізує одна РНК-полімераза, а в еукаріот – три: РНК-полімераза I бере участь у біосинтезі високомолекулярних рибосомних РНК, РНК-полімераза II – у процесі транскрипції генів, що кодують білки, а РНК-полімераза III – у синтезі низькомолекулярних РНК (див. розділ 2.3.1).

**Рестриктази.** Ферменти цього типу були відкриті внаслідок вивчення механізму явища, яке дістало назву «*рестрикція* (обмеження), що контролюється господарем» (*host-controlled restriction*). У 50-х роках попереднього століття було встановлено, що

здатність бактеріального вірусу (*фагу*) до росту на певних бактеріальних культурах може залежати від штаму, в якому цей фаг розмножувався останнім разом.

Експериментами із радіоактивно міченим бактеріофагом виявили, що обмеження росту (рестрикція) фага пов'язане із ферментативною деградацією його ДНК у бактеріальній клітині. Клітинна ДНК захищена від деградації штамоспецифічною модифікацією, яка полягає у метилуванні нуклеотидів. Ці результати дали можливість запропонувати гіпотезу біохімічних механізмів рестрикції і модифікації. Відкриття ферментів рестрикції – ендодезоксирибонуклеаз, або *рестриктаз*, – і ферментів модифікації – ДНК-метилтрансфераз, що називають *ДНК-метилазами*, – повністю її підтвердило.

Рестриктази розпізнають певні послідовності нуклеотидів (*сайти рестрикції*) і розрізають дволанцюгову ДНК на фрагменти. Модифікація полягає у метилуванні певних основ у послідовності, які розпізнає сполучена рестриктаза; тим самим забезпечується захист даної ділянки ДНК від впливу рестриктази. Одночасне існування в клітині цих двох ферментативних активностей (так звана *R-M-система*) запобігає гідролізу власної нуклеїнової кислоти. Чужорідна ДНК, потрапляючи у бактеріальну клітину, є субстратом для обох ферментів.

Назва рестриктаз складається з початкових літер латинської назви виду бактерій, з якого був виділений фрагмент, наприклад, *Eco* – *E. coli*. У тому разі, коли різні за специфічністю дії рестриктази присутні в клітинах різних штамів одного виду бактерій, у назву рестриктази вводять додаткову букву, наприклад, рестриктази *Hinc* і *Hind* виділені з бактеріальних клітин *Haemophilus influenzae*, штами *c* і *d*. Цифри, наступні за літерними позначеннями, відображають послідовність відкриття відповідних рестриктаз у клітинах бактерій одного виду, наприклад, *Hae* I, *Hae* II и *Hae* III із *H. aegypticus*.

Залежно від характеру розрізання рестриктази поділяються на три групи. Рестриктази I типу розрізають молекулу ДНК у будь-якому місці й не мають певного сайту рестрикції. Ці рестриктази неможливо використовувати для вирішення завдань генної інженерії.

Рестриктази II типу мають певні сайти рестрикції, розпізнають певну послідовність нуклеотидів і гідролізують ланцюг усередині сайту. Сайти рестрикції рестриктаз II типу наведено симетричними за повороту на 180° послідовностями – *поліндромами*:

5' GAATTC 3'

3' CTТААG 5' – сайт рестрикції рестриктази *EcoR I*

5' TAGA 3'

3' ATCT 5' – сайт рестрикції рестриктази *Taq I*

Рестриктази II типу розрізняються залежно від розміру сайту рестрикції і довжини отриманих фрагментів:

1 – дрібно розрізані – сайт рестрикції складаються з 4 пар нуклеотидів (п.н.);

2 – середньо розрізані – сайт рестрикції – 6...8 п.н.;

3 – крупно розрізані – сайт рестрикції – 10...14 п.н.

Рестриктази II типу розщеплюють послідовність ДНК по-різному. Одні вносять розрив по осі симетрії послідовності, яку розпізнають, а інші – зі здвигом, з утворенням «сходинки».

У першому випадку створюються так звані «тупі кінці»:

5' TA ↓ GA 3'

5' GT T ↓ AAC 3'

3' AT ↑ CT 5' *Taq I*

3' CAA ↑ TTG 5' *Hinc I*

Якщо точки розщеплення протилежних ланцюгів ДНК зміщені одна відносно іншої у сайті рестрикції, то кінці ДНК, що утворюються внаслідок рестрикції, містять виступаючі одноланцюгові ділянки. Оскільки такі ділянки комплементарні самі собі і одна одній і можуть між собою взаємодіяти, їх часто називають «липкими кінцями».

5' G ↓ AATTC 3'

5' C ↓ CGG 3'

3' CTТАА ↑ G 5' *EcoR I*

3' GGC ↑ C 5' *Hpa II*

Послідовність нуклеотидів, що створюють «липкі» кінці, є унікальними для кожного такого сайту рестрикції. Внаслідок цього рестрикційні фрагменти ДНК, що утворилися під дією даної рестриктази, в суміші з'єднуються один з одним лише в точно визначеній вихідній послідовності, яка задається унікальними послідовностями нуклеотидів у «липких» кінцях рестрикційних фрагментів ДНК.

Фрагменти з «тупими» кінцями можуть бути з'єднані незалежно від того, якою рестриктазою вони були створені. Фрагменти з «липкими» кінцями більш сприятливі для створення рекомбінантних ДНК, оскільки лігаза забезпечує з'єднання фрагментів без перешкод.

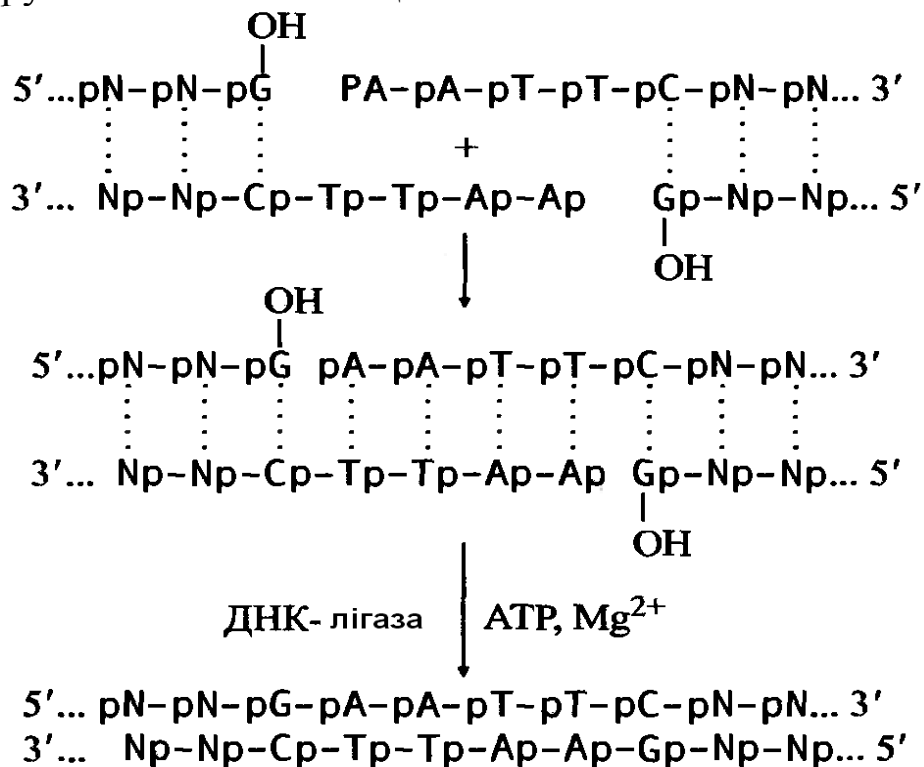
Рестриктази III певним чином подібні до рестриктаз I. Вони розпізнають несиметричні послідовності завдовжки 5...6 п.н. і розщеплюють ДНК на відстані 24...27 п.н. від сайту рестрикції, при цьому створюються одноланцюгові кінці завдовжки 2...3 нуклеотиди. Дія ферментів даного класу *in vitro* не забезпечує вичерпний гідроліз молекули ДНК.

**ДНК-метилази.** Більшість штамів *E. coli* містить два типи ферментів, що метилірують ДНК: *dam*- і *dcm*-метилази. Перша здійснює перенесення метильних груп до N-положення аденіну в послідовності GATC. У такому разі багато рестриктаз (наприклад, *BclI*, *MboI* або *ClaI*), до складу сайтів рестрикції яких входить дана метилірована послідовність, перестають розщеплювати ДНК у цих сайтах. Аналогічний вплив на деякі рестриктази, наприклад, *EcoRII*, має і *dcm*-метилаза. ДНК-метилази бактеріальних систем рестрикції й модифікації (**R-M**-система) застосовують для блокування *in vitro* відповідних сайтів рестрикції на фрагментах ДНК, що досліджуються з метою одержання під дією гомологічних рестриктаз фрагментів більших розмірів.

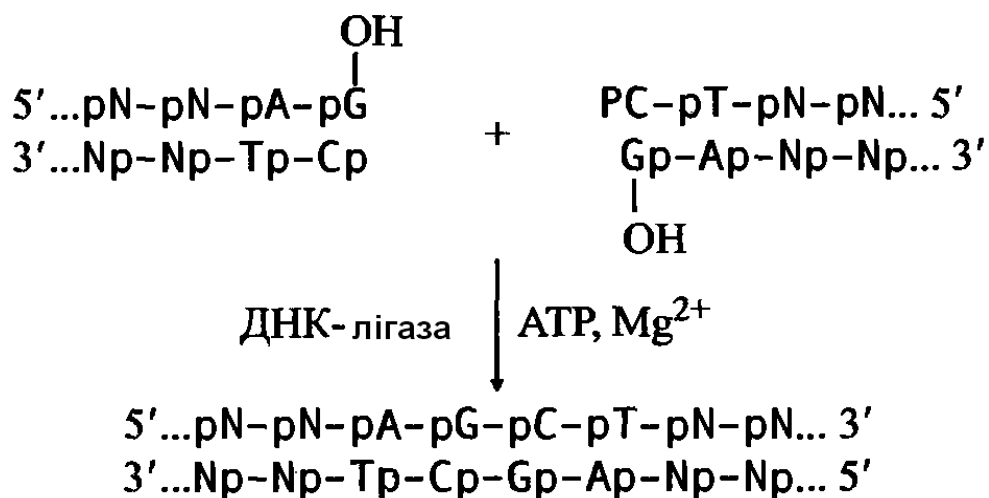
**Лігази.** У 1961 р. М. Мезельсон і Дж. Вейгл на прикладі фага  $\lambda$  показали, що рекомбінація включає розрив і наступне відновлення молекул ДНК. Ця робота доала імпульсу для пошуку ферментів, які беруть участь у процесі рекомбінації. Незабаром при дослідженнях фагів  $\lambda$  і T4 було виявлено ферменти, що необхідні для здійснення фагових рекомбінацій. У 1967 р. незалежно у декількох лабораторіях було знайдено фермент, який називають ДНК-лігазою, що каталізує синтез фосфодієфірного зв'язку в дволанцюговій ДНК.

Створення фосфодієфірних зв'язків у одноланцюгових розривах дволанцюгової ДНК за допомогою ДНК-лігаз є, поряд з рестрикцією, одним із найважливіших етапів одержання рекомбінантних ДНК *in vitro*. Найбільше застосування в генно-інженерних дослідженнях знаходить ДНК-лігаза бактеріофага T4. T4-ДНК-лігаза здійснює з'єднання фрагментів дволанцюгової ДНК, що мають комплементарні «липкі» або «тупі» кінці. З механізму реакції виходить, що необхідною умовою протікання лігирування є наявність 5'-кінцевого фосфату й 3'-кінцевого гідроксилу в точках розриву ланцюгів ДНК. При цьому ефективність з'єднання фрагментів ДНК по «тупих» кінцях T4-ДНК-лігазою зростає за наявності T4-РНК-лігази, що здійснює ковалентне з'єднання 5'-кінців одноланцюгових ДНК або РНК із 3'-кінцями одноланцюгових нуклеїнових кислот.

Лігирування «липких кінців»:



Лігирування «тупих кінців»:



ДНК-лігаза фага Т4 забезпечує ковалентний зв'язок будь-яких дволанцюгових фрагментів ДНК, для яких є можливість стикувати 5'- і 3'- кінці. Тому вона є одним з найважливіших ферментів, на використанні яких засновані сучасні методи рекомбінації молекул ДНК *in vitro*.

**Зворотна транскриптаза (ревертаза).** Під час досліджень інфекційних часточок вірусу саркоми Рауса було встановлено, що в них міститься фермент, аналогічний ДНК-полімеразі, але

синтезуючий ДНК не на підставі ланцюга ДНК, а на ланцюга РНК. У цьому разі інформація передається у зворотному напрямку, тобто від РНК до ДНК.

Біологічна роль ревертази полягає в синтезі копій ДНК з геномів РНК у деяких РНК-вмістних вірусів. Віруси, спадкова інформація в яких закодована в РНК, але не в ДНК, мають назву **ретровіруси**. Зворотна транскриптаза в ретровірусах здатна синтезувати за матрицею РНК комплементарний до неї ланцюг ДНК, руйнувати саму РНК, а потім на підставі матриці ДНК синтезувати аналогічний вірусний РНК комплементарний ланцюг ДНК. Після цього здійснюється експресія гена, тобто транскрипція з ДНК на РНК і трансляція, під час якої створюються вірусні білки.

Таким чином, у ретровірусах передача генетичної інформації відбувається за схемою:



Слід підкреслити, що процеси, які відбуваються у ретровірусах, не суперечать головній догмі молекулярної генетики, яка полягає в тому, що принципова схема передачі генетичної інформації здійснюється шляхом ДНК  $\rightarrow$  РНК  $\rightarrow$  білок, оскільки початкова РНК руйнується, а створення вірусних білків відповідає головній догмі.

**Нуклеази** – це гідролітичні ферменти, що розщеплюють нуклеїнові кислоти. За механізмом розщеплення субстратів нуклеази поділяють на екзо- і ендонуклеази. *Екзонуклеази* здійснюють послідовне відщеплення моно- або невеликих олігонуклеотидів з кінців молекул ДНК або РНК, у той час як *ендонуклеази* вносять у молекули нуклеїнових кислот внутрішні розриви. Зокрема, до ендонуклеаз належать численні рестриктази, які розглянуто вище. Деякі нуклеази мають більш широку специфічність і можуть гідролізувати як РНК, так і ДНК, а також одночасно виявляти ендо- і екзонуклеазну активності. Нуклеаза *Bal31* з *Alteromonas aspejiana* послідовно відщеплює окремі моно- і олігонуклеотиди з 5'- і 3'-кінців дволанцюгових ДНК, укорочуючи обидва ланцюги ДНК майже з однаковою швидкістю. При цьому нуклеаза *Bal31* гідролізує і одноланцюгові ДНК.

Екзонуклеаза III *E. coli* каталізує послідовне відщеплення 5'-нуклеотидів із дволанцюгових ДНК у напрямку 3' $\rightarrow$ 5'.

Екзонуклеаза фага  $\lambda$  каталізує послідовне відщеплення 5'-мононуклеотидів у дволанцюгових ДНК за наявності в них 5'-кінцевих фосфатних груп. Її використовують для одержання одноланцюгових молекул ДНК з метою їх наступного секвенування.

Нуклеаза *S1* з *Aspergillus oryzae* специфічно розщеплює одноланцюгові молекули ДНК із утворенням 5'-фосфорильованих моно- і олігонуклеотидів.

**Термінальна трансфераза.** У 1962 р. Ф. Боллум знайшов у тимусі теляти незвичайний фермент, який називають кінцевою дезоксинуклеотидилтрансферазою, або *термінальною трансферазою*. Даний фермент каталізує послідовне приєднання дезоксинуклеотидів до 3'-ОН-кінця молекули ДНК. Залежно від кофакторів (йонів  $Mg^{2+}$  або  $Co^{2+}$ ) термінальна трансфераза здатна приєднувати нуклеотиди як до одноланцюгової, так і дволанцюгової молекули ДНК по «липких» і навіть по «тупих» 3'-ОН-кінцях. За введення в реакцію, що регулюється термінальною трансферазою, дезоксинуклеотидів лише одного типу, наприклад, аденіну (А), створюються молекули ДНК, що містять гомополімерні одноланцюгові 3'-кінці – (*polyA*-). Так само можливо добудувати іншим молекулам ДНК гомополімерні 3'-кінці, що комплементарні першим, наприклад, тиміну (Т), з утворенням (*polyT*-). Змішування одержаних препаратів ДНК за певних умов може приводити до формування гібридних молекул ДНК. Саме за допомогою кінцевої дезоксинуклеотидилтрансферази у 1972 р. було здійснено перший експеримент з рекомбінації молекул ДНК *in vitro*.

## 2.4.2. Будова рестрикційних карт

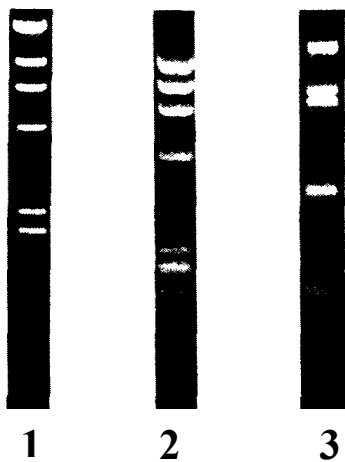
Ферменти рестрикції стали ефективним інструментом досліджень. Вони дозволяють перетворювати молекули ДНК великих розмірів у набір фрагментів (*рестриктів*) довжиною від декількох сотень до декількох тисяч основ. За допомогою методу електрофорезу в агарозному гелі фрагменти ДНК, що розрізняються за розмірами, можна розділити, а потім досліджувати кожен рестрикт окремо. Розподіл молекул ДНК засновано на тому, що фрагменти різної довжини рухаються із різною швидкістю. У розчинах ДНК існує у вигляді аніону і за накладання електричного поля, починає рухатися до позитивно зарядженого кінця.

Однак, у розчині здійснити процедуру відокремлення фрагментів ДНК неможливо, тому як носія використовують гель-



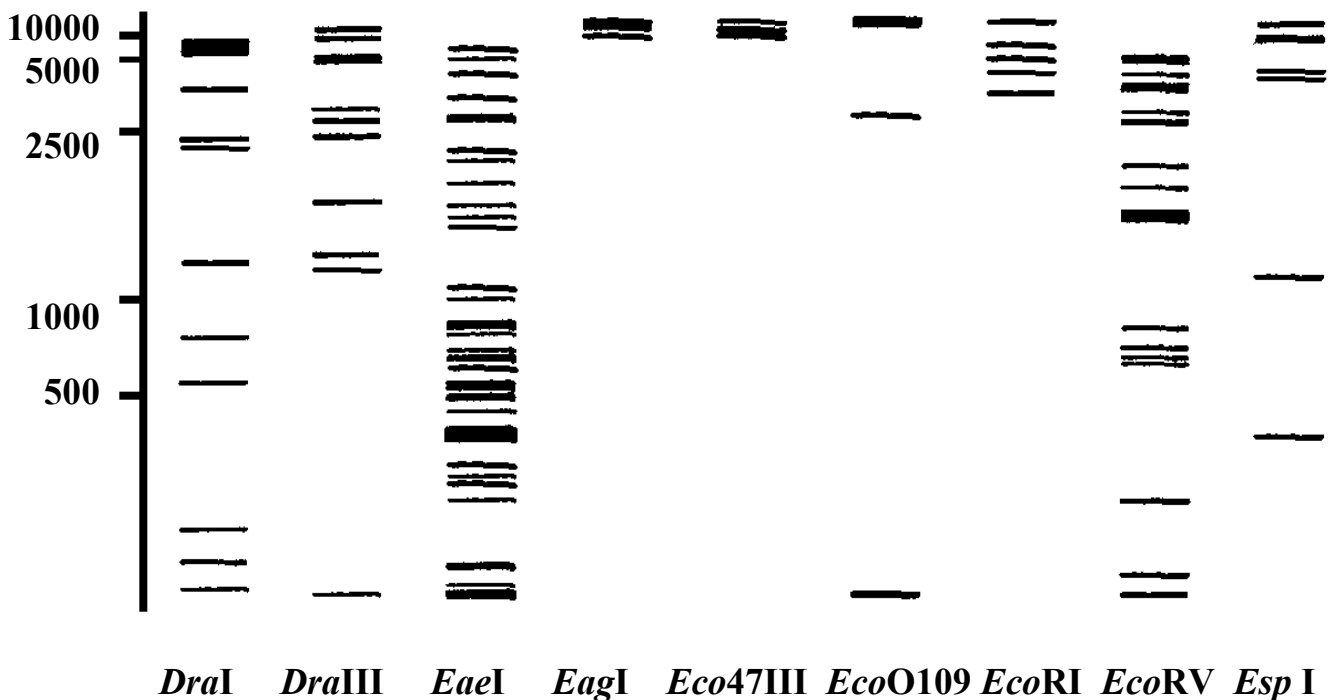
концентрований розчин полімеру.

Короткі рестриктази мігрують значно швидше, ніж довгі. За відносно високою концентрацією агарози великі фрагменти зовсім не здатні проникати у гель. Під час міграції рестрикційні фрагменти не деградують, їх можна *елюювати* (вимивати) у вигляді біологічно активних дволанцюгових молекул. За введенні гелі барвників, що здатні зв'язуватися із ДНК, створюється набір смуг, кожна з яких відповідає певному рестрикту, молекулярну масу якого можна визначити за допомогою каліброваної кривої, що була попередньо побудована за використання ДНК з відомими молекулярними масами (рис. 13, 14).



**Рис. 13. Результати гелі-електрофорезу фрагментів ДНК, що отримані за розщеплення рестриктазами:**

- 1 – ДНК фага  $\lambda$ ; рестриктаза – *Hind* III;
- 2 – ДНК фага  $\phi$ X 174; рестриктаза – *Hae* III;
- 3 – ДНК плазмиди pBR322; рестриктаза – *Bst*NI



**Рис. 14. Схематичне зображення фрагментів ДНК фага  $\lambda$ , отриманих під дією різних рестриктаз (на шкалі вказані розміри фрагментів)**

Використання електрофорезу для розподілу рестрикційних фрагментів дає можливість отримувати *рестрикційні карти*. Перша карта була отримана для вірусу *SW 40* (вірус мавпи, що викликає злоякісну трансформацію), який містив 5423 пари основ. Використовували рестриктазу *Hind II*, що розщеплює кільцеву ДНК вірусу на 11 фрагментів. Проведення аналогічних досліджень за використання іншої рестриктази і зіставлення отриманих результатів дозволили створити рестрикційну карту, в якій вказані порядок розташування сайтів рестрикції.

Обробка зразка ДНК певною рестриктазою II класу завжди дає один той самий набір фрагментів – за умовою, що розщеплення відбувається по всіх сайтах розпізнавання. Якщо використовувати декілька ферментів рестрикції і спочатку обробляти ДНК кожної з рестриктаз окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК. Тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції вздовж молекули. Визначивши розмір отриманих фрагментів за допомогою гель-електорофезу, можна знайти положення сайтів рестрикції (здійснити *картирування*).

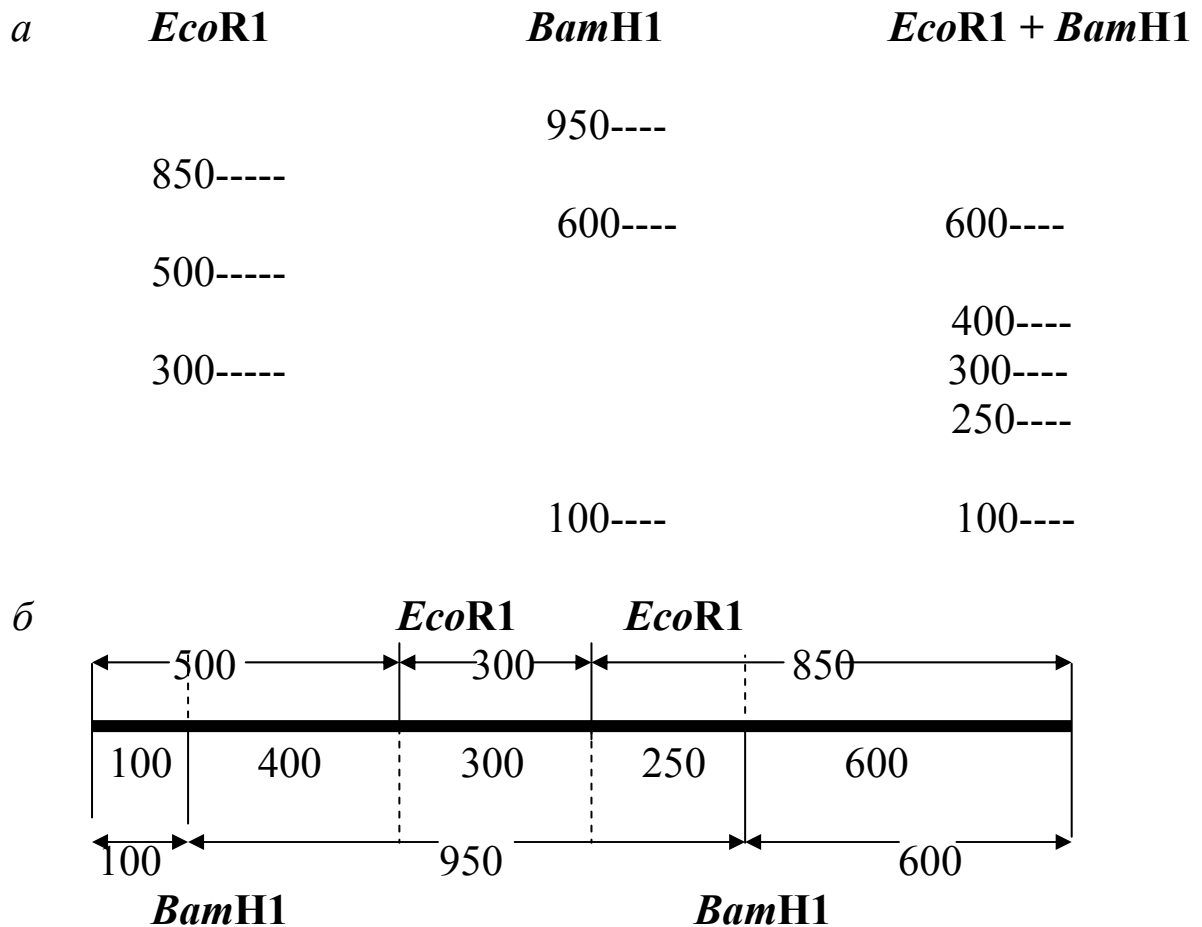
Для побудови рестрикційних карт, необхідно порівняти розміри фрагментів, що отримані за розподільною рестрикцією, тобто рестрикції, що відбулися під впливом кожної з рестриктаз окремо, і за рестрикції сумішшю ферментів. На рисунку 15, *a* вказано розміри фрагментів, що отримані внаслідок розщеплення ДНК даними рестриктазами та їх сумішшю. З отриманих даних бачимо, що вказана ділянка ДНК має по два сайти для *EcoRI* і *BamHI*.

### 2.4.3. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК

**Секвенування** – визначення нуклеотидної послідовності. Методи, що надали можливість ідентифікувати генетично важливі ділянки ДНК, мають велике значення. До основних методів секвенування належать хімічний і ферментативний.

**Хімічне секвенування** засновано на вибірковій хімічній деградації нуклеотидів. Метод розроблений у 1976 році А. Максамом і В. Гілбертом. Для цього методу необхідно отримати одноланцюгову молекулу ДНК, на одному з кінців якої роблять радіоактивну позначку за допомогою ізотопу фосфору  $^{32}\text{P}$ , препарат позначеної ДНК поділяють на чотири порції і кожен обробляють реагентом, який специфічно руйнує одну або дві з чотирьох основ. Необхідно

підібрати умови реакції таким чином, щоб на одну молекулу було лише декілька пошкоджень. За обробки піперидином в ДНК утворюється розрив у тому місці, де була зруйнована основа.



**Рис. 15. Картирування сайтів рестрикції:**

*a* – результати гель-електрофореза фрагментів ДНК; *б* – рестрикційна карта, що побудована на підставі даних гель-електрофорезу

В результаті створюється набір позначених фрагментів, довжина яких визначається відстанню від зруйнованої основи до кінця молекули. Фрагменти, що створилися в усіх чотирьох реакціях, піддають електрофорезу на чотирьох доріжках в акриламідному гелі, потім роблять радіографію, і фрагменти, що містять радіоактивну позначку, залишають «відбитки» на рентгенівській плівці. За їх положенням можна визначити, на якій відстані від позначеного кінця була зруйнована основа. Таким чином, на підставі набору смуг на рентгенівській плівці визначають нуклеотидну послідовність фрагменту, що аналізується (рис. 16).

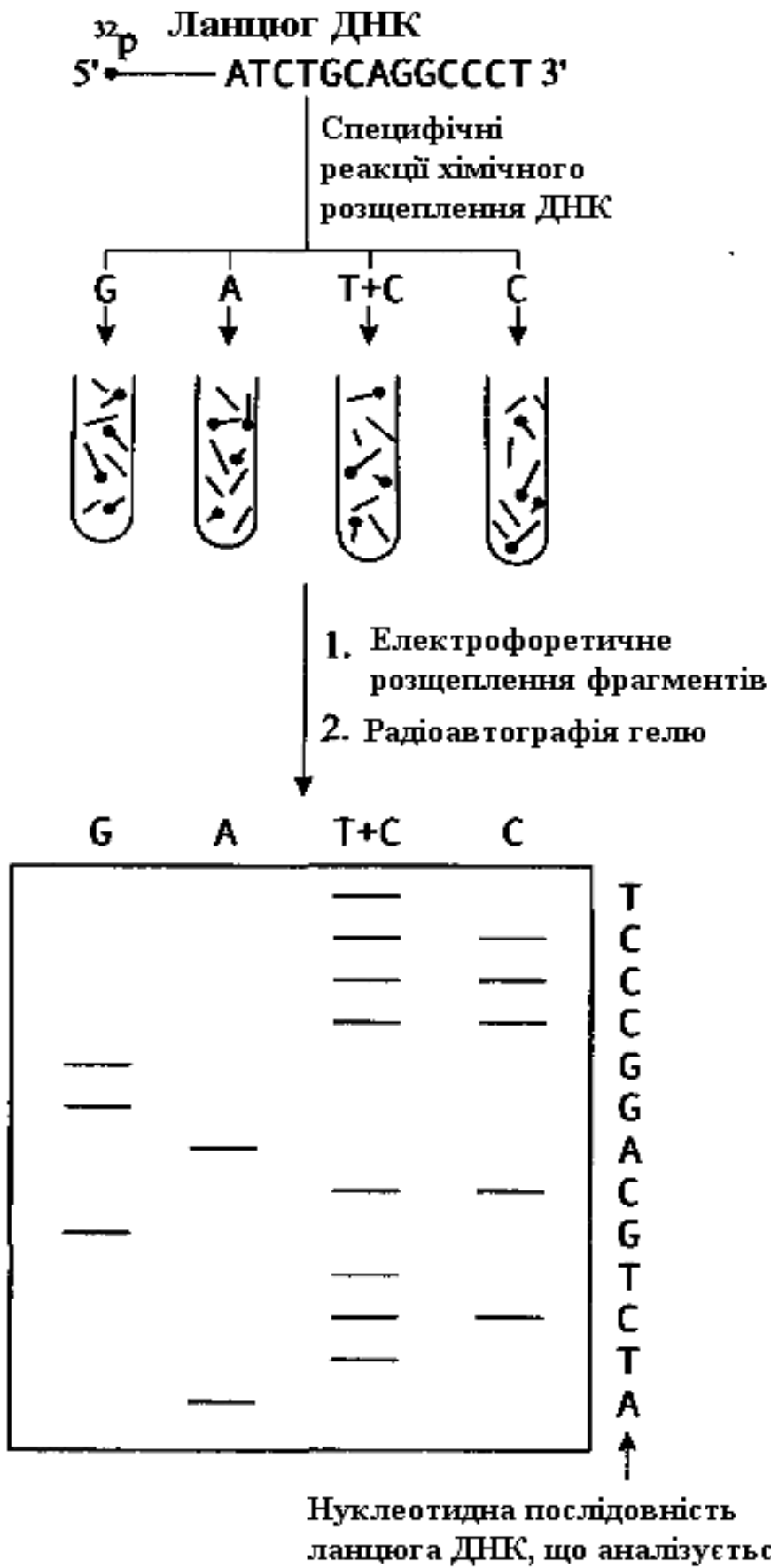


Рис. 16. Схема методу секвенування за Максамом-Гілбертом

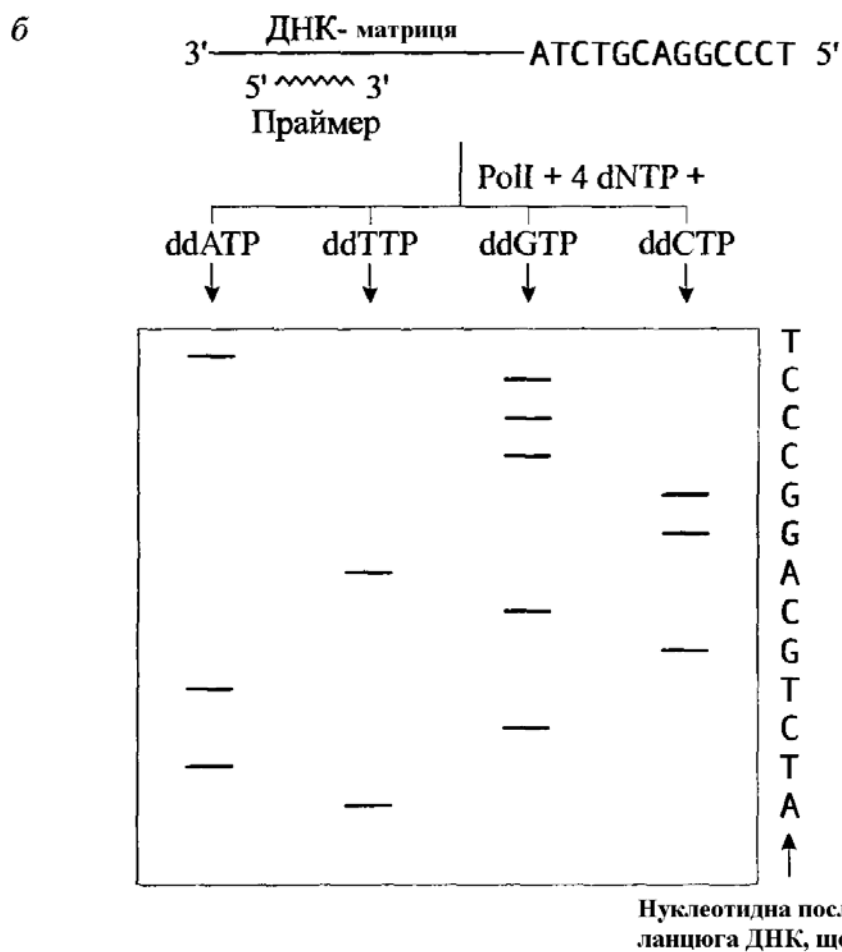
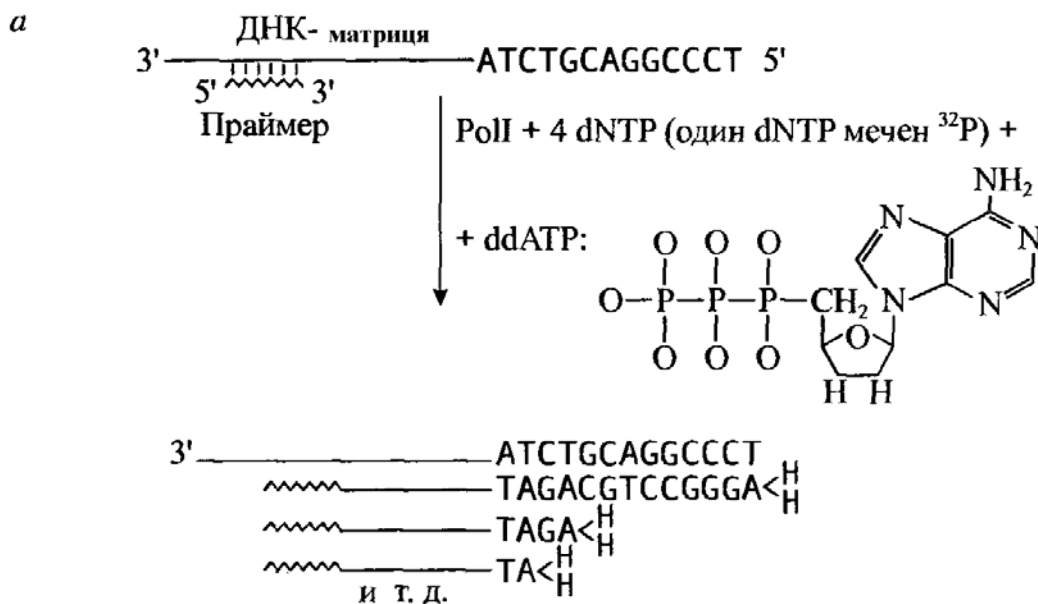
За допомогою цього методу вдалося встановити багато послідовностей різноманітних ДНК, але він має ряд недоліків, що пов'язані з тривалістю і трудомісткістю процедур.

У наш час найбільш широко використовується *метод ферментативного секвенування або метод секвенування шляхом термінації* (зупинки синтезу) ланцюга, запропонований Ф. Сенгером у 1977 р. В основі методу Сенгера лежить принцип реплікації комплементарного ланцюга ДНК на одноланцюговій матриці, при тому що під час реплікації відбувається термінація – припинення синтезу дочірнього ланцюга у різних місцях, а наступний ланцюг знову починає синтезуватися від початку матриці до наступної термінації. Основним моментом ферментативного секвенування є термінація синтезу ланцюга, що будується. Агентами термінації, які викликають зупинку реплікації, є дідезоксинуклеотиди (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ) – це нуклеотиди позбавлені 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглеводних атомах цукрового кільця і тому подовження ланцюга, що відбувається за рахунок приєднання чергового нуклеозидтрифосфату до гідроксильної групи, припиняється.

Оскільки метод секвенування заснований на процесі реплікації ДНК, то основним ферментом є ДНК-полімераза. За наявності одноланцюгової ДНК-матриці, короткого полінуклеотидного праймера і нуклеотидів за принципом компліментарності відбувається синтез іншого ланцюга ДНК. При цьому подовження ланцюга здійснюється до того часу, коли замість дезоксинуклеотиду не приєднається дидезоксинуклеотид. Приєднання останнього викликає зупинку синтезу (рис. 17).

У пробірках збирають чотири реакційні суміші, що мають однаковий склад: фрагмент ДНК-матриці, в якій визначають нуклеотидну послідовність, чотири дезоксинуклеотиди достатньої кількості для здійснення росту комплементарного ланцюга, радіоактивно позначений короткий праймер, комплементарний фрагменту ДНК-матриці, з якого ДНК-полімераза подовжує синтез. У кожному пробірці потім додають лише один з дидезоксинуклеотидів. У всіх пробірках буде відбуватися термінація ланцюга, що синтезується, лише в тому місці, де ДНК-полімераза приєднуватиме дидезоксинуклеотид, який був доданий у реакційну суміш, тобто в одній пробірці синтез припиняється за приєднання до комплементарного ланцюга ддАТФ, в іншій – ддГТФ і т.д. Оскільки

обрив ланцюга відбувається у випадкових місцях, то створюється набір фрагментів усіх можливих довжин, починаючих з праймера до кінця фрагменту, що досліджується.



**Рис. 17. Схема методу секвенування за Сенгером:**  
*a* – припинення росту ланцюга ДНК; *б* – радіоавтографія гелю

Фрагменти ДНК, що були отримані, розподіляють у поліакриламідному гелі (з точністю до одного нуклеотиду), проводять радіографію і на підставі побаченого розподілу фрагментів у чотирьох пробірках установлюють нуклеотидну послідовність.

Використання флуоресцентних барвників, пов'язаних з нуклеотидами термінації, дозволяє проводити усі реакції в одній пробірці. Крім того, розроблено принципово нові підходи до секвенування, наприклад, секвенування шляхом гібридизації з фіксованими олігонуклеотидними чипами, секвенування з використанням екзонуклеаз та інші. Усі ці методи дозволяють досить швидко вирішувати проблеми секвенування як великих ділянок ДНК, так і будь-яких геномів. Отримані результати вносять у бази даних – банки генів.

Необхідність отримання інформації про послідовність нуклеотидів ДНК усе зростаючих масштабів викликала потребу щодо розгляду питання про автоматизацію процесу секвенування ДНК, оскільки існуючі ручні методи вже не дозволяли справлятися з такими великими обсягами роботи.

Автоматичне секвенування – це, в першу чергу, електрофоретичне розподілення позначених продуктів реакції термінації за допомогою спеціальних приладів – автоматичних секвенаторів ДНК. Автоматизації за допомогою біороботів підлягає також процес напрацювання матриць для їх наступного ферментативного секвенування і проведення реакцій секвенування. Перший автоматичний ДНК-секвенатор було розроблено у 1987 р. фірмою Applied Biosystems (США).

Для позначення знов синтезованих ланцюгів ДНК в умовах термінації за автоматичного секвенування використовують молекулу будь-якої флуоресціюючої сполуки.

Автоматичні секвенатори ДНК керуються спеціально створеними комп'ютерними програмами. Так, наприклад, прилади фірми Applied Biosystems комплектуються програмами збору і аналізу даних.

Сучасні автоматичні секвенатори набагато перевершують людину за продуктивністю, більш того, кожен рік такі автомати вдосконалюють. Усе це веде до того, що секвенування фрагментів ДНК стає простою процедурою, доступною для будь-якої молекулярно-біологічної лабораторії.

Розшифрування великих геномів прокаріотичних і

еукаріотичних клітин потребувало поєднання зусиль різних лабораторій і формування геномних проектів.

У липні 1995 р. була опублікована перша нуклеотидна послідовність повного генома (1830137 п.н.) самостійно існуючого організму – грамнегативної бактерії – *Haemophilus influenzae*.

Першим еукаріотичним організмом, повна послідовність якого (12680000 п.н.) визначена у 1996 р., стали дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Це був результат зусиль значного числа дослідників, що працюють у лабораторіях і великих дослідних центрах країн Західної Європи, США і Японії.

Значні успіхи у розшифруванні послідовності молекул ДНК спричинили те, що у 1990 р. у США була прийнята офіційна програма щодо розшифрування генома людини (*Human Genome Project, HGP*), в межах якої планувалося за вкладення 3 млрд. доларів США завершити секвенування повного генома людини протягом 15 років. Основним виконавцем *HGP* стала компанія *Celera Genomics*. Аналогічні проекти щодо генома людини почали реалізовуватися у Західній Європі, Японії, Росії.

У 2001 р. учасники американської програми *HGP* і Міжнародного консорціуму з секвенування генома людини, що поєднує численні наукові організації США, Великої Британії, Німеччини, Франції, Японії і Китаю, незалежно оголосили про завершення секвенування більшої частини (понад 95%) генома людини. На підставі отриманих даних стало можливим зробити ряд висновків про організацію генома людини.

Комп'ютерний аналіз дозволив виявити 26588 транскрибуючих і транслуючих у білки генів, а також ще до 12 тис. передбачених генів. Екзони займають лише 1,1% генома, в той час як інтрони – 24%. Інша частина геному (75%) представлена міжгенними послідовностями. Число генів, виявлених у генома людини, лише удвічі більше, ніж у нематоди *Caenorhabditis elegans* (табл. 4).

Отримані дані про структуру генома дозволяють значно поширити наше розуміння генетики людини, природи різноманітних спадкових хвороб. Інформація, що накопичується, дозволяє з'ясувати молекулярні механізми патогенного впливу мікроорганізмів, вивчати захисні механізми, що реалізуються людиною, твариною, рослиною у відповідь на певну інфекцію. Це створює базу для ефективної розробки сучасних засобів і методів лікування інфекційних захворювань.



## Приклади секвенування повних геномів різних типів організмів

Організм	Розмір генома, млн. п.н.	Передбачена кількість генів	Рік завершення секвенування
Бактерія ( <i>Haemophilus influenzae</i> )	1,8	1743	1995
Дріжджі ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	12,1	6102	1996
Кільчастий хробак ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	97,0	19099	1998
Рослина ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	100,0	25000	2000
Комаха ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	180,0	13061	2000
Людина ( <i>Homo sapiens</i> )	3000,0	35000...45000	2004

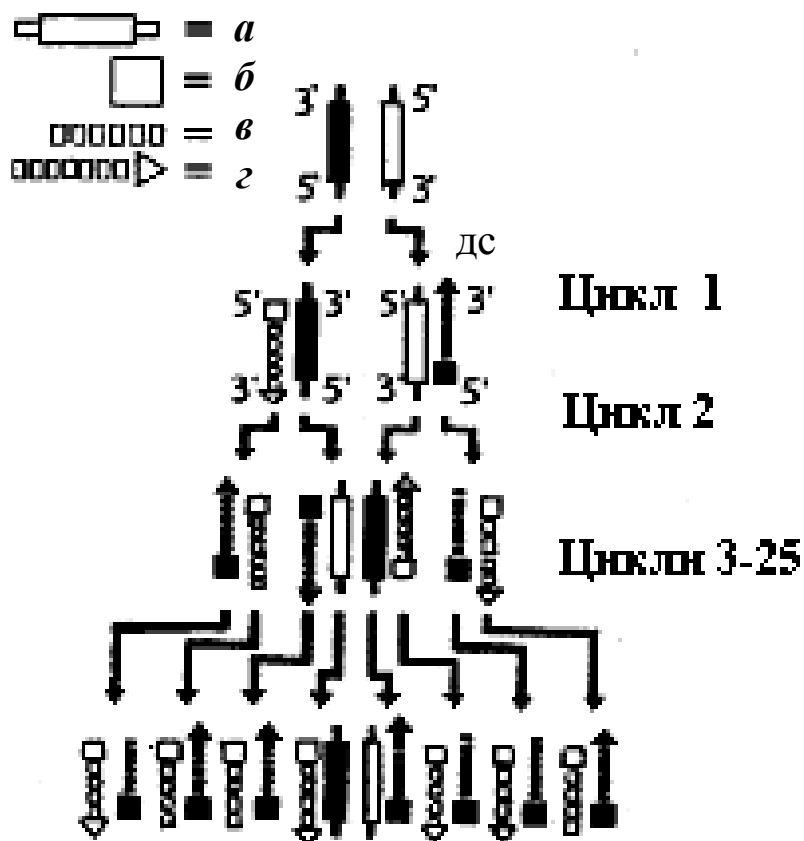
**Полімеразна ланцюгова реакція.** Чисельні (ампліфіковані у мільйон разів) копії певних фрагментів ДНК отримують *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яку поширено використовують у наш час. Вперш її запропонували у 1985 році Р.К. Сейки, С. Шарф, Ф. Фалуна, К.Б. Мулліс, Г.Е. Хорн, Х.А. Ерліх і Н. Арнхейм. ПЛР високо специфічна і чутлива, за її допомогою можна виявити, розмножити і дослідити навіть одиничну копію гена у вихідному матеріалі. Зазвичай 30 циклів ампліфікації протікає протягом трьох годин.

Для здійснення ПЛР необхідно:

- два синтетичних олігонуклеотидних *праймери* (короткі олігонуклеотиди, що гібридизуються із матрицею і є запалом за її копіювання), завдовжки близько 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів, що *фланкують* (оточують) послідовність-мішень, яку розмножують; їх 3'-гідроксильні кінці після *отжигу* (процес утворення дволанцюгових молекул (ДНК-ДНК або ДНК-РНК) з одноланцюгових полінуклеотидних комплементарних ланцюгів) з ДНК повинні бути орієнтовані назустріч один одному;
- ДНК-мішень завдовжки від 100 до ~ 35000 п.н.;
- термостабільна ДНК-полімераза, що не втрачає активності за температури 95°C і вищої;
- чотири дезоксирибонуклеотиди.

Типова ПЛР-ампліфікація складається з багаторазового повторення таких реакцій.

1. *Денатурація*. Перший етап ПЛР полягає в тепловій денатурації зразка ДНК витримуванням його за температури 95°C протягом, що найменше 1 хв. Крім ДНК, в реакційній суміші міститься надлишок двох праймерів, термостабільна ДНК-полімераза *Taq*, що виділена з бактерій *Thermus aquaticus*, і чотири дезоксирибонуклеотида.
2. *Ренатурація*. Температуру суміші повільно знижують, приблизно до 55°C, при цьому праймери спаровуються із комплементарними послідовностями ДНК.
3. *Синтез*. Температуру підвищують приблизно до 75°C – величини, оптимальної для ДНК-полімерази *Taq*. Починається синтез комплементарного ланцюгу ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера (рис. 18).



*Рис. 18.* Схема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР):  
*a* – ДНК-мішень, *b* – праймер у ПЛР, *c* – нова ДНК,  
*z* – напрямок ампліфікації, дс – денатурація і синтез

У першому циклі після денатурації ДНК і зв'язування з нею

праймерів ДНК-полімераза створює дволанцюгові структури, в яких батьківські ланцюги ДНК поєднані із знов синтезованими комплементарними ланцюгами різної довжини, але із фіксованим 5'-закінченням. Уже у другому циклі створюються два ланцюги специфічної послідовності, що мають задані розміри. У третьому циклі ці ланцюги дають начало дволанцюговим детермінованим за розміром фрагментам ДНК. У кожному наступному циклі їх кількість подвоюється і теоретично досягає за 22 цикли, а на практиці – за 30 циклів більше мільйона копій. Вихідні молекули ДНК і структури, що створилися у першому циклі, присутні в реакційній суміші наприкінці ПЛР у незначній кількості.

Для здійснення ПЛР необхідно знати послідовність як найменш 17 п.н. з обох боків дослідного фрагменту ДНК. Зазвичай синтезують два дезоксинуклеотиди довжиною 20...30 основ, які являють собою кінцеві послідовності фрагменту ДНК, що нас цікавить. Використовуючи комплементарні до цих ділянок олігомери – праймери, запускають *ампліфікацію* (процес збільшення копій гену). Надлишкову кількість праймерів змішують з геномної ДНК, а потім послідовно здійснюють реакції денатурації, випалу (ренатурації) і нарощування ланцюга (подовження праймера). Теплова денатурація супроводжується розплітанням подвійної спіралі ДНК. За зниження температури має місце випал олігонуклеотидів, тобто здійснюється гібридизація олігонуклеотидних праймерів із своїми комплементарними послідовностями. Ріст ланцюга праймерів каталізує ДНК-полімераза в присутності дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, і в результаті добудовується новий комплементарний ланцюг ДНК.

За повторних циклів теплової денатурації, випалу і синтезу нові ланцюги ДНК, що утворилися, є шаблонами (матрицями) для праймерів, що викликає експоненціальне нарощування ділянки ДНК, обмеженої праймерами, що входять до складу цих фрагментів.

У разі ампліфікації геномної ДНК з клітин (тканин) хребетних тварин інколи відбувається накопичення фрагментів нез'ясованого походження. Тоді здійснюють серію додаткових ампліфікацій, використовуючи інший набір олігонуклеотидних праймерів.

На перших етапах використовували в ПЛР так звані фрагменти Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, які виявилися термолабільними, і після кожного циклу денатурації необхідно було додавати нову порцію ферменту. Крім того, за пониженої температури випалу

знижувалася специфічність ампліфікації.

Після виділення термостабільних ДНК-полімераз, зокрема, з бактерій *Thermus aquaticus* (*Taq*-полімераза) суттєво збільшилася ефективність ПЛР. *Taq*-полімераза зберігає активність після теплової денатурації ДНК і не виникає необхідності замінювати фермент після кожного циклу. Температурний оптимум реакції становить 70...75°C, що значно підвищує специфічність, кількісний вихід і можливу довжину копій фрагментів ДНК, що ампліфікуються.

Успіх певної ПЛР суттєво залежить від правильного вибору праймерів. Для мінімізації можливості неправильного спарування, праймер повинен відповідати деяким вимогам. Його довжина має бути 17...30 нуклеотидів за вмісту GC-пар близько 50%. Чим менший вміст GC-пар у праймері, тим більшою повинна бути його довжина. Необхідно запобігти появі вторинних структур у праймері і більше трьох-чотирьох однакових нуклеотидів підряд. Праймери, що використовуються в одній реакції, не повинні мати комплементарні ділянки.

Область використання ПЛР велика і постійно розширюється: діагностика генетичних захворювань; виявлення генетичного матеріалу патогенних мікроорганізмів у клінічних зразках; синтез зондів для гібридизації; створення бібліотек кДНК (копійних ДНК) з малої кількості мРНК; мультиплікація ДНК з метою секвенування; спрямований мутагенез та ін.

#### 2.4.4. Методи конструювання рекомбінантних ДНК

**Рекомбінантні** – це ДНК, що створені поєднанням *in vitro* (у пробірці) двох, або більш фрагментів ДНК, отриманих з різних біологічних джерел.

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

**З'єднання за однойменних «липких» кінців.** Деякі рестриктази, наприклад, *Eco RI*, розрізують дволанцюгову ДНК таким чином, що протилежні ланцюги розміщуються зі зсувом один від одного на рівній відстані від центру сайту розпізнавання. Ці комплементарні одна до одної ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок

парування основ.

Парування основ здійснюється лише між комплементарними послідовностями, тому ААТТ-кінці, що створені *Eco RI*, не будуть поєднуватися із АГСТ-кінцями, що створені *Hind III*. Але будь-які два фрагменти (незалежно від походження), що створилися під дією однієї тієї ж самої рестриктази, можуть об'єднатися за рахунок утворення водневих зв'язків між одноланцюговими ділянками комплементарних нуклеотидів (рис. 19).

Однак, після такого з'єднання цілісність подвійної спіралі не відновлюється, оскільки залишається два розриви у фосфодієфірному остові. Для їх відновлення, тобто скріплювання, або лігирування ланцюгів використовують фермент ДНК-лігазу. Цей фермент у живій клітині виконує таку саму функцію – скріплювання фрагментів ДНК, що синтезуються за реплікації. Таким чином, ДНК-лігаза завершує утворення рекомбінантної ДНК. Вперше такі експерименти були здійснені у 1972 р. (П. Берг, США), і було показано, що використання рестриктази, яка створює «липкі» кінці, у поєднанні із ДНК-лігазою може бути основою для створення загального методу рекомбінації.

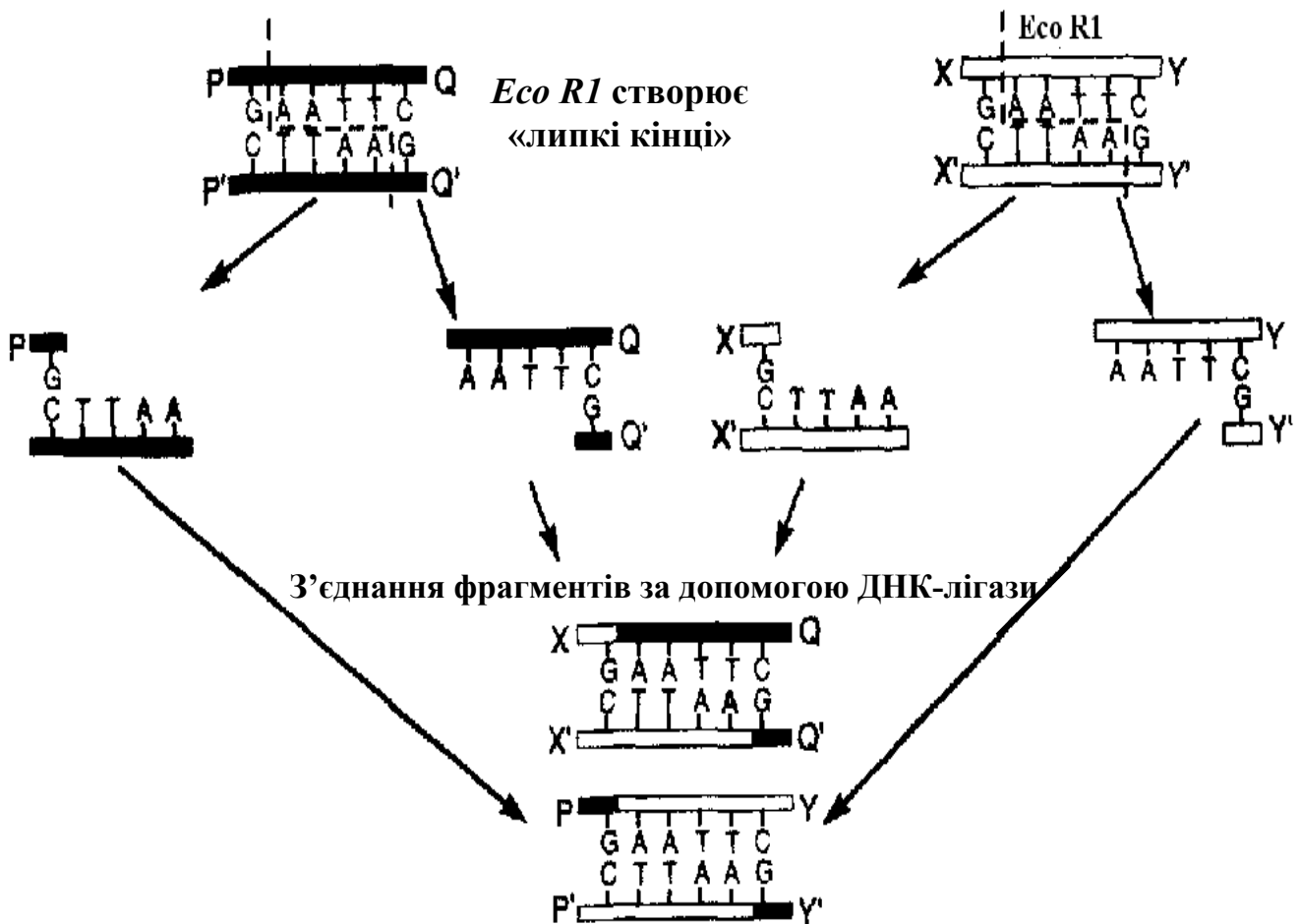


Рис. 19. З'єднання фрагментів за однойменних «липких» кінцях

**З'єднання фрагментів з «тупими» кінцями.** У цьому разі реакція лігирування (скріплювання) має власні особливості. ДНК-лігаза, що кодується фагом T4, здатна з'єднувати дволанцюгові фрагменти, але для ефективного перебігу реакції необхідна наявність високої концентрації фрагментів ДНК з «тупими» кінцями і майже в 10 разів більшої концентрації ферменту. Однак, і в цьому разі ефективність цієї реакції на порядок нижча за ефективність скріплювання по «липких» кінцях.

**З'єднання фрагментів з різнойменними кінцями.** «Липкі» кінці можна ферментативним шляхом з'єднати з молекулою ДНК з «тупими» кінцями. Для цього «затуплюють» «липкі» кінці. Це досягається або відщепленням нуклеотидів «липких» кінців за допомогою фермента нуклеази *S1*, яка руйнує лише одноланцюгову ДНК, або «липкі» кінці добудовують, тобто за допомогою ДНК-полімерази на підставі одноланцюгового «липкого» кінця синтезують комплементарний до нього ланцюг, а потім проводять скріплення фрагментів за допомогою ДНК-лігази.

**Коннекторний метод з'єднання фрагментів ДНК.** Суть методу полягає у приєднанні до кінців одного з фрагментів ДНК одноланцюгового полінуклеотиду, наприклад, полі-А (dA), а до іншого – комплементарного до нього, наприклад, полі-Т (dT) (рис. 20). Процес приєднання ділянок полі-А і полі-Т здійснюється за допомогою ферменту – кінцевої трансферази. Фрагменти, що добудовані таким чином, потім змішують і обробляють ДНК-лігазою. При цьому між фрагментами вбудовуються ділянки  $\frac{AAAAA}{TTTTT}$ . Такі додаткові послідовності можуть впливати на функції молекул, що з'єднуються, і тому завжди, якщо можливо, для отримання рекомбінантних молекул ДНК використовують «липкі» кінці, створені внаслідок дії рестриктаз.

**Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК.** У разі, коли необхідно скріпити фрагменти, що створені різними рестриктазами, які мають різні, тобто не комплементарні один до одного кінці, використовують так звані *лінкери* (або перехідники). Лінкери – хімічно синтезовані олігонуклеотиди, що являють собою сайти рестрикції або їх комбінацію. Існує велика кількість таких генних перехідників. Зрозуміло, що за використання лінкерів потрібно враховувати необхідність дотримання правил експресії генетичної інформації. Часто всередину лінкера розташовують будь-який

регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку пов'язану із рибосомою. В цьому випадку лінкери не лише забезпечують поєднання генів, але й обумовлюють їх експресію. Є лінкери «тупий кінець – липкий кінець».

Лінкерний метод був запропонований Р. Шеллером і його співробітниками у 1977 р. Метод дозволяє досить просто рекомбінувати *in vitro* практично кожні фрагменти ДНК.

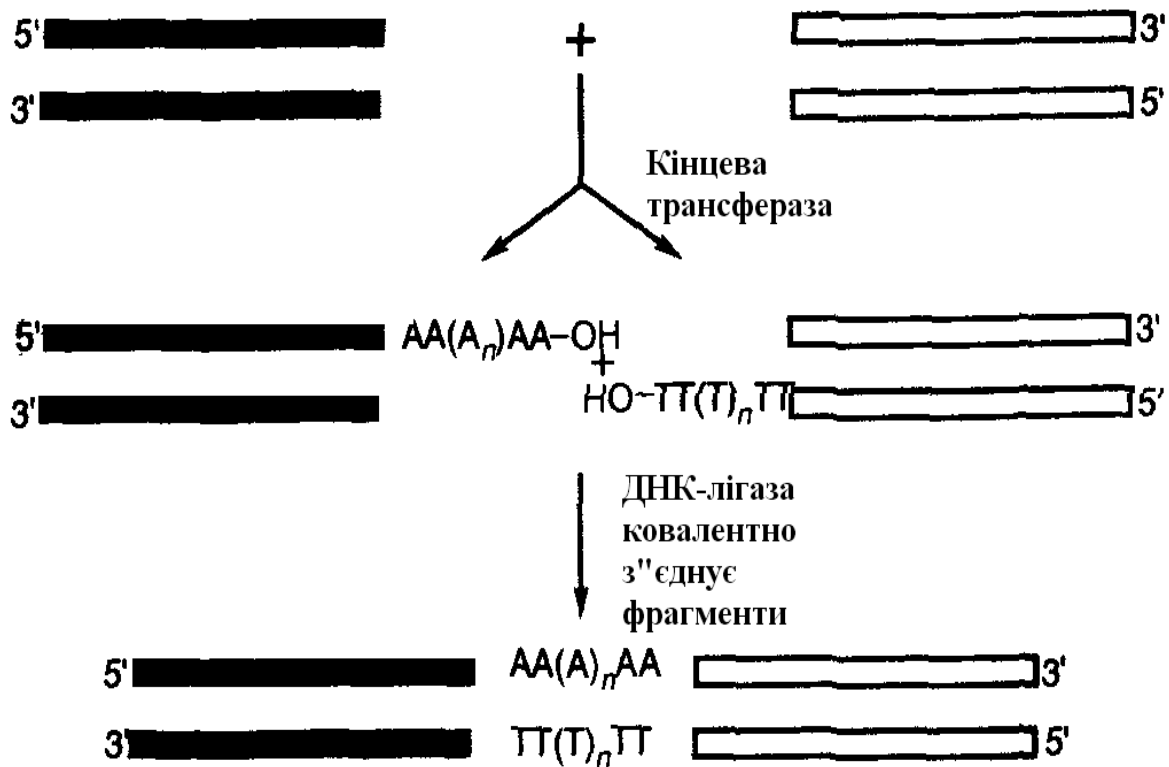


Рис. 20. Коннекторний метод з'єднання фрагментів ДНК

Розроблений підхід передбачає такі операції (рис. 21):

- по тупих або липких кінцях фрагменту ДНК, який необхідно рекомбінувати, за допомогою лігази фага Т4 приєднують короткі синтетичні дволанцюгові сегменти, що містять сайти розпізнавання для певної рестриктази;
- отриманий фрагмент обробляють зворотною рестриктазою, внаслідок чого створюються липкі кінці;
- отриманий фрагмент рекомбінують *in vitro* з іншими молекулами ДНК звичайним методом.

Використання лінкерів робить цей метод рекомбінації фрагментів ДНК *in vitro* універсальним, оскільки початкові фрагменти можна отримувати різними способами.

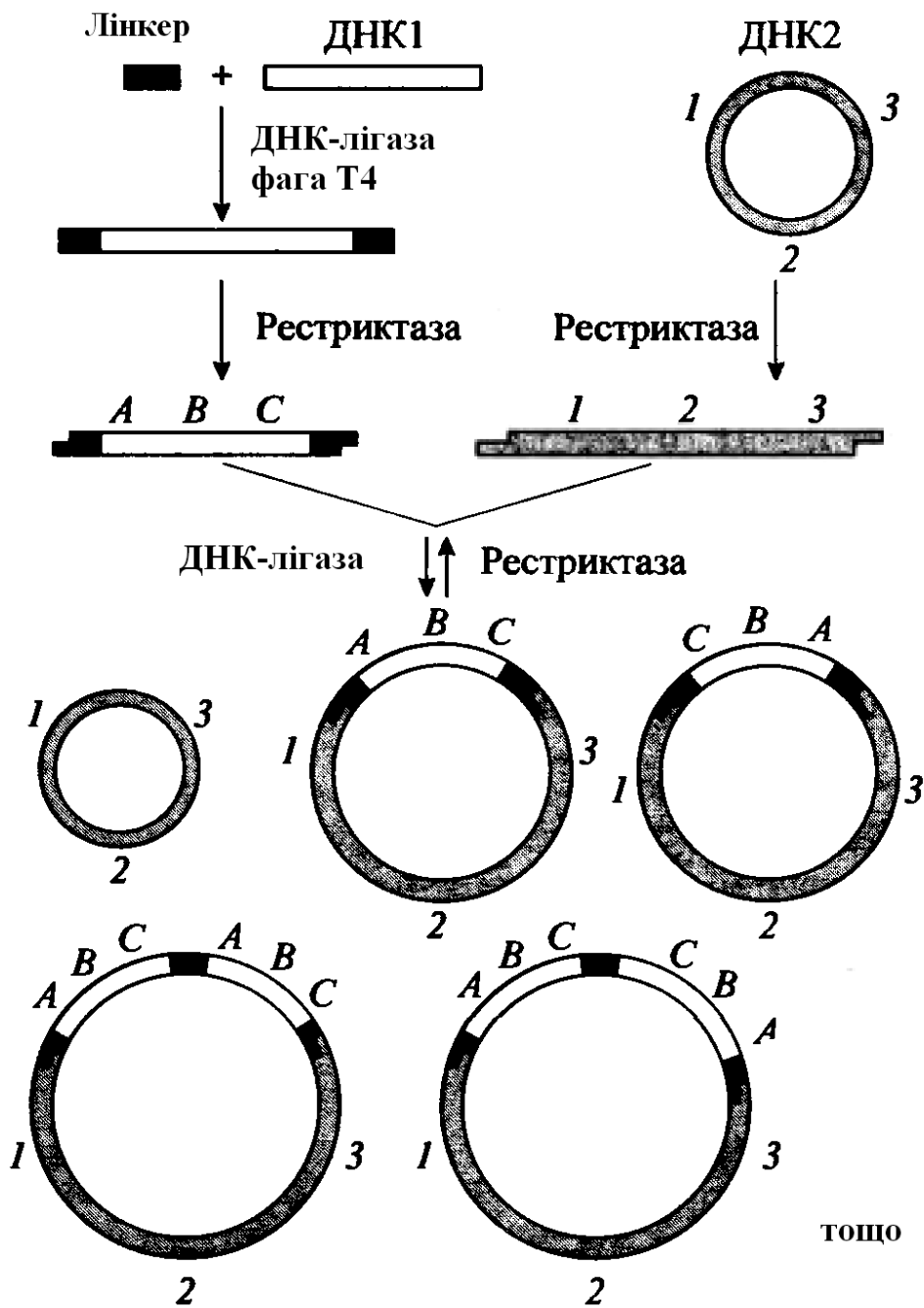


Рис. 21. Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК

Лінкерний метод порівняно із коннекторним більше використовується у генно-інженерних модифікаціях, оскільки він простіший і, крім того, дає можливість легко вилучати вбудований фрагмент із гібридної молекули ДНК, що буває важливим при перенесенні фрагмента в інше генетичне оточення.



## 2.4.5. Векторні молекули

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

**Векторами** називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і (або) трансформацію (перенесення у інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткової генетичної інформації. Як вектори використовують здебільшого плазміди, бактеріофаги, мобільні елементи, віруси тварин. У наш час створено значну кількість векторів, що розрізняються за профілем їхнього використання на декілька типів:

1. Вектори для клонування використовують для *ампліфікації* (збільшення кількості) шляхом реплікації фрагменту ДНК, що вбудований у такий вектор. Для цього найчастіше використовують бактеріальні плазміди і фаги. Для клонування великих фрагментів геноми використовують вектори – штучні бактеріальні та дріжджові хромосоми (*BAC* і *YAC*).
2. Вектори експресії. Їх використовують для аналізу певних послідовностей генів і білкових продуктів, а також для вироблення певного білка. Існує значна кількість систем експресії, особливо для прокаріотичних організмів. Є також вектори для експресії генів у клітинах дріжджів, рослин і тварин. Вектори експресії для еукаріотів завжди містять промотор, здатний працювати у даному типі організму і сайт поліаденілірування ( $\text{poly(A)}$  – хвіст), що складається майже з 200 залишків аденозину. Наявність  $\text{poly(A)}$  – хвоста дозволяє відокремити матричну – мРНК від рибосомальної – рРНК і транспортної – тРНК, а також надає можливість приєднання олігомерів  $\text{oligo(dT)}$ , що ініціюють синтез комплементарних

- ДНК-копій (кДНК) на підставі мРНК за допомогою рестриктази.
3. Вектори для трансформації. Використовують для введення чужорідного фрагменту ДНК у геном реципієнта. Як правило, такі вектори містять специфічні послідовності, що сприяють інтеграцію у геном.

Сучасні векторні системи часто бувають поліфункціональні і поєднують декілька функцій в одному векторі. У складі векторів є маркерний ген, який після проникнення вектора у клітину надає їй фенотип, що свідчить про наявність у клітині вектора. Тобто бажано щоб вектор мав селективну генетичну ознаку. Такими ознаками буває стійкість до антибіотиків, йонів важких металів та температури (рис. 21).

У цілому до векторних молекул висувають такі основні вимоги:

- вектор повинен мати унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз (в кращому разі, по одному для кожної), що надає можливість вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;
- вектор повинен володіти певною ємністю і не виключати вбудованого фрагменту;
- вектор має бути репліконом, тобто здатним до реплікації, в певних клітинах за рахунок послідовності початку реплікації або власної, чи клітини-власника;
- вектор повинен містити послідовність маркерного гена, за допомогою якого можливо здійснити селекцію клітин з векторною конструкцією.

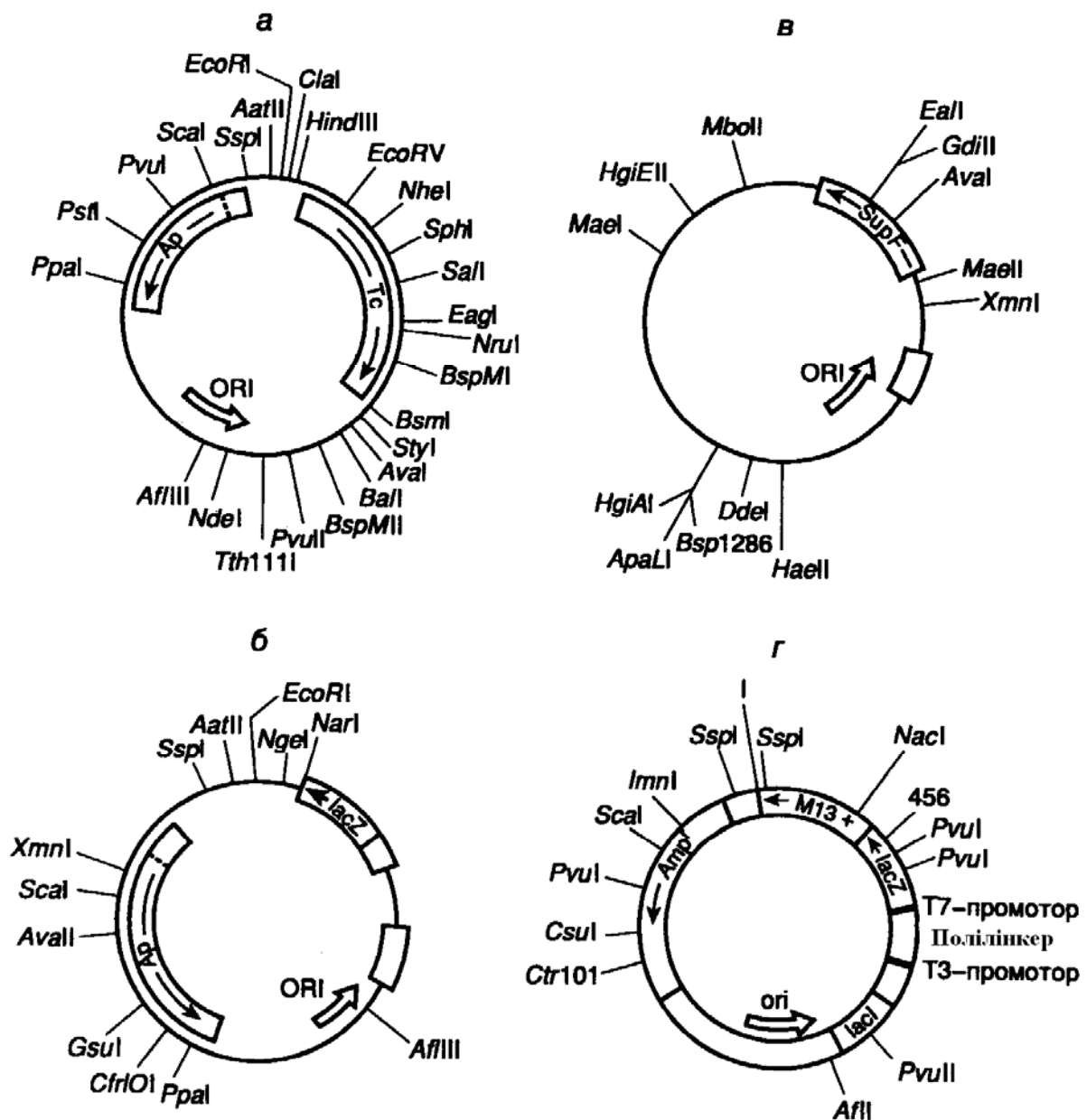
Для конструювання векторів у генній інженерії використовують хромосоми вірусів, фрагменти хромосом еукаріотичних клітин, а також невеликі молекули нуклеїнових кислот, здатних до автономної реплікації в бактеріальних і еукаріотичних клітинах – *плазмід*.

Перші ефективні вектори для клонування фрагментів чужорідної ДНК, що не втратили свого значення й понині, були отримані з використанням бактеріальних плазмід. Велика серія векторних плазмід, позначених символом *pBR*, створена на основі реплікона природної плазмід *ColEI*, що надає клітинам *E. coli* стійкість до колхіцину шляхом його об'єднання з генами стійкості до антибіотиків. Таким чином, бактеріальні клітини, що несуть подібні комбіновані плазмід, набували стійкість до відповідних антибіотиків і їх було легко відрізнити від безплазмідних клітин шляхом простого посіву на поживне середовище із антибіотиками. Генетична карта одного широко розповсюдженого вектора цієї серії – *pBR322*

зображена на рисунку 22, а. Така плазміда являє собою кільцеву ковалентну замкнену молекулу ДНК завдовжки 4363 п.н. Послідовність нуклеотидів *pBR322* повністю вивчена. Плазміда містить гени стійкості до тетрацикліну (*Tc*) і ампіциліну (*Ap*). Обидва цих гени є селективними генетичними маркерами плазміди, тобто дозволяють проводити відбір бактеріальних клітин із плазмідною *pBR322* за їхньою здатністю до росту на поживних середовищах у присутності тетрацикліну і (або) ампіциліну. Плазміда *pBR322* також містить ділянку ДНК, що включає сайт початку реплікації (*ori*) і забезпечує її стабільну реплікацію в клітинах *E. coli*. Характерною рисою плазміди *pBR322*, як і будь-якого сучасного вектора, є наявність у ній декількох унікальних сайтів рестрикції, що позначені на генетичній карті. Слід мати на увазі, що вбудовування в плазміду чужорідних фрагментів ДНК, що клонуються, по сайтах рестрикції, розташованих у генах *Ap* чи *Tc* (наприклад, *Pst* або *BamHI*), буде порушувати цілісність цих генів і їхню функціональну активність. У результаті відбувається втрата бактеріальними клітинами, що містять рекомбінантні плазміди, стійкості до відповідних антибіотиків (рис. 23). За такою ознакою легко розрізнити бактеріальні клітини, які не містять плазміди (не ростуть за наявності ампіциліну й тетрацикліну), клітини із плазмідною, що не містять вставки ДНК, що клонується (ростуть за наявності обох антибіотиків), і клітини з рекомбінантними плазмідами (залежно від локалізації вставки можуть рости на середовищі тільки з одним із двох названих антибіотиків). Отже, наявність у векторних молекулах селективних маркерів різко підвищує ефективність клонування через можливість проведення швидкого відбору рекомбінантних плазмід на селективних поживних середовищах.

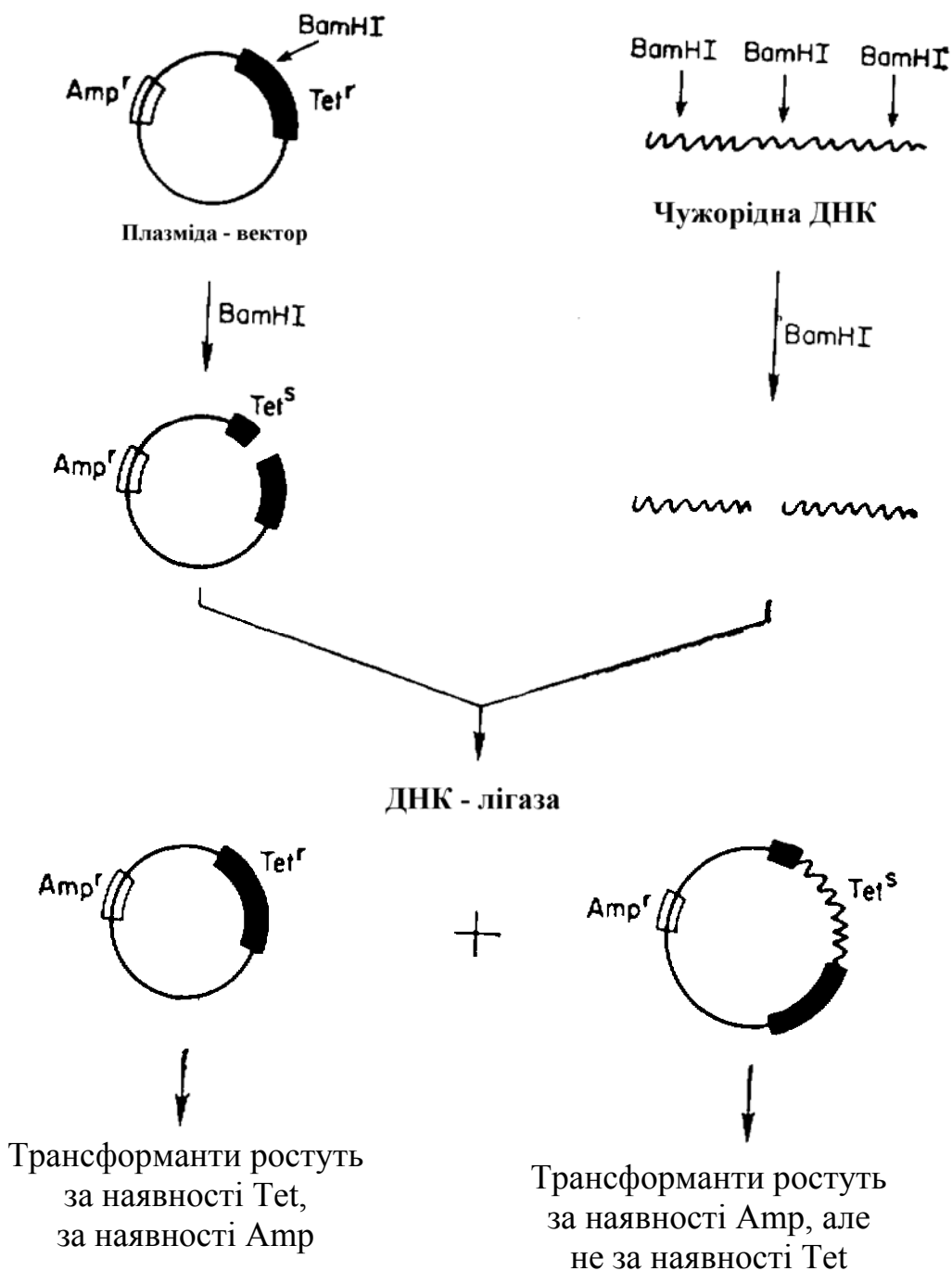
Крім генів стійкості до антибіотиків, як селективні маркери використовують й інші гени або їхні фрагменти. Зокрема, для цих цілей часто застосовуються гени різних ферментів, присутність яких у клітинах у складі плазміди виявляють за появою відповідної ферментативної активності. У векторах серії *pUC*, що часто використовуються, таким селективним маркером є 5'-кінцева частина гена  $\beta$ -галактозидази *E. coli* – *lacZ* (рис. 22, б).  $\beta$ -галактозидаза має здатність розщеплювати штучний субстрат *Xgal* з утворенням пофарбованого в блакитний колір продукту реакції. Вставка рекомбінантної ДНК у ці вектори розриває структурну частину гена  $\beta$ -галактозидази й інактивує його, у зв'язку з чим колонії бактерій із

подібними рекомбінантними плазмідами, що виростили на поживному середовищі *Xgal*, не пофарбовані. Оскільки вектори серії *pUC* одночасно містять і ген стійкості до ампіциліну, відбір бактерій, що несуть рекомбінантні плазміди, можна здійснювати одночасно за цими двома маркерами.



**Рис. 22. Різноманітні вектори для клонування ДНК та їх рестрикційні карти.**

Позначено розташування унікальних сайтів рестрикції та функціонально значимих генів: *a* – векторна плазміда *pBR322*; *б* – векторна плазміда, що здатна до експресії *pUC18*; *в* – векторна плазміда *pAN7*, призначена для відбору рекомбінантних клонів; *г* – багатофункціональна векторна плазміда *Bluescript*.



**Рис. 23. Відбір рекомбінантних плазмід, що втратили стійкість до певного антибіотику**

Однієї з вершин генно-інженерного мистецтва, що прекрасно ілюструє можливості генної інженерії, у цей час є поліфункціональні вектори серії *Bluescript*, отримані фірмою «*Stratagene*» (США) (див. рис. 22, з). Вектор *Bluescript M13+* являє собою кільцеву ковалентну замкнуту молекулу ДНК завдовжки 3 т.п.н. Він містить у собі ген стійкості до ампіциліну *Amp<sup>r</sup>*, ген  $\beta$ -галактозидази *lacZ*, в N-кінцеву частину якого вбудований полілінкер, що містить унікальні сайти

рестрикції для 21 рестриктази, промоторно-операторний сайт *lacZ*, а також ген *lac*-репресора *lacI*. Крім того, вбудований у полілінкер фрагмент ДНК підпадає під контроль промоторно-операторної регуляторної послідовності гена *lacZ* і за наявності індуктора *IPTG* може бути експресований у клітинах *E. coli*. На додаток до цього полілінкер у векторній плазміді містить на одному кінці промотор для T7-, а на іншому – для T3-РНК-полімерази, які орієнтовані назустріч одна одної. Це дозволяє транскрибувати кожний ланцюг клонованого фрагмента ДНК *in vitro* за допомогою тієї або іншої РНК-полімерази й отримувати препаративні кількості мРНК або ж комплементарної їй антизначенневої РНК. Крім того, вектор *Bluescript M13+* володіє міжгенною частиною (*IG*) фага *f1*, родинного фага *M13*. За наявності фага-помічника *M13* відбувається переважне упакування одноланцюгової плазмідки, що утворилася в результаті реплікації, у фагові часточки *M13*. Одноланцюгова ДНК *Bluescript M13+* після очищення може бути використана безпосередньо для секвенування клонованої ДНК або проведення сайт-специфічного мутагенезу. Вектори типу *Bluescript M13+*, здатні існувати або у вигляді плазмідки, або в складі фагових часток *ниткоподібних бактеріофагів*, що називаються *фагмідами*.

За допомогою плазмідних векторів можна клонувати фрагменти ДНК завдовжки до 10 т.п.н. Однак, при створенні геномних бібліотек часто доводиться працювати із більшими фрагментами. Для цього розроблено вектори на основі бактеріофага  $\lambda$  *E. coli*.

Після проникнення фага  $\lambda$  у клітину *E. coli* події можуть розвиватися за двома сценаріями. Якщо реалізується *літичний цикл*, то фаг починає інтенсивно розмножуватися й приблизно через 20 хв. клітина руйнується (лізує) із вивільненням до 100 нових фагових часток. При альтернативному варіанті розвитку подій фагова ДНК включається в хромосому *E. coli* як профаг і реплікується в клітині разом із нормальними бактеріальними генами. Однак, за нестачі поживних речовин або інших несприятливих обставин інтегрована фагова ДНК вивільняється, і запускається літичний цикл розвитку. Розмір ДНК фага  $\lambda$  становить близько 50 т.п.н., причому значна її частина (близько 20 т.п.н.) несуттєва для розмноження фага й відповідає за його вбудовування в ДНК господаря. У зв'язку з цим виникла ідея щодо заміни фрагментом іншої ДНК еквівалентного розміру. Рекомбінантна молекула, що створюється, буде реплікуватися у клітині як ДНК рекомбінантного фага  $\lambda$ , що став на

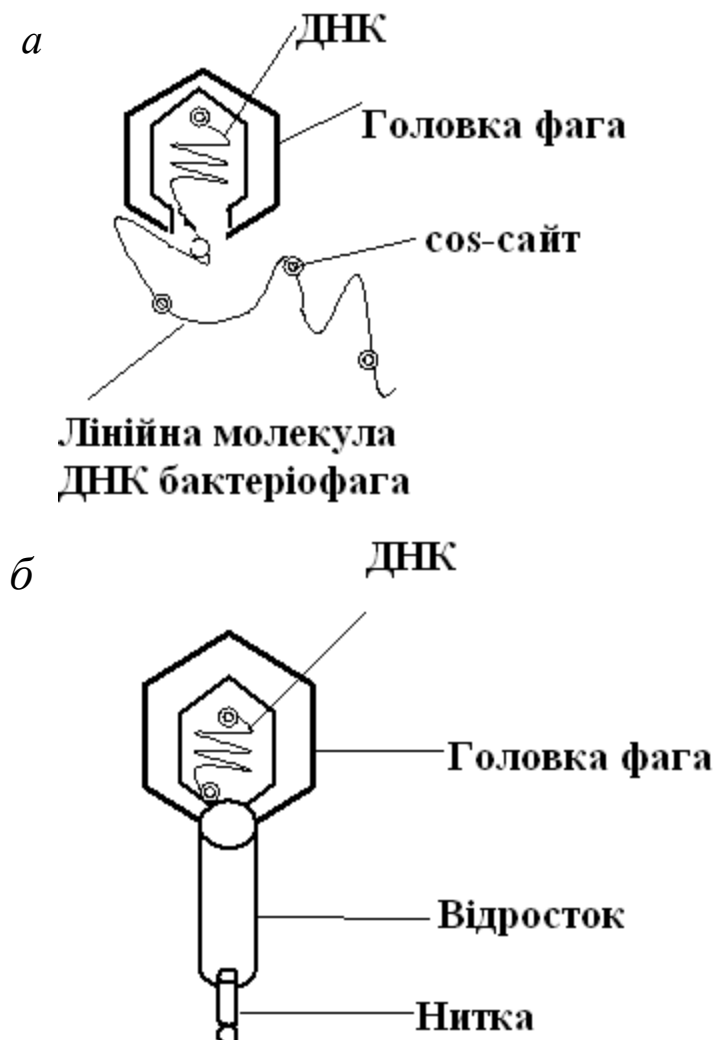
літичний шлях розвитку.

Щоб зрозуміти, як функціонує векторна система на основі фага  $\lambda$ , слід розглянути молекулярні аспекти літичного циклу розвитку. Інфекційна фагова частка має головку, в якій укладено щільно впаковану ДНК завдовжки майже 50 т.п.н., і відросток з тонкими білковими нитками (фібрилами), що відходять від нього. Збірка головки та відростка й упакування ДНК чітко скоординовані. ДНК фага  $\lambda$  – це лінійна дволанцюгова молекула завдовжки 50 т.п.н. з одноланцюговими 5'-«хвостами» з 12 нуклеотидів. Їх називають «липкими» (*cos*) кінцями, оскільки вони взаємно комплементарні й можуть спаровуватися один з одним. Після того як фагова ДНК проходить через відросток і потрапляє в *E. coli*, *cos*-кінці з'єднуються з утворенням кільцевої молекули. На ранньому етапі літичного циклу в результаті реплікації кільцевої молекули ДНК утворюється лінійна молекула, що складається з декількох сегментів завдовжки 50 т.п.н. (рис. 24, а). Кожний з таких сегментів упаковується в білкову головку, до останнього приєднується вже зібраний відросток і утворюється нова фагова часточка (рис. 24, б). При пакуванні молекули ДНК завдовжки менше 38 т.п.н. утворюється неінфекційна фагова часточка, а фрагменти завдовжки більше 52 т.п.н. не вміщаються в головку. Сегменти завдовжки 50 т.п.н. у лінійній молекулі ДНК розділені *cos*-сайтами, і саме по цих сайтах розрізається молекула, коли черговий сегмент заповнює головку. Розрізання здійснює фермент, що знаходиться біля входу в головку.

У результаті досліджень з вивчення збирання фага  $\lambda$  було розроблено систему пакування молекул ДНК *in vitro* з утворенням інфекційних фагових часточок. Змішавши в пробірці очищені порожні головки, фагову ДНК і зібрані відростки, можна отримати інфекційні фагові часточки.

Один з множини  $\lambda$ -векторів для клонування має два *BamHI*-сайти, що фланкують ділянку завдовжки 20 т.п.н. За гідролізу очищеної фагової ДНК рестриктазою *BamI* утворюються три фрагменти. Так назване ліве плече (частка L) містить генетичну інформацію про головку й відросток фага, праве плече (частка R) контролює реплікацію ДНК і лізисо, а середній сегмент має гени, що відповідають за процеси інтеграції й виключення (сегмент *I/E*, від англ. *integration/excision*). Завдання дослідника полягає в тому, щоб замінити цю центральну ділянку нуклеотидної послідовності завдовжки до 20 т.п.н. потрібною ДНК. ДНК, що призначена для

клонування, теж розщеплюють за допомогою *Bam*HI і виділяють фрагменти розміром від 15 до 20 т.п.н. Обидва препарати – фагову й чужорідну ДНК – поєднують і додають ДНК-лігазу фага *T4*, а потім – порожні головки і вже зібрані відростки.



**Рис. 24. Літичний шлях розвитку бактеріофага  $\lambda$ :**

*а* – під час реплікації кільцевої ДНК бактеріофага  $\lambda$  утворюється лінійна молекула, що складається із повторюваних сегментів завдовжки 50 т.п.н.;

*б* – фагова головка містить один такий сегмент, потім до головки приєднується зібраний відросток

Фрагменти ДНК завдовжки 50 т.п.н. упаковуються в головки, до них приєднуються відростки й утворюються інфекційні фагові часточки. Фрагменти більшого (>52 т.п.н.) або меншого (<38 т.п.н.) розміру впаковуватися не можуть.

Фагові вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК



завдовжки 15...25 т.п.н. Однак, цього явно недостатньо, щоб клонувати багато генів тварин і рослин, довжина яких найчастіше перевищує 35...40 т.п.н. Необхідною місткістю володіють векторні молекули, названі *космідами* (рис. 25). Косміди являють собою невеликі плазмідни, в які *in vitro* введені *cos*-сайти ДНК фага  $\lambda$ . Звідси походить назва всього типу даних векторів (*cosmid*). У ДНК нормальних фагових часток *cos*-сайти розташовані на кінцях молекул, що розділяють мономери фагової ДНК. У процесі пакування *cos*-сайти розпізнаються за компонентами ферментативної системи й за ними відбувається послідовне відділення (відрізання) упакованої у фагову часточку  $\lambda$ -ДНК від іншої не упакованої ДНК.

Таким чином, наявність *cos*-сайтів у ДНК є, власне кажучи, єдиною необхідною умовою для упаковки ДНК у фагові часточки. Це означає, що послідовність нуклеотидів  $\lambda$ -ДНК, що розташована між двома *cos*-сайтами, містить у собі весь фаговий геном (35...45 т.п.н.), може бути заміщена *in vitro* на аналогічний за довжиною (38...52 т.п.н.) фрагмент чужорідної ДНК і ефективно впакована у фагові частки (така максимальна місткість головки фага). Природно, що така штучна фагова часточка виявляється нежиттєздатною.

Однак, після адсорбції химерної фагової часточки на поверхні бактеріальної клітини укладена в ній ДНК проникає (уводиться фаговою часточкою) всередину бактерії й починає автономно реплікуватися як плазмідна, розмір якої становить 30...40 т.п.н. Оскільки така плазмідна (косміда) містить у своєму складі селективні маркери у вигляді генів стійкості до антибіотиків, її підтримують у бактеріальних клітинах шляхом вирощування бактерій на середовищі з відповідними антибіотиками. Незважаючи на те, що місткість космідних векторів значно вища фагових, ефективність клонування в космідах нижча, хоча й досягає в ряді випадків  $10^5 \dots 10^6$  колоній на 1 мкг ДНК, що клонується. За такою ефективністю пакування потрібно всього 2...4 мкг цієї ДНК, для одержання повної клонотеки більшості еукаріотичних геномів.

Стадія пакування ДНК космід у фагові часточки використовується лише для полегшення процесу введення рекомбінантних ДНК великого розміру всередину бактеріальних клітин. Такий процес імітує проникнення фагової хромосоми в бактерії під час фагової інфекції. У випадку космід подібність між їхнім проникненням у бактеріальні клітини і фаговою інфекцією на цьому закінчується. Однак, подібність є більш глибокою у випадку

векторів, названих *фазмідами*. Фазміди – це векторні молекули ДНК, що містять у собі генетичні елементи плазмід і хромосом бактеріофагів. Вони можуть мати місткість у відношенні до ДНК, що клонується, характерну для  $\lambda$ -векторів, та існувати за певних умов у бактеріальних клітинах у вигляді плазмиди або ж упаковуватися у фагові часточки *in vivo* за зміни цих умов.

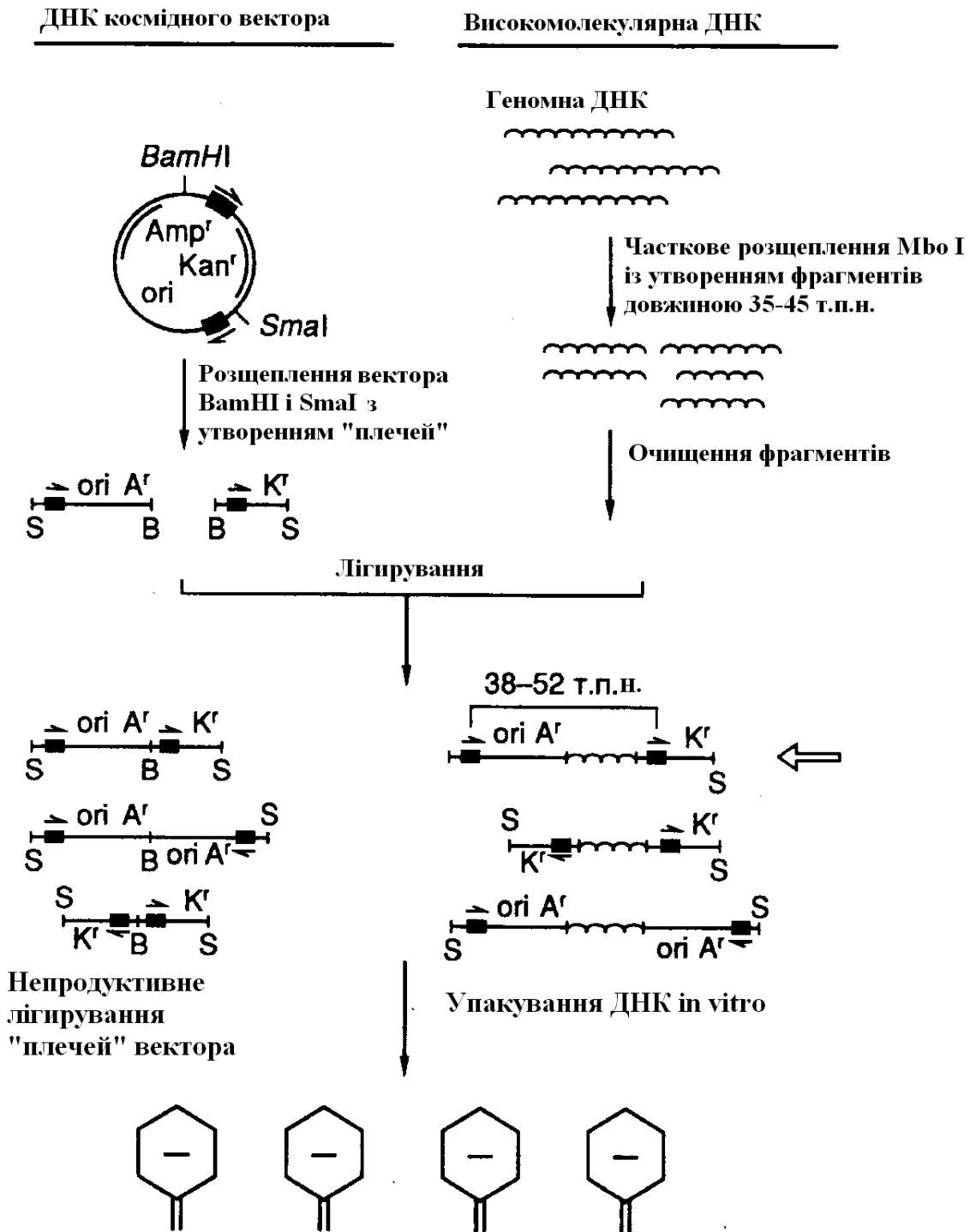
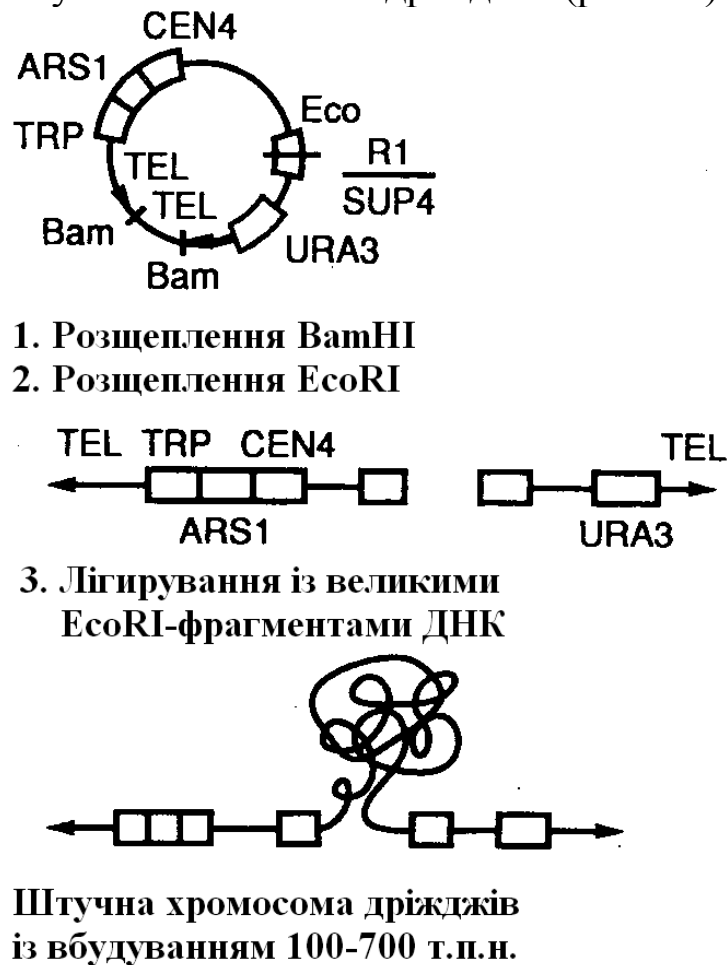


Рис. 25. Космідний вектор і конструювання клонотеки геномної ДНК на його підставі

Хромосоми вищих організмів містять у своєму складі протяжні молекули ДНК. Наприклад, довжина ДНК однієї з типових хромосом людини становить 100...200 мільйонів пар основ (м.п.о.). Дослідження генів у хромосомах вищих рослин, тварин і людини потребувало створення векторів для клонування фрагментів ДНК завдовжки в кілька сотень тисяч пар основ. Цим завданням відповідає система, створена для клонування наддовгих молекул ДНК на основі штучно отриманої міні-хромосоми дріжджів *YAC* (*yeast artificial chromosome*). *YAC*-вектор являє собою кільцеву молекулу ДНК, що містить ряд генетичних елементів, які дозволяють їй існувати у позахромосомному стані в клітинах дріжджів (рис. 26).



*Рис. 26.* Схема клонування наддовгих молекул ДНК із застосуванням вектора *YAC*:

1 – перетворення ДНК вектора у лінійну форму за допомогою рестриктази *Bam*HI; 2 – розщеплення лінійної ДНК вектора рестриктазою *Eco*RI з утворенням «плечей»; 3 – введення у вектор *Eco*RI-фрагменту ДНК, що клонується

Вектор містить два селективних маркери *TRP*, що відновлюють здатність до росту *ауксотрофних* (ауксотрофна клітина – це клітина, що втратила здатність синтезувати певну речовину, існування без якої неможливе, але за наявності у середовищі цієї речовини, життєздатність клітини поновлюється), по триптофану клітин дріжджів під час відсутності екзогенного триптофану. Крім цього, він володіє послідовностями нуклеотидів, необхідними для його реплікації в бактеріальних клітинах.

Рекомбінантними ДНК, що отримані на основі *YAC*-вектора, трансформують *протопласти* (клітини позбавлені оболонки) клітин дріжджів. Трансформанти, що утворилися, відбирають на селективному твердому поживному середовищі. У такому векторі вдавалося здійснювати клонування фрагментів ДНК завдовжки до 700 т.п.н.

При всіх своїх перевагах системи клонування, засновані на векторах родини *YAC*, мають ряд істотних недоліків. У рекомбінантних ДНК, що підтримані у таких системах, часто виникають внутрішні делеції. Крім того, за введення рекомбінантних ДНК у клітини дріжджів іноді має місце проникнення в одну клітину декількох молекул вектора із вставками.

У підсумку окремі клони дріжджових клітин можуть містити декілька незчеплених одну з одною молекул рекомбінантних ДНК, а рекомбінація між ними взагалі може призводити до утворення химерних молекул. Усе це дуже ускладнює фізичне картирування генів у хромосомах об'єктів, що досліджуються. Для подолання такого роду труднощів були сконструйовані альтернативні векторні системи, серед яких найбільш популярними в цей час є ті, що засновані на *штучних хромосомах бактерій* – *BAC (bacterial artificial chromosome)*.

Сучасні *BAC*-вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК завдовжки до 300 т.п.н. і більше (рис. 27). Рекомбінантні молекули вводяться в клітини *E. coli* за допомогою електропорації, причому ефективність утворення трансформантів у 10...100 разів вища, ніж за звичайної трансформації *сферопластів* (клітини, оболонка яких зруйнована лише частково) дріжджів векторами родини *YAC*. Це дозволяє зменшити вихідну кількість ДНК, необхідну для конструювання репрезентативних клонотек генів.

Оскільки рекомбінантні *BAC*-вектори існують у бактеріальних клітинах у вигляді однієї копії, виключається спільне клонування в

одній клітині різних фрагментів ДНК і утворення химерних молекул, що досить істотно для фізичного картування великих геномів.

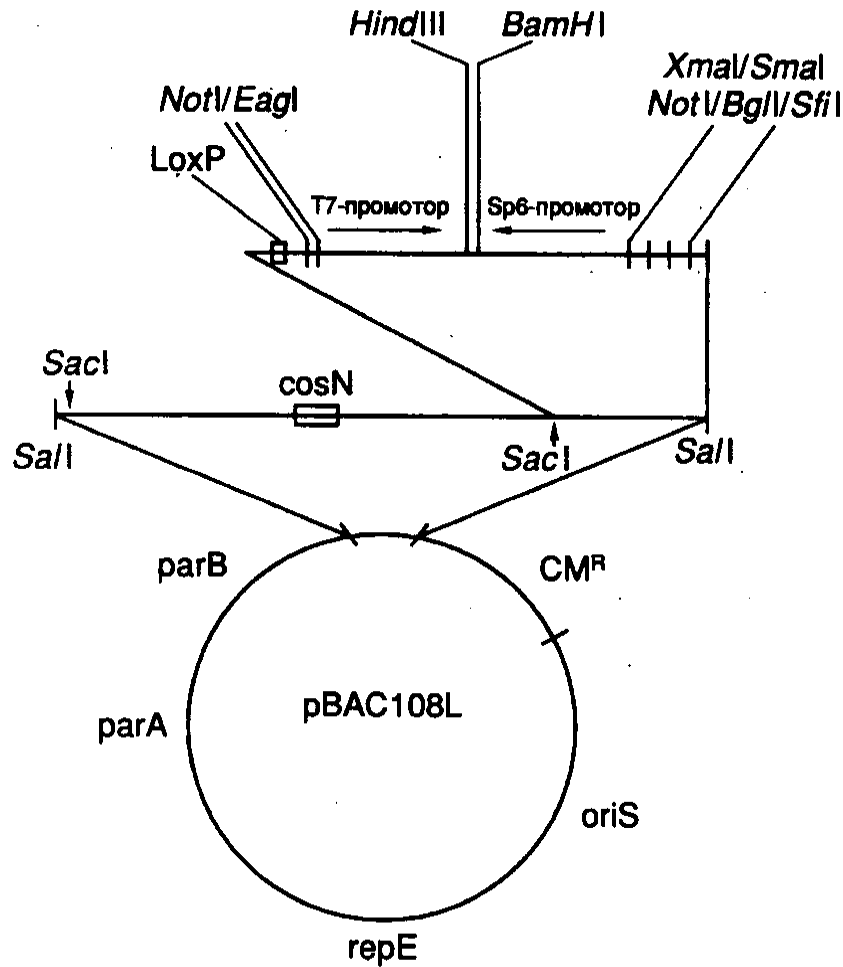


Рис. 27. Вектор *pBAC108L* – представник родини *BAC*-векторів

**Використання транспозонів для клонування ДНК.** Транспозони, повсюдно поширені в живій природі, є мобільними генетичними елементами, що мають здатність переміщатися з однієї частини генома в іншу шляхом вирізання й наступної інтеграції за механізмом, незалежним від гомологічної рекомбінації. Окремі представники цієї великої родини мобільних генетичних елементів бактерій дуже розрізняються за своєю структурою й механізмами внутрішньогеномного переміщення. Відомо вже, принаймні, чотири механізми транспозиції. За *консервативної транспозиції* транспозон вирізується з реплікона-донора й у незмінному вигляді інтегрується в реплікон-реципієнт. Пролом, що створюється у вихідному репліконі, відновлюється внаслідок репарації. *Реплікативна транспозиція* характеризується тим, що транспозон не вирізається з локуса, в якому він розташований. Замість цього реплікон-донор і реплікон-реципієнт

створюють *коінтегра́т* (об'єднуються один з одним), у процесі формування якого виникає друга копія транспозону. Внаслідок наступного за цим поділу репліконів, кожний з них стає власником копії вихідного транспозону. Процес поділу коінтеграта здійснюється за допомогою гомологічної рекомбінації або за участю сайт-специфічної *рекомбінази* (*резольвази*), що кодується транспозоном і розпізнає специфічні послідовності (*res*). У процесі *ексцизійної транспозиції* сайт-специфічна ендонуклеаза (*інтеграза*) за участю інших білкових факторів вирізає транспозон з реплікона-донора, відновлюючи кільцеву структуру реплікона. При цьому одночасно утворюється кільцевий ковалентно замкнений мобільний елемент як проміжна сполука, що вбудовується в реплікон-реципієнт. Нарешті, у процесі *ретротранспозиції* має місце транскрипція ретротранспозона з утворенням РНК, що за участю *матурази* віддаляється з вихідної РНК та інтегрується в безінтронну РНК, не обов'язково того ж виду, що й РНК-донор (зворотний сплайсинг). Далі РНК-реципієнт за допомогою зворотної транскрипції перетворюється в кДНК й інтегрується в реплікон-реципієнт за механізмом RecA-залежної гомологічної рекомбінації. Альтернативно, зрідка, транскрипт ретротранспозона, що містить інтрон, може за допомогою зворотного сплайсинга вбудовуватися в один із ланцюгів розплетеної дволанцюгової ДНК-реципієнта. Після внесення в другий ланцюг ДНК одноланцюгового розриву за допомогою ендонуклеази, 3'-кінець ДНК, що створився, стає місцем ініціації зворотної транскрипції на матриці інтегрованої РНК, що приводить, в остаточному підсумку, до утворення дволанцюгової ДНК із вставкою послідовності ретротранспозона. Всіма трьома видами активності: зворотної транскриптази, матурази й ендонуклеази володіє білок, що кодується геном *ier* (*intron encoded protein*), локалізований в інтроні ретротранспозона.

За вибором місць інтеграції в реплікон-реципієнт транспозони поділяють на три групи. Деякі з них, наприклад, *Tn5* і бактеріофаг *Mu*, інтегрують у геном випадковим чином, інші вбудовуються в обмежене число ділянок ДНК, для третіх характерна сайт-специфічна інтеграція. Саме здатність ряду транспозонів вбудовуватися випадково у геном клітини-власника часто використовується сучасною молекулярною генетикою для клонування невідомих послідовностей і картування генома.

Вбудовування транспозону в результаті транспозиції в частину гена, що кодує, як правило, його інактивує, що супроводжується розвитком відповідного фенотипу. Фрагмент ДНК із транспозоном може бути виділений із клонотеки послідовностей за допомогою зондів, для створення яких використовуються послідовності транспозони. Оскільки послідовності транспозонів, що використовуються у такій роботі, відомі, не виникає ускладнень за допомогою відповідних рестриктаз виділити транспозон разом із фланкуючими його невідомими послідовностями нуклеотидів. За допомогою набору рестриктаз можна побудувати детальну фізичну карту невідомих послідовностей, що прилягають до інтегрованого транспозону, і здійснити подальше пересування у напрямку невідомих послідовностей в обидва боки від транспозону.

#### 2.4.6. Введення молекул ДНК у клітини

Необхідний етап генно-інженерного експерименту – введення отриманих *in vitro* гібридних молекул ДНК у клітини, що забезпечують реплікацію цих молекул, з метою розмноження, селекції і виділення клонів гібридів.

Процес, внаслідок якого чужорідна ДНК проникає у клітину-реципієнт і викликає у ній зміни, що успадковуються, має назву **трансформація**. Трансформацію клітин можуть здійснювати як молекули ДНК, що реплікуються у клітинах позахромосомно (плазмідні), так і молекули ДНК, що інтегруються у геном клітини (лінійні та кільцеві молекули ДНК). Генетично трансформовані клітини називаються **трансформантами**.

Інколи, в процесі розмноження фагів у бактеріях створюються часточки, що поряд з фаговою ДНК або замість неї містять фрагменти бактеріальної ДНК. Такі часточки мають назву трансдукуючі. За своїми властивостями вони не відрізняються від звичайних фагових *віріонів* (фагові часточки, складаються з ДНК, або РНК, і білка), але під час зараження ними нових клітин вони передають їм генетичні детермінанти попередніх господарів. Таким чином відбувається процес трансдукції, тобто **трансдукція** – це перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта за допомогою фага.

Однак, немає потреби очікувати коли ДНК фага буде захоплювати фрагмент чужорідної ДНК для її внесення в клітину-

реципієнт, якщо можливо штучно створити рекомбінантну ДНК фага і використовувати такий фаг як вектор (наприклад, для клонування великих фрагментів ДНК). Тим більше, що фаговий вектор вводить рекомбінантну ДНК за зараження клітини, тобто *методом інфекції*, що значно ефективніше, ніж шляхом трансформації або трансдукції. Введення у клітину нуклеїнової кислоти віруса з наступним утворенням вірусних нащадків, називається *трансфекцією*. Вірусні клони, що отримані після трансфекції, мають назву *трансфектанти*.

Поряд з хромосомною ДНК в бактеріальній клітині може існувати і додатковий генетичний матеріал у вигляді плазмідної ДНК. Плазмиди є репліконами і стабільно успадковуються. Як правило, плазмиди мають форму кільця, побудованого з двох ланцюгів ДНК.

У клітині може міститися від 10 до 200 копій дрібних плазмід, або 1...4 копії великих. Реплікація плазмід значною мірою залежить від клітини-власника. Мутації, що порушують реплікацію бактерії, як правило, впливають і на реплікацію плазмід. Ряд плазмід, що містяться у клітинах у незначній кількості – 1...2 копії, мають власну систему реплікації.

Плазмиди часто змінюють фенотипові властивості клітин. Це пов'язано з тим, що вони містять детермінанти стійкості до антибіотиків – R-плазмиди, до йонів важких металів або гени біодеградації деяких органічних сполук – D-плазмиди. Виявлено також плазмиди, які мали генетичні системи, що детермінують перенесення плазмід в інші клітини внаслідок кон'югації. Таким чином, *кон'югація* – це процес генетичного обміну за якого здійснюється перенесення генетичної інформації від клітини-донора до клітини-реципієнта за безпосереднім контактом клітин між собою. За здатністю до кон'югативного перенесення плазмиди поділяються на кон'югативні і некон'югативні. Кон'югативні плазмиди містять так званий фактор фертильності F. Клітини, що містять цей фактор, почали називати клітинами F<sup>+</sup>, а клітини, які не містять цього фактора – клітинами F<sup>-</sup>. Виявилось, що клітини з фактором F завжди є донорами генетичного матеріалу, а клітини, в яких цей фактор відсутній – реципієнти.

З клітини-донора в клітину-реципієнт переноситься лише одна нитка плазмідної ДНК, починаючи зі специфічного сайту *oriT*, де створюється одноланцюговий розрив. У наступному відбувається розподілення ланцюгів ДНК, яке необхідне для ініціації перенесення і комплементарного синтезу ДНК як у клітині-донора, так і у клітині-



реципієнта. Етап, що завершує цей процес, пов'язаний з утворенням кільцевих структур плазмідних ДНК.

F-плазмід, також, сприяють перенесенню в клітини-реципієнти інших, некон'югативних плазмід, цей процес має назву – *мобілізація*. Таким чином, перенесення некон'югативних плазмід за рахунок кон'югативних – це процес *мобілізації*. Мобілізація може здійснюватися двома шляхами:

- По-перше, перенесення некон'югативної плазмід може відбуватися за рахунок специфічних речовин, що синтезуються генами кон'югативної плазмід, які за це відповідають. Ці речовини активують специфічні ділянки генів некон'югативної плазмід, які, в свою чергу, створюють умови, за яких відбувається перенесення плазмід в клітину-реципієнт.
- По-друге, некон'югативні плазмід можуть переноситися в клітини-реципієнти поряд з кон'югативними плазмідами у складі коінтегратів. Тобто, *коінтеграти* – це єдина молекула ДНК, в якій поєднано два або більше реплікони (плазмід) і кожен з них здатний до незалежної реплікації. У природі частіше трапляються коінтеграти між плазмідами-RTF, тобто плазмідами, що детермінують стійкість до тетрацикліну і здатність до кон'югативного перенесення, з плазмідами, які містять гени стійкості до декількох антибіотиків, плазмідами-г. Поєднання цих плазмід і створення комбінації – RTF-г сприяє швидкому розповсюдженню цього коінтеграту в бактеріальному середовищі.

Необхідно зазначити, також, що плазмід-F можуть входити і в бактеріальну хромосому за типом *незаконної рекомбінації*, тобто на підставі обміну негомологічними ділянками ДНК. Хромосоми бактерії, до яких включено фактор фертильності F, набувають здатність до перенесення в клітини придатного реципієнту. Ця властивість використовується для створення рекомбінантних бактерій.

Клітини не завжди здатні до трансформації. Трансформуються лише *компетентні* клітини, що здатні адсорбувати і поглинати ДНК. У багатьох бактерій компетентність виникає лише на певному етапі росту культури – в стадії компетентності.

Один з найважливіших етапів генетичної трансформації – це перенесення молекул ДНК через оболонку клітини. На стан компетентності клітин впливають різні фактори зовнішнього

середовища. До них належать температура, рН, йони важких металів, осмотичний тиск та ін.

Компетентні клітини відрізняються від некомпетентних зміною властивостей клітинної оболонки. В них знижено поверхневий заряд, підвищено чутливість до осмотичного шоку. Мікроорганізми, в яких відсутня природна компетентність, також можуть бути трансформовані. Для цього клітини обробляють тим чи іншим способом для ініціації в них здатності до поглинання ДНК. Найбільш поширений метод індукції компетентності у клітин *E. coli* – це обробка крижаним розчином  $\text{CaCl}_2$ . Використовують також спосіб глибокого заморожування з наступним відтаюванням клітин, що забезпечує збільшення проникненості для фагової, плазмідної і хромосомної ДНК. Метод має назву *кріотрансформація*. Для підвищення проникненості клітинних мембран на них діють електричним струмом. Ця процедура називається *електропорація*. Умови її проведення різні для різних видів бактерій. За роботи з *E. coli* клітинну суспензію і ДНК розміщують у посудині з зануреними електродами і подають одиничний імпульс струму. Після цього ефективність трансформації збільшується до  $10^9$  для коротких плазмід (приблизно 3 т.п.н.) і до  $10^6$  для великих (приблизно 135 т.п.н.).

#### **2.4.7. Створення і скринінг геномних бібліотек**

Мета біотехнологічних експериментів часто полягає в ідентифікації генів, які кодують певні білки (структурних генів). Оскільки у прокариот кодуючі домени (ділянки) структурних генів безперервні, а в еукариот кодуючі частини (екзони) розділені не кодуючими (інтронами), то за їх клонування використовуються різні методи. У прокариот сумарну ДНК гідролізують рестриктазою і кожен з отриманих фрагментів вбудовують у вектор. Потім необхідно виявити специфічну лінію клітин (клон), що містить необхідну послідовність, відділити її і охарактеризувати. Процес розподілення геномної ДНК на елементи для клонування, введення цих елементів до клітин-господарів має назву створення геномної бібліотеки. Повна бібліотека містить весь геном даного організму.

Один із способів створення бібліотеки ДНК полягає в обробці донорської ДНК рестриктазою в умовах, коли відбувається лише часткове розщеплення таким чином, що створюються фрагменти

різних розмірів. Частковий гідроліз дозволяє клонувати цілі гени, однак, оскільки сайти рестрикції розташовані не випадково, деякі фрагменти можуть виявитися занадто великими для клонування. Для вирішення цієї проблеми використовують іншу додаткову рестриктазу.

Фрагменти, що отримані, з'єднують з ДНК векторів за допомогою лігази і, за можливістю, упаковують у підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом за температури  $-70^{\circ}\text{C}$ . Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років. *Ампліфікацію* бібліотеки (розмноження) геномних клонів, що отримано, а також розшук необхідного клону проводять при зараженні фагової бібліотекою бактеріальні клітини, які у подальшому висівають на чашках Петрі з агаризованим середовищем. Повний гаплоїдний набір клітин ссавців містить близько  $3 \times 10^9$  пар основ. За ємністю вектора 15 т.п.н. бібліотека може містити до 1 млн. фагових часточок. Перевірка мільйона фагових бляшок дозволяє перевірити весь геном на наявність необхідного гена. Так можна ідентифікувати напевно ті фагові часточки, що містять послідовність дослідженого гена, розмножити ДНК цієї послідовності й проводити з нею подальші маніпуляції.

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

***Скринінг за допомогою гібридизації.*** Необхідну нуклеотидну послідовність у зразку ДНК можна виявити за допомогою ДНК-зонду, який з'єднується лише з послідовністю, що розшукується.

ДНК-гібридизація полягає в тому, що ДНК-мішень піддають денатурації (роз'єднанню ланцюгів ДНК під дією теплової обробки або впливу лугів) і одноланцюгові молекули міцно приєднують до твердої підложки (нітроцелюлозного або нейлонового фільтра). Потім фільтр інкубують з одноланцюговим ДНК-зондом, що позначений радіоізотопами або іншими мітками. Якщо нуклеотидні послідовності зонду і ДНК-мішені комплементарні, то відбувається їх спаровування (тобто гібридизація). Гібридні молекули можна виявити

радіографічним або іншими методами (рис. 28). Для гібридизації необхідно, щоб на ділянці завдовжки 50 нуклеотидів збігалось понад 80% з них.

Мічені ДНК-зонди для скринінгу бібліотеки можна отримати щонайменше двома способами. По-перше, можна використовувати клоновану ДНК близькоспорідненого організму (гетеролітичний зонд). По-друге, зонд можна отримати методом хімічного синтезу, що заснований на відомій амінокислотній послідовності білкового продукту гена, що розшукується.

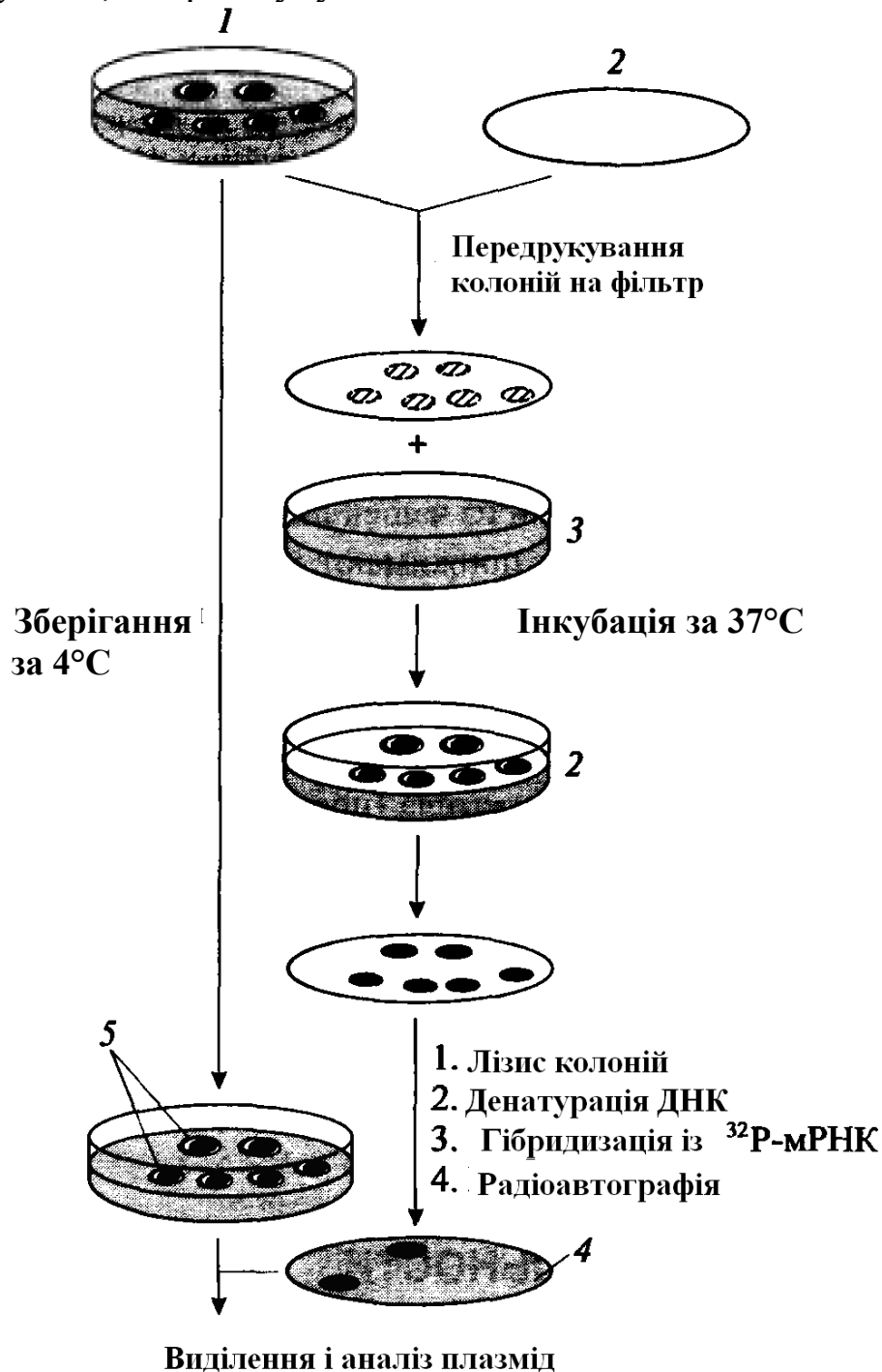


Рис. 28. Схема проведення скринінгу методом гібридизації

**Імунологічний скринінг.** За відсутності ДНК-зонду можна використовувати інші методи, наприклад, якщо клонований ген здатний до експресії (реалізації генетичної інформації), то його продукт – весь білок або його частину – можна виявити за імунологічними методами. Всі клітинні лінії (клони) бібліотеки висівають на чашки з поживним середовищем. Колонії, що вирости, переносять на фільтр, клітини лізирують (руйнують), а білки, що звільнилися, фіксують на фільтрі. Далі на фільтр наносять перші антитіла, які специфічно зв'язуються з певним білком (антигеном), усі антитіла, що не зв'язалися – віддаляють, а фільтр поміщають у розчин других антитіл, специфічних до перших антитіл. Часто використовують кон'югати інших антитіл з ферментом, під впливом якого відбувається гідроліз субстрату з утворенням забарвленої речовини в тому місці, де здійснюється реакція.

**Скринінг за активністю білка.** У разі, коли ген, що розшукується, кодує фермент, який не синтезується клітиною-власником, використовують метод ідентифікації на чашках. Для виявлення клонів, які містять цей ген, клони *E. coli*, що складають геномну бібліотеку даного організму (клітини-власника), висівають на середовищі із специфічним субстратом. Клітини, що здатні утилізувати цей субстрат, після фарбування набувають певного забарвлення.

Якщо ген, що розшукується, кодує продукт, без якого клітина-власник не здатна рости на мінімальному середовищі, то бібліотеку можна створювати методом *трансформації мутантних клітин*. Клони, що не містять цей ген, будуть гинути, а на мінімальному поживному середовищі залишаться лише клітини, до складу яких увійшов необхідний ген.

**Блот-гібридизація.** За створення клонотек генів хромосомну ДНК розрізають на фрагменти за допомогою рестриктаз. При цьому невідомо, чи містить ген, що розшукується, сайт або сайти розщеплення певної рестриктази. Якщо такі сайти є, то виділити цілий ген не вдається, і тому треба використовувати іншу рестриктазу. Однак, ще попередньо, без клонування у бактеріях, можна досліджувати структуру індивідуальних генів, визначити в них наявність тих чи інших сайтів рестрикції, встановити число копій даного гена у геномі. Метод блот-гібридизації, що використовується для цього, потребує наявності відповідної мРНК або кДНК.

Аналіз здійснюють таким чином (рис. 29). Високомолекулярну хромосомну ДНК розщеплюють рестриктазою або їх набором. Фрагменти, що створилися, розподіляють за довжиною електрофорезом в агарозному гелі, і гель поміщають на лист нітроцелюлози. Після цього напрям електрофорезу змінюють перпендикулярно (у напрямку листа). При цьому ДНК з гелю переходить на нітроцелюлозу і створюється репліка із гелю. Надалі здійснюють гібридизацію на фільтрі фрагментів хромосомної ДНК із зондом. Зонд гібридизується лише з тими фрагментами (смугами), що містять відповідний до нього ген. Смуги, у яких зв'язалася мітка, виявляють радіографією.

Наявність на автографі однієї смуги свідчить про те, що під час рестрикції ген не розщеплюється, а інтенсивність смуги дає можливість визначити кількість копій гена у геномі.

Аналогічний метод розроблено для аналізу клітинних мРНК з метою з'ясування їх повної або часткової відповідності зонду, а також для визначення їх числа. Метод є корисним доповненням до техніки клонування ДНК, оскільки дозволяє визначити ступінь відповідності специфічної ДНК зонду.

Для клонування еукаріотичних структурних генів необхідні спеціальні методики. Прокаріоти не здатні видаляти інтрони з первинних РНК-транскриптів, тому правильна трансляція еукаріотичних мРНК у бактеріальній клітині неможлива. Більш того, експресія еукаріотичної ДНК може здійснюватися лише за наявності прокаріотичних сигнальних послідовностей, що регулюють транскрипцію й трансляцію. Кінцеві ділянки еукаріотичних мРНК особливим чином модифіковані: їх 5'-кінці кепіровані (містять «кеп» із залишку G, часто метильованого), а 3'-кінці поліаденільовані (містять poly(A)-«хвіст» із приблизно 200 залишків аденозину).

Наявність poly(A)-хвоста дозволяє відокремити мРНК від рибосомної і транспортної РНК. Для цього сумарну еукаріотичну РНК пропускають через колонку, заповнену целюлозою, до якої «пришиті» короткі олігонуклеотидні ланцюжки з тимідинових залишків завдовжки до 15 ланок, oligo(dT). Poli(A)-хвости молекул мРНК спаровуються із oligo(dT) і затримуються в колонці, а молекули тРНК і рРНК вільно проходять через неї. У подальшому колонку промивають буфером, у якому відбувається розрив водневих зв'язків між А і Т, та мРНК вивільняється.

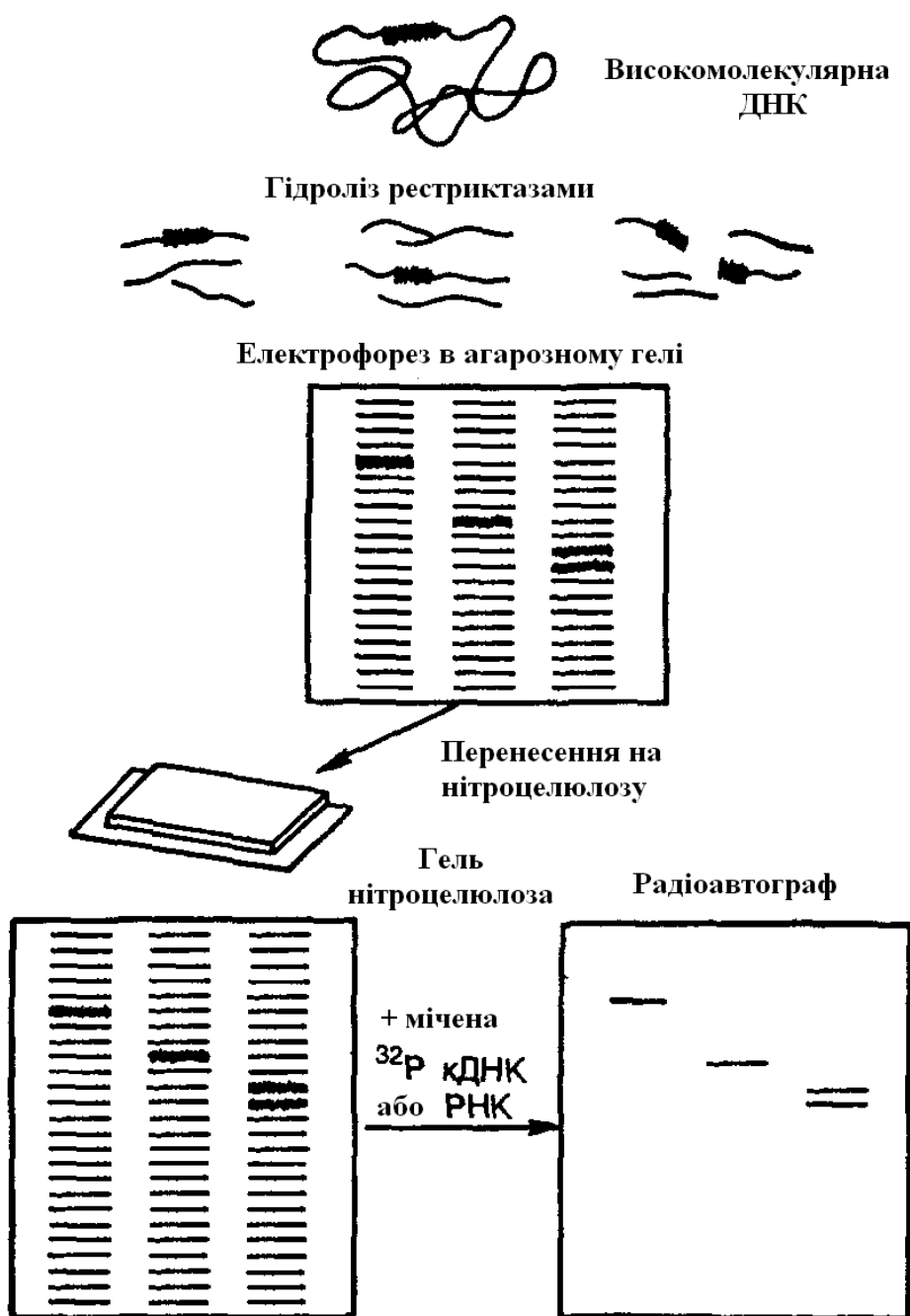


Рис. 29. Принцип експерименту щодо блот-гібридації (за Саузерном)

Саму мРНК не можна вмонтувати у ДНК-вектор, спочатку на ній необхідно синтезувати дволанцюгову ДНК. Для цього послідовно використовують дві різні полімерази: зворотню транскриптазу й фрагменти Кленова ДНК- полімерази I. Спочатку в реакційну суміш із очищеної мРНК додають короткі *oligo(dT)*, зворотню транскриптазу й чотири dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). *Poli(A)*-хвіст мРНК спаровується з *oligo(dT)*, який містить вільну 3'-ОН-групу, що ініціює синтез комплементарного ланцюга. Матрицею в

цьому синтезі є молекула мРНК, а каталізує його зворотна транскриптаза, що продукується деякими ретро-вірусами. Вона послідовно приєднує до ланцюга, що зростає, залишки Т, С, G або А, комплементарні А, G, С або U мРНК. *In vitro* синтез ДНК йде не до кінця, при цьому зворотня транскриптаза перед зупинкою звичайно «повертає назад» і приєднує декілька нуклеотидів у зворотному напрямку. А тому в результаті утворюється «шпилька».

У реакційну суміш додають фрагмент Кленова ДНК-полімерази I *E. coli*, що добудовує другий ланцюг ДНК, використовуючи перший ланцюг як матрицю. Він приєднує дезоксинуклеотиди до зростаючого ланцюга, починаючи з 3'-ОН-кінця шпильки. По закінченні синтезу препарат обробляють ферментом РНКазою H, що руйнує молекули мРНК, і нуклеазою SI, що відщеплює одноланцюгові кінці ДНК. Отриманий препарат являє собою суміш частково й повністю дволанцюгових комплементарних ДНК-копій (кДНК) мРНК, що переважно містилася у вихідному зразку.

Різні кДНК можна вбудовувати в плазмідний вектор і отримати кДНК-бібліотеку. Для скринінгу кДНК-бібліотеки з метою ідентифікації клонів, що несуть специфічні гібридні плазміди, можна використовувати метод гібридизації або імунологічні методи. В останньому разі кДНК повинна бути вбудована в сайт, що перебуває під контролем бактеріального промотора, що забезпечує транскрипцію. Однак, практично жоден вектор не гарантує, що у вбудованій кДНК збережеться правильна рамка зчитування й синтезується правильний поліпептидний ланцюг. Проте всі позитивні клони, виявлені тим або іншим методом, необхідно піддати подальшій перевірці й ідентифікувати ті з них, які несуть повнорозмірну нуклеотидну послідовність, що кодує білок-мішень.

### ***Контрольні запитання***

1. Що таке експресія генів?
2. Які процеси забезпечує проліферація клітин?
3. Коли в організмі може виникнути процес апоптозу?
4. У яких одиницях вимірюється довжина дволанцюгової ДНК?
5. Яким чином здійснюється процес реплікації ДНК?
6. Яку роль відіграє сайт ініціації в процесі реплікації ДНК?
7. Чому процес реплікації ДНК вважають напівконсервативним?



8. У чому полягає роль праймерів у процесі реплікації ДНК?
9. Що таке мутагенез і які види мутацій розрізняють?
10. Чим процес транскрипції відрізняється від процесу реплікації?
11. Які мутанти мають назву «конститутивні мутанти»?
12. Коли відбувається альтернативний сплайсинг первинного транскрипту в еукаріот?
13. Яку роль відіграє антикодон тРНК у процесі трансляції?
14. У чому полягає сутність методу молекулярного клонування?
15. Яку функцію виконують ферменти рестрикції?
16. Яким чином у ретровірусах відбувається передача генетичної інформації?
17. Що встановлюють у процесі картирування?
18. Які методи секвенування використовують для встановлення послідовності ДНК?
19. З яких процесів складається ПЛР-ампліфікація?
20. Які вимоги до векторів?
21. Які є шляхи клонування ДНК за допомогою транспозонів?
22. Які використовують способи скринінгу бібліотеки для розшуку необхідних клонів генів?

## РОЗДІЛ 3

### ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ В ТВАРИННИЦТВІ

Для виведення поліпшених порід свійських тварин і птиці (корів з більш високим рівнем молочної продуктивності, овець із якісною вовною, курей з більш високою яйцєносністю й ін.) здійснюють безліч раундів схрещувань і відбору, щоразу використовуючи як плідників тварин з найкращими характеристиками. У результаті, згодом, можна отримувати більш-менш чисті лінії високопродуктивних порід тварин. Стратегія схрещування і відбору, що потребує великих тимчасових і матеріальних витрат, виявилася проте дуже успішною, і сьогодні майже всі аспекти біологічних основ виведення нових порід домашньої худоби можуть бути до неї зведені. Однак, після того як ефективну генетичну лінію отримано, запроваджувати нові ознаки за методом схрещування і відбору стає все суужніше. Так, лінія з новим «цінним» геном може нести, також, і «шкідливі» гени, внаслідок чого нащадки можуть виявитися менш продуктивними. Щоб бути впевненими в тому, що нова, поліпшена лінія збереже вихідні корисні ознаки і набуває нових, слід розробити абсолютно нову стратегію.

Багатоклітинний організм вищих тварин є продуктом онтогенетичного розвитку, при якому з однієї клітини (зиготи), що утворилася за результатом злиття двох статевих клітин батьків (гамет), шляхом великої кількості дроблень створюється вся сукупність високодиференційованих клітин органів і тканин організму. Оскільки будь-яка соматична клітина або клітина зародкового шляху, в остаточному підсумку, бере свій початок від двох батьківських клітин, що об'єдналися, вона, як правило, містить у собі всю (або більшу частину) генетичну інформацію батьківських організмів. Незважаючи на те, що ця схема є спрощеною та в міру розвитку диференційованого стану соматичних клітин, їхній генетичний матеріал часто зазнає незворотних перебудов (наприклад, еритроцити тварин взагалі позбавлені ядер), а це підкреслює спадковість генетичного матеріалу в рядах клітинних поколінь соматичних клітин організмів.

Майже всі гени зигот мають шанси бути представленими в

більшості соматичних клітин організму й взяти участь у формуванні їхнього генотипу й фенотипу. Передумови такого роду навели на думку щодо можливості зміни фенотипу багатоклітинних організмів шляхом введення нових рекомбінантних генів у геном зигот, які ще не перетерпіли дроблення в ранньому ембріональному розвитку. У випадку об'єднання з геномом зиготи нові гени повинні розповсюдитися в ряді клітинних поколінь соматичних клітин і експресуватися в більшості з них.

Ідея генетичної зміни тварин шляхом введення генів у яйцеклітини, що запліднені, була реалізована на практиці у 80-х роках. Було введено ряд нових термінів: тварину, чий генотип був змінений шляхом введення чужорідної (екзогенної) ДНК, було названо *трансгенною*, ДНК, що вводиться, – *трансгеном*, а весь процес – трансгенною технологією або *трансгенезом*.

Успішні експерименти щодо введення чужорідних генів до клітин ссавців і можливість створення генетично ідентичних тварин шляхом перенесення ядра з ембріональної клітини в яйцеклітину з вилученим ядром дозволили ввести в хромосомну ДНК вищих тварин окремі функціональні гени або цілі їхні кластери. Використана стратегія полягає в тому, що:

- клонований ген уводять у ядро яйцеклітини, що запліднена;
- інокульовані запліднені яйцеклітини імплантують до реципієнтної жіночої особини;
- відбирають нащадків, що розвилися з імплантованих яйцеклітин, які містять клонований ген у всіх клітинах;
- схрещують тварин, які несуть клонований ген у клітинах зародкової лінії і одержують нову генетичну лінію.

Такий підхід має багато практичних додатків. Наприклад, якщо продукт гена, що вводиться, стимулює ріст, то трансфіковані тварини будуть рости швидше, використовуючи меншу кількість їжі. Підвищення ефективності засвоєння їжі всього на кілька відсотків може істотно знизити вартість кінцевого продукту (яловичини, свинини й ін.).

Експерименти щодо генетичної модифікації багатоклітинних організмів шляхом введення в них трансгенів потребують багато часу. Проте трансгенез став потужним інструментом для дослідження молекулярних основ експресії генів ссавців і їхнього розвитку, для створення модельних систем, що дозволяють вивчати хвороби людини, а також для генетичної модифікації клітин молочних залоз

тварин з метою одержання з молоком важливих для медицини білків. Було навіть запропоновано новий термін «фармінг», що відноситься до процесу одержання з молока трансгенних домашніх (*pharm*) тварин білків людини або фармацевтичних препаратів. Використання молока доцільно тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості і його можна надаювати в міру потреби без шкоди для тварини. Новий білок, що виробляється молочною залозою, секретується у молоко і не повинен при цьому виявляти ніякого побічного ефекту на нормальні фізіологічні процеси, що протікають в організмі трансгенної тварини. Крім того, його виділення з молока, що містить й інші білки, не повинно потребувати великого зусилля.

### 3.1. Способи створення трансгенних тварин

Сучасні технології дозволяють вводити рекомбінантні ДНК до клітин будь-яких типів і досліджувати наслідки експресії в них відповідних генів. Цей процес перенесення генів до клітин вищих організмів також, як і введення бактеріофагів до бактеріальних клітин, називається *трансфекцією*. Трансфекція еукаріотичних клітин, як правило, має два основні етапи: перенесення ДНК через клітинні мембрани у цитоплазму клітин і подальше її транспортування у ядро. На підставі біологічних наслідків, що супроводжують виникнення клітин-трансфектантів, розрізняють *стабільну трансфекцію*, коли рекомбінантні ДНК інтегруються в хромосоми клітин-реципієнтів і стають їх невід'ємною частиною, а також *тимчасову трансфекцію (transient transfection)*, під час якої молекули рекомбінантної ДНК існують і транскрибуються у ядрах у позахромосомному стані нетривалий час.

Трансгенні технології розроблялися й удосконалювалися на лабораторних мишах. На початку 80-х років до різних ліній мишей було введено сотні генів. Ці дослідження значною мірою сприяли встановленню механізмів генної регуляції й розвитку пухлин, природи імунологічної специфічності, молекулярної генетики росту й розвитку, інших фундаментальних біологічних процесів. Трансгенні миші зіграли свою роль у дослідженні можливості великомасштабного синтезу лікарських речовин, а також у створенні трансгенних ліній, що дозволяють моделювати різні генетичні хвороби людини.

Із розвитком техніки молекулярного клонування генів число публікацій щодо отримання і дослідження трансгенних мишей стрімко зросло, поступово розширювався спектр проблем і завдань, що вирішувалися за допомогою трансгенезу. Однією з вражаючих робіт на ранніх етапах трансгенезу були експерименти Пальмітера із співробітниками у 1982 р. щодо мікроін'єкції у зиготи мишей гена гормону росту (*ГТР*) пацюка під контролем сильного промотора металотіонеїнового гена 1 (*MT-1*) миші. Перенесення такої штучної конструкції викликало посилений ріст мишей в онтогенезі і значне збільшення ваги трансформованих тварин, що народилися із ін'єкцьованих зигот (рис. 30).



**Рис. 30. Ліворуч трансгенна миша з геном гормону  
росту бугая і праворуч контрольна миша  
(Газарян К.Г. та ін., 1988)**

У середині 80-х років розпочалися експерименти щодо створення трансгенних сільськогосподарських тварин. До цього часу було підбрано оптимальні умови для візуалізації пронуклеусів зигот сільськогосподарських тварин, оскільки більшість зигот містить значну кількість пігментних і жирових гранул, що утруднює процес мікроін'єкції.

У першій із опублікованих робіт стосовно отримання

трансгенних кролів, свиней і овець використовували як трансген ГГР людини, однак, такого суттєвого прискорення темпів росту тварин, як це було отримано на мишах, не спостерігалось. Поряд із цим, у трансгенних свиней відбулося збільшення ефективності використання їжі і значне зменшення жиру. Хоча необхідно також сказати, що у трансгенних свиней із збільшенням вмісту в крові гормону росту людини спостерігалися відхилення у стані здоров'я.

На початку робіт з трансгенозу було виявлено деякі ускладнення, що пов'язані з технологією. В першу чергу процедура отримання трансгенних тварин поки ще залишається малоефективною. Трансгенні тварини часто менш життєздатні, ніж природні особини. Існують також проблеми із стабільністю експресії трансгена. Все це обумовлює ту ситуацію, що до цього часу трансгенних тварин ще мало використовують у практиці.

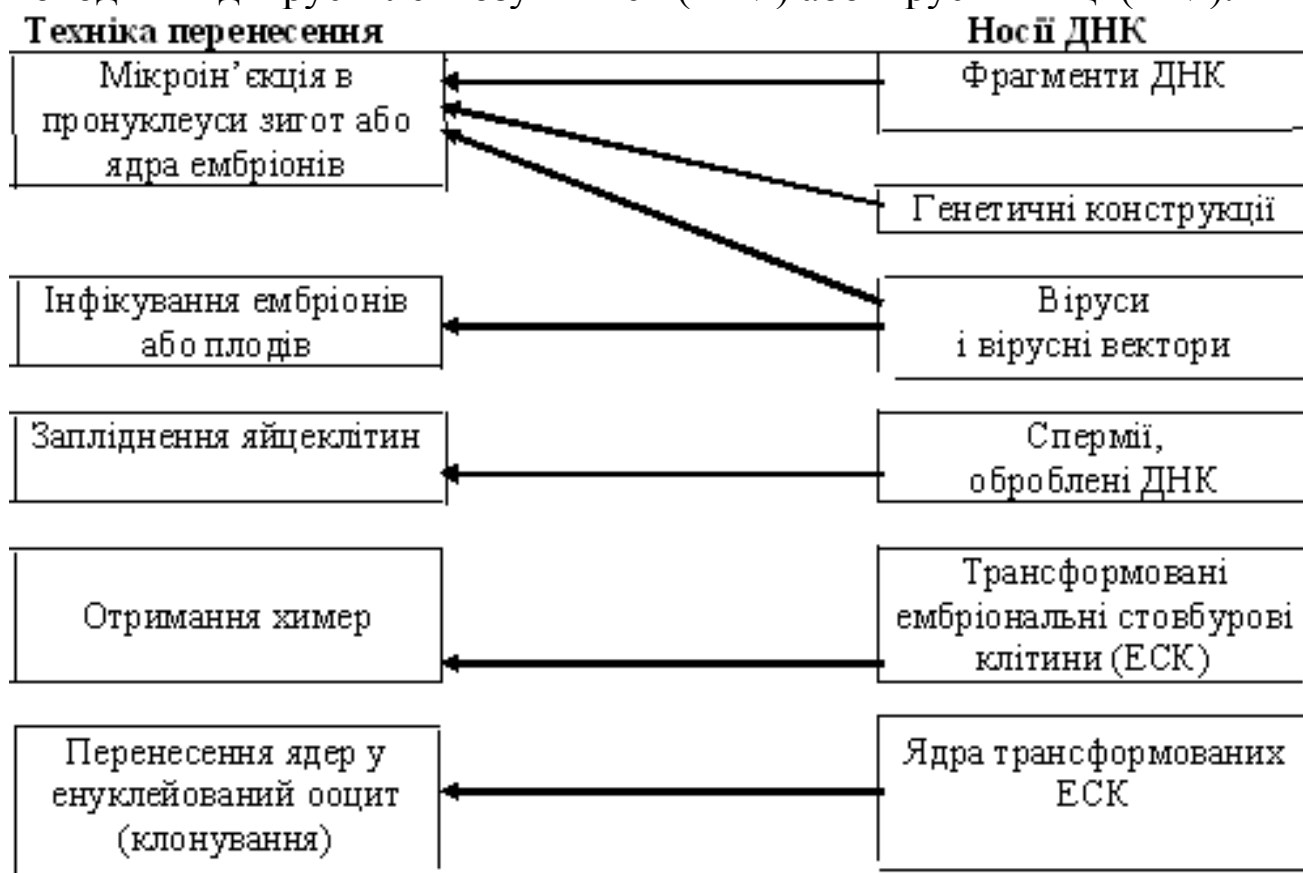
Уведення чужорідної ДНК можна здійснити за різними методами (рис. 31):

- 1) за допомогою ретровірусних векторів, що інфікують клітини ембріона на ранніх стадіях розвитку, перед імплантацією ембріона в самку-реципієнта;
- 2) мікроін'єкцією в збільшене ядро спермія (чоловічий пронуклеус) заплідненої яйцеклітини;
- 3) введенням генетично модифікованих ембріональних стовбурових клітин до предімплантованого ембріона на ранніх стадіях розвитку;
- 4) за рахунок використання сперміїв, що забезпечують інтродукцію трансгену у геном зиготи в найбільш оптимальний період; різновидом цього способу є використання в якості векторів для перенесення чужорідної чДНК в ембріональні клітини ссавців стовбурові клітини сперматогоній (СКС).

### ***Використання ретровірусних векторів***

Одним із методів отримання трансгенних тварин (наприклад, мишей) є зараження передімплантованих ембріонів рекомбінантними ретровірусами. Геном ретровірусів відносно невеликий і з ним досить легко маніпулювати, вводячи до нього чужорідні гени; ретровіруси достатньо інфекційні по відношенню до клітин (майже 100% зараження), а єдина копія ретровірусного генома ДНК точно визначеним чином інтегрується із ДНК клітини-мішені. Клітини, в які потрапили поряд із вірусом чужорідні гени, здатні здійснювати їх

експресію. Рівень експресії клонованих генів значно підвищується внаслідок того, що ретровіруси містять досить активні транскрипційні енхансери (посилювачі). Відомі ретровірусні вектори походять від вірусів лейкозу мишей (*MLV*) або вірусів птиці (*ALV*).

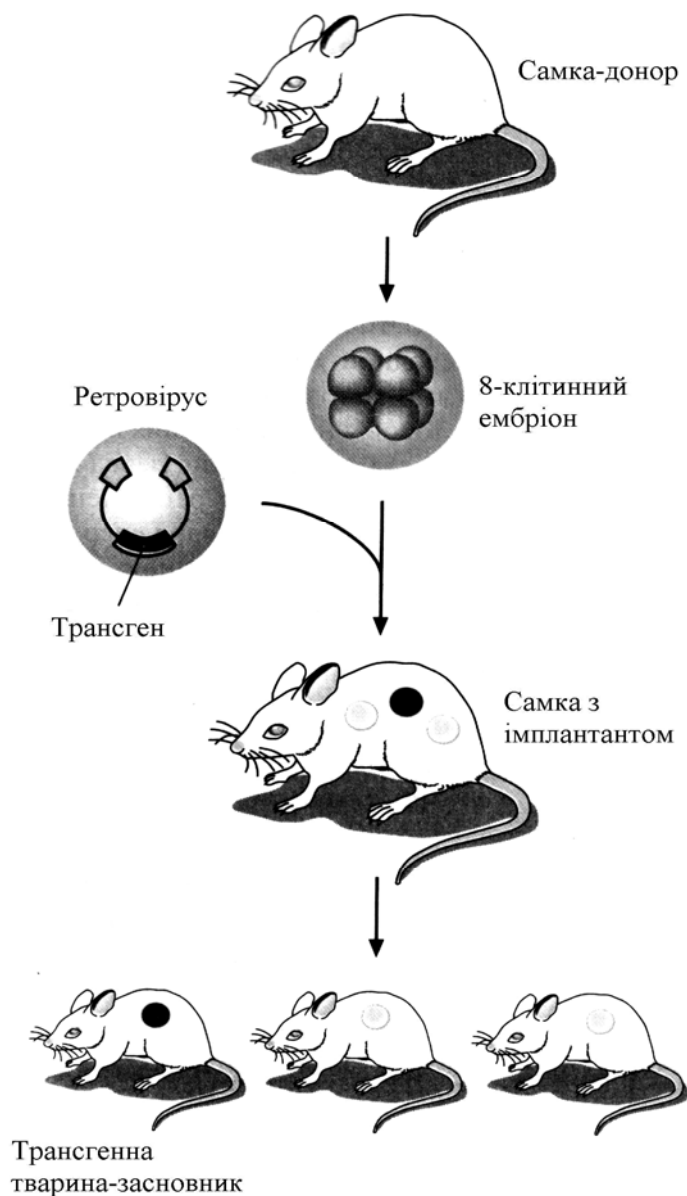


**Рис. 31. Схема основних методів перенесення чужорідних ДНК у геном тварин**

Кожна вірусна часточка містить дві копії одноланцюгового РНК-генома, а після проникнення у клітину цей геном під впливом ревертази перетворюється на лінійну дволанцюгову ДНК. Для інтеграції до генома клітини-мішені дволанцюгова лінійна ДНК вірусу проникає до ядра, де набуває кільцевої форми. Інтегрована лінійна ДНК-копія ретровірусного генома (провірус) містить на обох кінцях довгі нуклеотидні повтори – *LTR* (від англ. *long terminal repeats*). До складу *5'LTR* входить промотор, з якого починається транскрипція генів інтегрованого провірусу; *3'LTR* – сайт поліаденілювання, де здійснюється термінація РНК-транскриптів.

Існує ряд векторів на основі ретровірусного генома. У найпростіших випадках видаляють структурні гени і на їх місце вбудовують один або більше рестрикційних сайтів з метою клонування.

Для зараження рекомбінантним ретровірусом ембріональних клітин, у культуральну рідину із інфікованими фібробластами, що продукують рекомбінантний вірус, поміщають восьмиклітинну морулу, яка звільнена від оболонки. Морула інфікується і після досягнення стадії бластоцисти її вводять у матку псевдовагітної самки. Частина бластоцист може загинути, а частина нормально розвивається і у визначений час трансформується у трансгенних нащадків, які потім підлягають ретельному генетичному аналізу і можуть бути використані для створення трансгенних ліній (рис. 32).



**Рис. 32. Отримання трансгенних тварин за допомогою ретровірусів**



Перевага методу, що заснований на використанні ретровірусних векторів, перед іншими методами трансгенозу полягає в його ефективності. Однак, розмір вставки в цьому разі обмежується 8 т.п.н., внаслідок чого трансген може виявитися позбавленим прилягаючих регуляторних послідовностей, необхідних для його експресії.

Використання ретровірусних векторів має ще один великий недолік. Хоча ці вектори створюються так, щоб вони були дефектними за реплікацією, геном штаму ретровірусу, що необхідний для одержання великої кількості векторної ДНК, може потрапити в те ж ядро, що й трансген. Незважаючи на всі вжиті заходи, ретровіруси можуть реплікуватися в організмі трансгенної тварини, що зовсім неприпустимо, якщо цих тварин передбачається використати в їжу або як інструмент для одержання комерційного продукту. І оскільки існують альтернативні методи трансгенозу, ретровірусні вектори рідко використовуються для створення трансгенних тварин, що мають комерційну цінність.

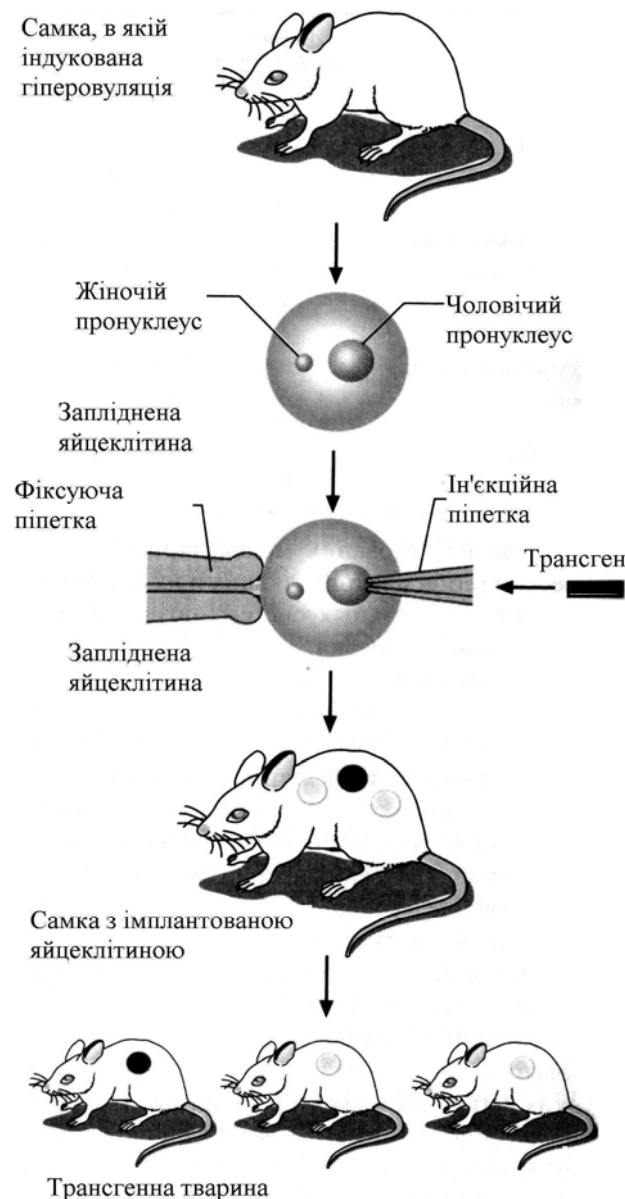
### ***Метод мікроін'єкції ДНК***

У наш час для створення трансгенних мишей найчастіше використовують метод мікроін'єкції ДНК. Він потребує таких дій:

1. Збільшення числа яйцеклітин, в які буде ін'єктована чужорідна ДНК шляхом стимуляції гіперовуляції у самок-донорів. Спочатку самкам вводять сироватку жеребної кобили (СЖК), а приблизно через 48 год. – хоріонічний гонадотропін людини. Внаслідок гіперовуляції утворюється приблизно 35 яйцеклітин замість звичайних 5...10.
2. Схрещування із самцями самок з гіперовуляцією і їхнє умертвіння. Вимивання з яйцепроводів запліднених яйцеклітин.
3. Мікроін'єкції ДНК у яйцеклітини, що запліднені – як правило, відразу після виділення. Часто трансгенна конструкція, що вводиться, перебуває в лінійній формі й не містить прокаріотичних векторних послідовностей.

У ссавців після проникнення спермія до яйцеклітини ядро спермія (чоловічий пронуклеус) і ядро яйцеклітини існують відокремлено. Після того як останнє закінчує мітотичний поділ і стає жіночим пронуклеусом, може відбутися злиття ядер (каріогамія). Чоловічий пронуклеус, звичайно, набагато більший жіночого, його легко локалізувати за допомогою секційного мікроскопа й увести до

нього чужорідну ДНК. При цьому яйцеклітину на час проведення мікроін'єкції можна переміщати, орієнтувати потрібним чином і фіксувати (рис. 33).



**Рис. 33. Отримання трансгенних тварин ін'єкційним методом**

Після введення ДНК від 25 до 40 яйцеклітин імплантують мікрохірургічним шляхом до сурогатної матері, у якої викликають помилкову вагітність схрещуванням з вазектомованим самцем. У мишей спарювання – це єдиний відомий спосіб підготовки матки до імплантації. Оскільки вазектомований самець сперматозоїдів не продукує, жодна з яйцеклітин сурогатної матері не запліднюється. Ембріони розвиваються тільки з введених яйцеклітин, і мишенята народжуються майже через 3 тижні після імплантації.

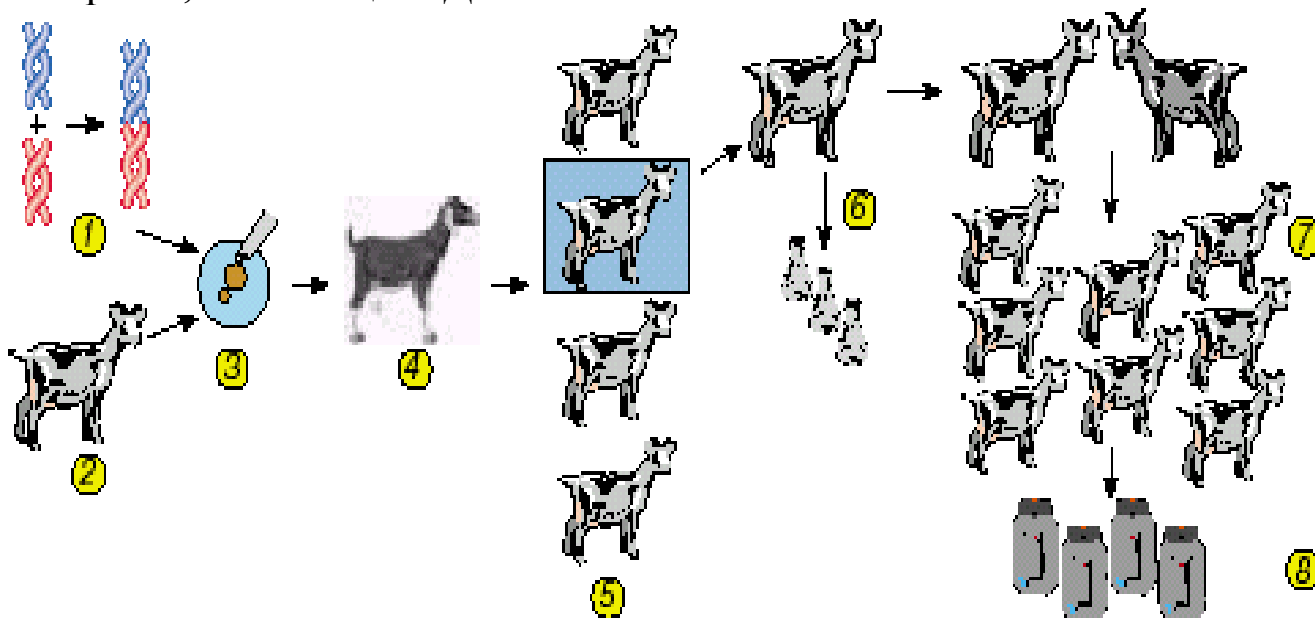
Для ідентифікації трансгенних тварин виділяють ДНК із маленького шматочка хвоста й тестують її на наявність трансгена за допомогою блот-гібридизації за Саузерном, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Щоб визначити, чи перебуває трансген у клітинах зародкової лінії тварини, трансгенну мишу схрещують із іншою мишею. Далі можна проводити схрещування нащадків для одержання чистих (гомозиготних) трансгенних ліній.

Жоден з етапів експерименту не ефективний на всі 100%, тому для мікроін'єкцій необхідно використовувати велику кількість запліднених яйцеклітин. Наприклад, за одержання трансгенних мишей після ін'єкції ДНК виживають тільки 66% запліднених яйцеклітин; мишенята розвиваються приблизно з 25% імплантованих яйцеклітин, причому трансгенними з них виявляються лише 25%. Таким чином, із 1000 імплантованих запліднених яйцеклітин розвивається від 30 до 50 трансгенних мишенят. Крім того, введена ДНК може інтегруватися в будь-яке місце в геномі, і найчастіше безліч її копій входять в один сайт. І, нарешті, не всі трансгенні мишенята матимуть потрібні властивості. В організмі деяких особин трансген може не експресуватися через невідповідне оточення сайту інтеграції, а в організмі інших число копій чужорідного гена буває занадто великим, що може призвести до гіперпродукції білка й порушення нормальних фізіологічних процесів. Незважаючи на все це, метод мікроін'єкцій використовують для одержання ліній мишей, що несуть функціональні трансгени, досить часто.

Мікроін'єкція чужорідної ДНК в запліднену яйцеклітину – зиготу, розроблена для одержання трансгенних мишей, пізніше стала застосовуватися й для одержання великих тварин – продуцентів лікарських білків людини: кролів, кіз, овець, корів (рис. 34). Перший етап такої роботи – це створення генетичної конструкції із заданими властивостями. Так, якщо дослідник хоче створити трансгенну тварину, в якій чужий ген експресується в клітинах епітелію молочної залози і його продукт виділяється в молоко, то створюється конструкція, що містить рекомбінантну ДНК трансгена й промотор гена-казеїну – білка, що входить до складу молока. В ідеальному випадку ця конструкція повинна працювати лише в клітинах молочної залози й лише під час лактації, не маючи побічного впливу на організм трансгенної тварини.

У наш час, коли методи роботи з ембріонами ссавців досить добре розроблені і великий відсоток ембріонів виживає й нормально

розвивається після мікроін'єкції, саме генетична конструкція є тим фактором, що визначає, чи буде трансгенна тварина мати бажані властивості. Генна конструкція в складі бактеріального вектора клонується в культурі бактерій *Escherichia coli*, виділяється й переводиться в лінійну форму, що краще вбудовується в геном ембріона, ніж кільцева ДНК.



**Рис. 34. Етапи отримання трансгенних тварин методом мікроін'єкції генних конструкцій у зиготу:**

1 – отримання зигот для ін'єкціювання; 2 – введення генної конструкції (мікроін'єкція в пронуклеус); 3 – пересадка ембріонів самкам-реципієнтам (реципієнтами відбирають тварин іншої породи, які відрізняються за кольором вовни та іншими породними ознаками); 4 – тварини, які народжені із ін'єкцьованих ембріонів: лише частина з них містить трансген, як правило, ці тварини є гетерозиготними (трансген міститься лише в одній зиготі) або мозаїками (трансген міститься лише в частині тканин і клітин тварин); 5 – здійснення молекулярно-генетичного аналізу для підтвердження наявності гена, що вводився, у складі генома тварини; 6 – відбір тварин, що продукують трансгенні гамети (схрещування трансгенних тварин із тваринами іншої породи). Селекція трансгенних гомозигот; схрещування трансгенних тварин для отримання гомозиготних та нащадків гомозиготних за введеним геном; 7 – отримання стада трансгенних тварин; 8 – виділення лікарського білка з молока і його очищення (за Семеновою М.Л., 2001)

На наступному етапі роботи генетичну конструкцію ін'єкціюють в одноклітинний ембріон – зиготу. У зиготі генетичний матеріал, отриманий від батька й матері, перебуває у двох пухирцях, оточених

ядерною мембраною, – у чоловічому й жіночому пронуклеусах. Необхідна кількість копій генетичної конструкції вводиться за допомогою мікропіпетки, закріпленої в тримачі мікроманіпулятора. Потім ембріони пересаджують самці-реципієнтові, більшість з них нормально імплантуються й розвиваються до народження. Однак, далеко не всі тварини, що народилися з ін'єцьованих зигот, несуть чужорідний ген. А ті, які все-таки є трансгенними, звичайно, виявляються мозаїчними за введеним геном, тобто несуть його не у всіх тканинах організму. Так що для одержання трансгенних тварин велике значення має молекулярно-генетичний аналіз народженого потомства.

На цьому етапі варто мати відповіді на три питання: перше – чи вмонтувався трансген у геном, друге – чи несуть трансген статеві клітини, третє – чи експресується чужорідний ген? Найкраще, коли отриманий трансгенний самець, статеві клітини якого містять чужорідний ген. У цьому разі трансген буде переданий його нащадкам. Самця можна схрестити з багатьма самками, у тому числі й за допомогою штучного запліднення, і швидко вивести численне потомство (покоління  $F_1$ ). Тварини  $F_1$  будуть нести трансген у всіх клітинах організму, але тільки в одній із двох гомологічних хромосом, тобто вони будуть гетерозиготні за введеним геном. Для заснування трансгенної лінії треба одержати покоління  $F_2$ , схрещуючи тварин  $F_1$  між собою. Залишається останній етап роботи – аналіз гомозигот з покоління  $F_2$  на активність трансгена. На цьому етапі визначають, чи експресується трансген і чи є ця експресія специфічною, тобто йде вона в тих органах і тканинах, де її й передбачалося одержати. Якщо конструкція несла промотор одного з білків молока й передбачалося експресія трансгена в клітинах молочної залози, то постає ще одне запитання: чи виділяється трансгенний білок у молоко? Коли, нарешті, в результаті довгого і складного шляху отримані тварини, що відповідають усім цим вимогам, можна вважати, що роботу зі створення лінії трансгенних тварин завершено. Тепер їх можливо поширювати, схрещуючи між собою – всі їхні нащадки успадковують чужорідний ген.

За використання методу мікроін'єкції ступінь інтеграції, тобто число трансгенних тварин від загальної кількості народжених тварин, коливається в незначних межах залежно від виду тварин. Так, у мишей цей показник у середньому становить 15%, у свиней – 10...15%, у кролів – 10%, у овець, кіз і корів – 5...10%. Найбільш

важливим, з погляду витрат для одержання однієї трансгенної тварини, є показник загальної ефективності трансгенозу, що розраховується як відношення числа отриманих трансгенних тварин до загального числа пересаджених ембріонів, вираженого у відсотках. Величина цього показника також відносно постійна й становить у середньому для мишей – 2%, кролів – 1%, овець і кіз – 0,5...1%, свиней і корів – 0,5%. Слід зазначити, що на частоту інтеграції за використання методу мікроін'єкції впливають такі фактори, як ступінь очищення ін'єкційного розчину, форма й концентрація ДНК, склад буферного розчину для мікроін'єкції, якість ембріонів, а також спосіб пересадження ембріонів реципієнтам (нехірургічний, хірургічний, лапароскопічний).

### ***Використання модифікованих ембріональних стовбурних клітин***

Уперше лінія ембріональних стовбурних клітин (ЕСК) була отримана із бластоцист миші М. Евансом, М. Кауфманом і Г. Мартіном у 1981 році. Клітини, виділені з ембріонів мишей на стадії бластоцисти, можуть *проліферувати* (рости і розмножуватися) у культурі. Ці клітини є *поліпотентними* (або *плюріпотентними*), тобто в культурі вони можуть диференціюватися в клітини всіх трьох зародкових листків. У ЕСК не було виявлено ніяких хромосомних *аберацій* (мутацій) – вони зберігали нормальний генотип соматичних клітин. ЕС-клітини – це клітини-нащадки клітин внутрішньої клітинної маси (ВКМ) бластоцисти, які отримують таким шляхом: бластоцисти культивуються на підкладці з фібробластів, осідають на дно чашки Петрі й розпластуються. Клітини ВКМ декілька разів перевівають, і деякі з їх утворюють початок лінії ембріональних стовбурових клітин.

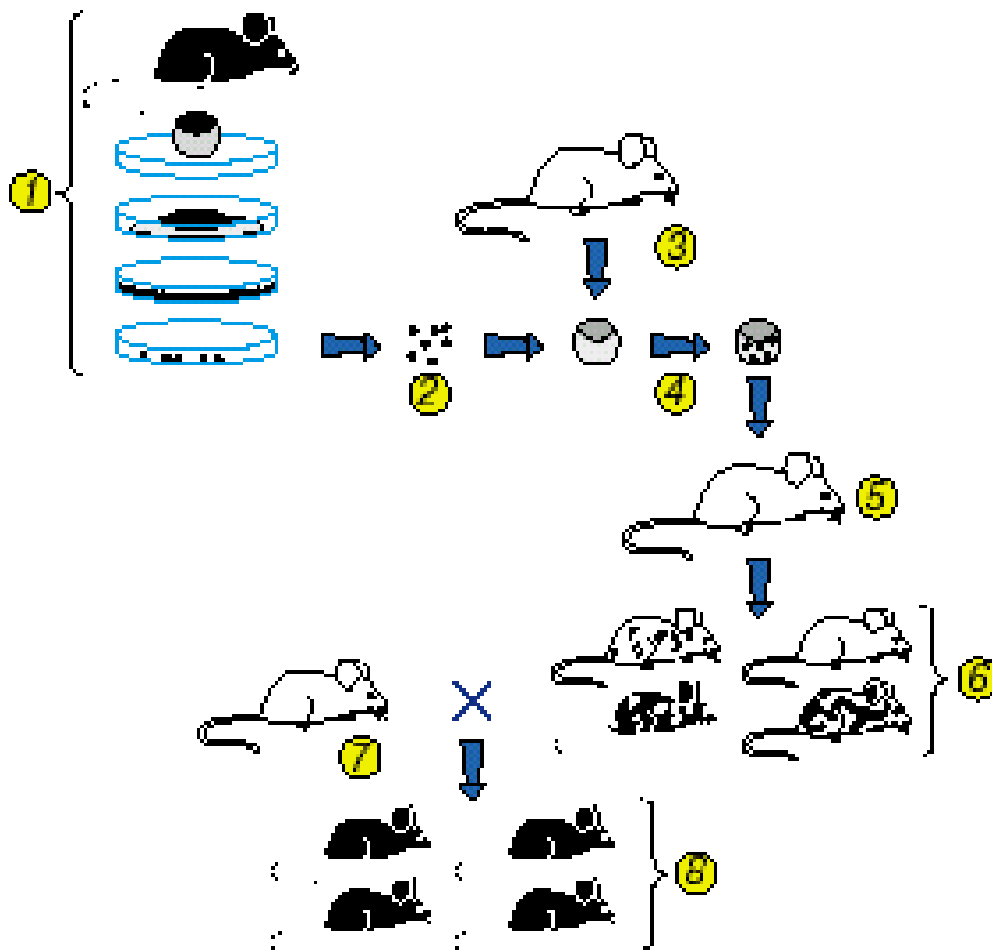
У 1984 році було показано, що ЕСК, введені в порожнину бластоцисти, дають початок будь-яким органам і тканинам химерних мишей, включаючи й лінію статевих клітин, і успадковуються нащадками химерної тварини. На рис. 35 показані етапи одержання трансгенних мишей за допомогою ЕСК. Серед усіх цих процедур одна із трудомісткіших – підтримка лінії ЕСК у недиференційованому стані, придатному для створення химерних тварин. У наш час цю технологію найчастіше використовують для одержання трансгенних мишей, тому що донедавна існували тільки лінії ЕСК миші. Однак, за останні кілька років такі клітинні лінії були отримані із бластоцист багатьох інших ссавців. Список цих видів

постійно поповнюється: золотавий хом'ячок (1988), свиня (1990), вівця (1990), корова (1992), кролик (1993), пацюк (1994), норка (1992), мавпа (1995) і навіть людина (1994).

Схема одержання трансгенних тварин вигідна ще й тим, що в цьому разі використовуються не зиготи, як для мікроін'єкцій, а бластоцисти, які легко вимиваються із статевих шляхів самок великих видів ссавців нехірургічним шляхом. Для всіх видів сільськогосподарських тварин розроблено методики тривалого зберігання ембріонів на стадії бластоцисти в рідкому азоті й методи нехірургічної трансплантації їх сурогатним матерям.

Перевагою одержання трансгенних тварин за допомогою ембріональних стовбурних клітин є можливість тестування інтеграції трансгену в культурі клітин. Це означає, що кожний ембріон, що розвився в культурі після пересадження ядер, буде трансгенним і наступна селекція трансгенних ембріонів не потрібна. Крім того, пересадження таких ембріонів реципієнтам приведе до народження тільки трансгенних нащадків. Використання для одержання трансгенних тварин трансформованих ЕСК дає можливість у ряді випадків проводити оцінку експресії трансгенів, що має важливе значення. При мікроін'єкції трансгени навмання інтегруються в будь-яку частину генома. Це означає, що вони можуть руйнувати досить істотні гени (*інсерційні мутації*) або розміщуватися в тих частинах хромосоми, які недоступні для транскрипції. Тестування експресії в культурі уможливить використання для пересадження ядер, а отже й для одержання трансгенних тварин тільки тих клітинних ліній, у яких трансгени є транскрипційно й трансляційно активними.

У 1997 році надійшло повідомлення щодо виведення трансгенних овець за допомогою пересадження ядер стабільно трансформованих первинних фетальних фібробластів. Ступінь трансгенності за використання даного методу становила 100%, у той час як застосування методу мікроін'єкції в тій же лабораторії дозволяло одержати лише 4,35% трансгенних нащадків від числа народжених тварин.



**Рис. 35. Схема отримання трансгенних тварин шляхом реконструкції ембріонів із використанням ембріональних стовбурових клітин:**

1 – отримання культури ЕСК; 2 – уведення у ЕСК генетичної конструкції; 3 – отримання бластоцист для мікроін’єкції: їх отримують від тварин іншої лінії, що відрізняється забарвленням шерсті; 4 – конструювання химерних ембріонів: трансгенні ЕСК уводять у порожнину бластоцисти; 5 – трансплантація химерних ембріонів сурогатної матері; 6 – аналіз тварин, що народилися. Частина з них є химерами, тобто до складу їх організму входять як клітини, що походять із звичайної бластоцисти (на рисунку показані білим кольором), так й клітини-нащадки трансгенних ЕСК (на рисунку – чорні). Для схрещування відбираються тварини, в яких відсоток трансгенних клітин більший; 7 – схрещування химерних самців із самками альбіносною лінії і аналіз їх нащадків для виявлення химерних тварин, які продукують трансгенні гамети; 8 – схрещування мишей покоління тварин  $F_1$  для отримання нащадків, гомозиготних за введеним геном (за Семенової М.Л., 2001)



Як і за використання ЕСК, даний метод дозволяє проводити аналіз інтеграції в культурі клітин, а також здійснювати цілеспрямоване вбудовування генних конструкцій у бажані ділянки генома. Крім того, використані клітинні лінії можуть бути каріотипізовані в культурі, що дозволить заздалегідь визначати стать трансгенних тварин. Якщо, наприклад, потрібно отримати тварин, що синтезують рекомбінантні білки в молочній залозі, то доцільне народження первинних трансгенних особин жіночої статі, що уможлиблює їхнє безпосереднє тестування на наявність експресії. Після одержання трансгенних тварин з різних клітинних ліній і визначення рівня експресії може бути зроблений відбір бажаних клонів для їх подальшого використання у пересадках ядер.

ЕСК відкрили нові можливості для створення тварин як з додатково введеними генами, так і з генами, що виключені. Виключення у тварини певного гена називають **генним нокаутом** або **генним таргетингом**. Нормальний ген в ЕСК замінюється на «зламану» копію, що містить вставку – послідовність, що кодує білок неоміцинтрансферазу. У результаті такої транслокації в клітині відбуваються дві події: по-перше, через вставку зрушується рамка зчитування й білок, що кодується за цим геном, не синтезується, а, по-друге, експресія вставленого гена неоміцинтрансферази робить клітину стійкою до впливу неоміцину. При здійсненні нокауту в культурі ЕСК відсоток клітин із транслокацією дуже низький, але тільки вони виживають у селективному середовищі, що містить антибіотик неоміцин.

У першу чергу технологія таргетингу зробила суттєвий внесок у генетику миші та аналіз різних аспектів функції генів *in vivo*. Внаслідок використання таргетингу генів були створені чисельні трансгенні миші із різноманітними цілеспрямованими змінами генів, починаючи від точкових мутацій і закінчуючи хромосомними перебудовами (рис. 36).

Таким чином, генний нокаут, як і перенесення генів, мітохондрій і цілих хромосом, дозволяє не тільки визначати функцію гена, а й модулювати деякі патології людини. У наш час цей прийом стає одним із ключових у молекулярній генетиці. Його надзвичайна важливість на даному етапі досліджень визначається масовим переходом від досліджень щодо структурної генетики до функціональної генетики.



**Рис. 36. Схема отримання трансгенних мишей шляхом спрямованої зміни (таргетингу) гена в ЕСК**

### ***Використання сперматозоїдів як векторів трансгена***

Як природний вектор, що доставляє ДНК до клітин, можуть бути використані сперматозоїди. Вже в 1971 році була показана можливість перенесення ДНК SV40 до яйцеклітин кролів після штучного запліднення спермою, що попередньо інкубувалася із ДНК.

У досвідах М. Лавітрано зі співавторами (1989) 30% мишей, отриманих після запліднення обробленої ДНК спермою, виявилися трансгенними й передавали трансген нащадкам. Наступні численні спроби в інших лабораторіях в усьому світі виявилися неуспішними. Аналіз 1300 мишей, що народилися після запліднення *in vitro* обробленої ДНК спермою, не виявив наявності трансгена в жодній з досліджених особин. Дослідження показали, що за застосування методу перенесення ДНК за допомогою сперматозоїдів у одній і тій же лабораторії, навіть за використання однакової схеми досліджень, можуть бути отримані суперечливі результати. Це дозволяє припустити, що вбудовування ДНК відбувається тільки на певній стадії клітинного циклу. Однак дотепер не встановлений механізм інтеграції екзогенної ДНК у геном сперматозоїдів.

Досліджували, так само, здатність сперматозоїдів поглинати лінійну ДНК *in vitro* і *in vivo*. Наявність чужорідної ДНК було показано в 60...70% сперматозоїдів після обробки *in vitro* і *in vivo*. Позитивний сигнал був виявлений у ядрі сперміїв і не зникав за обробки ДНКазою. Таким чином, було показано, що сперматозоїди як *in vitro*, так і *in vivo* здатні поглинати ДНК і акумулювати її в ядрі, а також те, що секрети придатків і сім'яних каналців не блокують цей процес.

Для підвищення ефективності зв'язування ДНК зі сперматозоїдами використовують різні методи: ДНК-ліпосомні комплекси, ін'єкцію в сім'яники, безпосередню ін'єкцію в сім'яні каналці й придатки, ін'єкцію в сім'яні каналці з наступною електропорацією, доін'єкцію головок сперміїв і ДНК в ооцити.

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

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

Нещодавні дослідження виявили, що перенесення трансгенів за допомогою сперматозоїдів у геном зиготи може здійснюватися не лише в умовах *in vitro*, але і за запліднення *in vivo*. В цих експериментах відмиті від сім'яної плазми сперматозоїди кнура утримували в культуральному середовищі з плазмідною, що містила трансген, протягом 30 хвилин, після чого оброблені сперматозоїди центрифугували до об'єму 1 мл і вносили в кожен ріг матки за допомогою ін'єкції по 0,5 мл трансформованих спермій. Відсоток запліднення свиноматок склав 73 (16 свиноматок з 22), і 10 з 48 (21%) поросят виявилися трансгенними.

Використання сперматозоїдів як носіїв трансгена за запліднення *in vivo* дуже спрощує технологію отримання трансгенних тварин і може дуже збільшити частоту інтеграції чужорідних генів.

Велику увагу останнім часом приділяють маніпуляції зі стовбуровими клітинами сім'яників – сперматогоніями. Було продемонстровано можливість перенесення сперматогоній від одного самця іншому як у тварин одного виду (миша), так і між двома різними видами тварин (миша – пацюк). Крім того, була показана можливість успішного протікання сперматогенезу після пересадження кріоконсервованих клітин сім'яників мишей, а також після їх тривалого культивування (більше трьох місяців).

Успішне тривале культивування статевих клітин тварин *in vitro* уможливорює проведення трансформації сперматогоній екзогенної ДНК із наступною селекцією. Нагано Р. зі співавторами (2000) повідомили про успішне введення екзогенної ДНК у сперматогонії *in vitro* і *in vivo* за допомогою ретровірусної системи доставки. Експресію ретровірусної генної конструкції, що включає *lacZ*, спостерігали в сім'яниках більше шести місяців. Аналіз показав, що принаймні 1 з 300 стовбурових клітин сім'яників містив трансген.

У поєднанні з пересадженням трансформованих статевих клітин у сім'яники реципієнтів і успішним протіканням сперматогенезу даний підхід може бути використаний для одержання трансгенних нащадків.

Найбільш важливі теоретичні та експериментальні досягнення світової науки у створенні генетично модифікованих тварин узагальнені у табл. 5.

## Досягнення у використанні трансгенних технологій

Рік	Подія	Автор
1971	Доставка чужорідної ДНК в ооцити кроля сперматозоїдами.	<i>Bracket et al.</i>
1985	Одержання трансгенних сільськогосподарських тварин методом мікроін'єкції.	<i>Brem et al.</i> <i>Hammer et al.</i>
1986	Ембріональні химери з використанням ЕСК. Одержання овець за допомогою пересадки ядер.	<i>Gossler et al.</i> <i>Willadsen</i>
1987	Одержання ВРХ методом пересадки ядер.	<i>Prather et al.</i>
1988	Одержання кролів методом пересадки ядер.	<i>Stice u Robl</i>
1989	Одержання трансгенних мишей і свиней за допомогою сперміїв як векторів. Одержання трансгенної ВРХ методом мікроін'єкції. Одержання свиней методом пересадки ядер.	<i>Lavitrano et al.</i> <i>Gandolfi et al.</i> <i>Roschlau et al.</i> <i>Prather et al.</i>
1995	Одержання трансгенної ВРХ за допомогою сперміїв.	<i>Schelandar et al.</i>
1996	Одержання овець методом пересадки ядер ембріональних клітин, що культивуються. Одержання ЕСК приматів.	<i>Campbell et al.</i> <i>Thomson et al.</i>
1997	Одержання овець методом пересадки ядер фетальних і соматичних клітин. Трансгенні вівці отримані методом пересадки ядер трансформованих клітин, що культивуються. Химерні трансгенні свині із використанням ЕСК.	<i>Wilmot et al.</i> <i>Schnieke et al.</i> <i>Piedrahita et al.</i>
1998	Одержання трансгенної ВРХ за допомогою: – пересадки ядер фетальних фібробластів; – псевдотипних ретровірусних векторів; – пересадки ядер диференційованих клітин.	<i>Cibelli et al.</i> <i>Chan et al.</i> <i>Kato et al.</i>
2000	Одержання свиней методом пересадки ядер соматичних клітин (клітини гранульози)	<i>Polejaeva et al.</i>

Останнім часом, працюючи із тваринами, досліджують можливість застосування нового методу введення чужорідної ДНК у

геном реципієнта – балістичної трансфекції, спочатку розробленого для генетичної трансформації рослинних клітин, сутність якого полягає у бомбардуванні клітин, які трансфікуються, швидколітаючими мікрочастинками важких металів (вольфрам, золото), що несуть на собі чДНК; проникаючи в ядро клітини, мікрочастинки переносять туди ген, що інтродукується.

У результаті проведених експериментів була продемонстрована експресія внесеного таким способом гена  $\beta$ -галактозидази в ембріонах мишей, що розвиваються (2-клітинних, морулах, бластоцистах), при цьому експресія трансгена залежала від стадії розвитку трансфікованих ембріонів, тобто від імовірності його влучення в клітини-реципієнти, що перебувають в S-фазі клітинного циклу. Крім того, на мишах і пацюках показана можливість балістичної інтродукції чужорідних генів у соматичні клітини (печінки, м'язів, шкіри) живого організму *in situ*, що може бути використано для генної терапії й генетичної імунізації.

**Трансфекція клітин за допомогою фосфату кальцію** є одним із методів введення рекомбінантних ДНК, що найбільш широко використовується, але важко відтворюються. Розчин  $\text{CaCl}_2$  поряд із ДНК, що в ньому міститься, повільно змішують із фосфатним буфером, внаслідок чого утворюється нерозчинний фосфат кальцію і одночасно відбувається осадження ДНК. Суспензія вноситься у чашки Петрі, де культивуються клітини. Через деякий час часточки фосфату кальцію, що містять ДНК, сорбуються на поверхні клітин і проникають усередину внаслідок ендцитозу. У подальшому незначна фракція рекомбінантної ДНК з'являється в ядрі, де може бути інтегрованою до хромосоми або деякий час існувати у позахромосомному стані. Метод дуже простий у реалізації, однак дуже чутливий до умов здійснення експерименту (концентрації ДНК і  $\text{CaCl}_2$ , значенням рН, тривалості трансфекції) і тому важко відтворюється. Надмірна тривалість інкубації клітин з фосфатом кальцію викликає його цитотоксичний вплив. З урахуванням цього, для кожної лінії клітин потрібне здійснення ретельної оптимізації умов.

**Ліпосоми і трансфекція.** Використання ліпосом є ще одним ефективним, популярним і універсальним методом уведення рекомбінантних ДНК до клітин тварин і людини. Для створення ліпосом найчастіше використовують катіонні ліпіди, що є *амфіфільними* (здатними приєднувати з обох боків) молекулами, які

самоасоціюються і у присутності ДНК, завдяки електростатичним та іншим взаємодіям, конденсуються у часточки, що дістали назву *ліпоплекси (lipoplexes)*. Ліпоплекси, що несуть сумарний позитивний заряд, взаємодіють із сіаловими кислотами клітинних мембран і забезпечують ефективне проникнення ДНК усередину клітини в процесі ендоцитозу. Незважаючи на те, що більшість ДНК, яка потрапила у лізосоми, деградує, значна їх фракція доставляється в ядро клітин, що трансфекуються.

Для отримання ліпоплексів катіонні ліпіди і ДНК змішують у безсироватковому поживному середовищі, оскільки сироватка запобігає їх об'єднанню, і клітини, що культивуються, короткочасно інкубують в їх присутності. Метод дозволяє здійснювати як тимчасову, так і постійну трансфекцію з утворенням стабільних клітинних ліній. За допомогою ліпосом вдається здійснити трансфекцію у складних випадках тих клітинних ліній, які не піддаються введенню рекомбінантних ДНК іншими способами. Більш того, даний метод допускає проведення трансфекції у суспензійних культурах, не потребує мітотичного поділу клітин під час проведення експерименту і, як правило, високо відтворювальний.

### **3.2. Трансгенні тварини із заданими ознаками**

Одним з основних напрямків генної інженерії на першому етапі була зміна спадковості тварин відносно *збільшення швидкості росту*, підвищення надоїв і поліпшення якості продукції.

Ріст тварини є складним процесом, який залежить від дії генів, умов годівлі і факторів навколишнього середовища. З генетичної точки зору найбільш цікаві гени, що кодують протеїни каскаду гормону росту, а саме, безпосередньо гормон росту (ГР), релізінг, фактори гормону росту (РФ ГР) і інсуліноподібний фактор гормону росту (ІФ ГР).

Перших трансгенних мишей з геном ГР виведено у 1982 р. У них була встановлена підвищена швидкість росту (в чотири рази) і подвоєна жива маса.

Що стосується сільськогосподарських тварин, то у трансгенних свиней і овець не спостерігалось відповідного прискорення росту або підвищення його не перебільшувало 15...16% порівняно з контролем. Деякі дослідники пояснюють це тим, що піддослідні тварини

походять з популяцій, в яких протягом десятиліть проводилася селекція за цим показником. Генетичний потенціал росту цих тварин, очевидно, є недалеко від потенційного плато і тому додатковим уведенням гену гормону росту можна досягти лише незначного ефекту у швидкості росту.

Поряд із цим, відмічено збільшення вмісту білка і зменшення вмісту жиру в тканинах трансгенних тварин з генами гормону росту, що значно підвищує якість і товарну цінність отриманих м'ясопродуктів. Так, товщина шпигу в трансгенних свиней – 7...8 мм проти контрольних 18...20 мм. Аналогічно трансгенні вівці мають жиру 5...7% порівняно з 25...30% контрольної групи.

У наш час основними напрямками створення трансгенних тварин є:

- тварини стійкі до захворювань;
- тварини з поліпшеним складом м'яса і молока;
- тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення;
- тварини призначені для ксенотрансплантації.

**Трансгенні тварини стійкі до захворювань.** Резистентність – це спадкова генетично обумовлена сприйнятливність тварин до певних мікроорганізмів, вірусів, шкідників або токсинів. Тому можливо отримати трансгенних тварин з чужорідними генами, що забезпечують несприйняття цих тварин певних захворювань. Вторгненню і розмноженню збудників запобігають, головним чином, імунні механізми і експресія генів, що відповідають за синтез таких речовин, як інтерферони, нейропептиди, гормони й інтерлейкіни.

Досліджується можливість отримання трансгенних тварин, які здатні збільшити вміст лактоферину в тканинах молочної залози з метою підвищення резистентності до маститу.

Значний інтерес викликають дослідження щодо отримання трансгенних тварин з генами антисмислової РНК (асРНК). Експресія її у клітинах спричиняє наступну гібридизацію із смислової РНК вірусу і, відповідно, інгібування реплікації вірусного геному. Створені трансгенні кролі, кури, велика рогата худоба з геном асРНК проти вірусу лейкозу, стійкі до зараження лейкозом.

**Трансгенні тварини з поліпшеним складом молока.** Окремою метою трансгенезу великої рогатої худоби є зміна вмісту в молоці різних його компонентів. Її можна досягнути як кількісно, за рахунок зміни співвідношення компонентів молока, так і якісно, шляхом



додавання інших компонентів, що відсутні у складі природного молока, але вони посилюють його поживну цінність. У молоці містяться чотири основні компоненти: жир, білок, лактоза і транспортний компонент.

З економічної точки зору існує інтерес збільшити вміст казеїну в молоці, що поліпшує процеси виробництва сиру. Вважають, що молочна залоза обмежена у здатності синтезувати білок. Будь-яке додаткове створення білка компенсується зменшенням кількості інших білків молока. Враховуючи це, є другий можливий шлях збільшення рівня казеїну, а саме, гальмування виробництва білків, що менш корисні. Для цього підходить  $\beta$ -лактоглобулін, який існує лише в молоці жуйних і є основним алергентом молока корови. Зменшення його кількості поліпшує склад молока. Для вирішення цієї проблеми використовували асРНК.

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

Отримані трансгенні вівці з геном хімозину, які продукують з молоком у середньому 200...300 мг ферменту хімозину на 1 л молока. Це джерело отримання хімозину – основного компонента для виробництва сиру – може замінити традиційний спосіб отримання його з сичугу молочних телят і ягнят, але його вартість буде в 5...10 разів меншою.

Молоко, поряд зі своєю цінністю як продукту, може використовуватися і як транспортний засіб для інших речовин, що збільшують не лише його поживні, а також і функціональні властивості. Наприклад, лактоферин, кислий білок молока людини з бактеріостатичними властивостями, що посилює адсорбцію заліза. Він міститься в молоці корів у незначній кількості і з його збільшенням можна досягнути декілька цілей. Оскільки він поліпшує адсорбцію заліза, то за його рахунок можна захистити збереженість нащадків, крім того, він контролює розмноження бактерій.

Синтез молочною залозою лізоциму не тільки забезпечує антибактеріальний вплив, а й зменшує ймовірність захворювання на мастит, викликає специфічний пасивний імунітет у новонароджених.

Крім того, він також сприяє збільшенню виходу сиру, оскільки пов'язаний з казеїнами.

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

**Трансгенні тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення.** Трансгенні тварини – біореактори. Біореакторами називають організми, продуценти лікарських білків. Біореакторами можуть бути будь-які живі організми – бактерії, гриби, рослини, тварини і, навіть, клітинні культури. У кожного з таких організмів-біореакторів є переваги й недоліки. Бактерії, наприклад, легко модифікуються методами генної інженерії, швидко розмножуються і їх зручно використовувати в промислових біотехнологічних установках. Таким методом роблять генно-інженерний інсулін людини – у цей час найбільш якісний з тих, що одержують промисловим способом інсулінів. Однак, для нормального функціонування білків людини дуже важливі ті зміни, які відбуваються на післятрансляційному рівні: глікозилірування, ацетилювання, фосфорилірування, карбоксилірування й деякі інші перетворення. Більша частина біохімічних механізмів, що забезпечують ці процеси, відсутня у прокариот, і білки, синтезовані ними з матриць генів людини, не повністю ідентичні білкам із клітин людського організму. Інша складність пов'язана з виділенням і очищенням лікарського білка – бактеріальні клітини йдуть у переробку цілком, і тому важко позбутися всіх сторонніх домішок у кінцевому продукті. Трансгенні дріжджові культури й культури клітин людини не мають цих недоліків, але продуктивність таких систем у цей час нижча за ту, що вже отримана в експериментальних трансгенних тварин. Незважаючи на активний розвиток біотехнології в останні десятиліття, основним джерелом багатьох необхідних фармакології лікарських білків людини є донорська кров. Це фактори зсідання крові – фібриноген, антитромбіни, альбумін, імуноглобуліни й інші білки, без використання яких важко уявити собі сучасну медицину. Достатня кількість якісних і дешевих лікарських білків людини могло б урятувати багатьох пацієнтів.

Гетерогенні білки можуть бути отримані більшістю тканин тіла тварини. Шляхом поєднання структурних генів із специфічними регуляторними елементами можливо досягнути експресії трансгена у

певних органах.

Найбільший прогрес у виробництві трансгенних продуктів був досягнутий у цілеспрямованій трансгенній експресії в епітеліальній клітині молочної залози і синтезі білків поряд з молоком. Структурний ген, що пов'язаний з промотором гена молочної протеїну, в першу чергу, буде здійснювати експресію у клітинах молочної залози. Використання молока доцільне тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості, його можна надаювати за необхідністю без шкоди для тварини. Запропоновано новий термін **біофармінг**, який належить до процесу отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів.

Одним з основних етапів у отриманні трансгенних тварин, які продукують гетерогенний білок з молоком, є ідентифікація промотору, що буде спрямовувати експресію у секреторній епітеліальній молочної залози. В наш час виділені промотори  $\alpha$ S1-казеїну,  $\beta$ -казеїну,  $\alpha$ -лактоальбуміну,  $\beta$ -лактоглобуліну і сироваткового кислого протеїну (*WAP*).

Стратегія цих робіт така: отримати трансгенну тварину, в якій чужий ген експресується в клітинах молочної залози й продукт роботи цього гена виділяється в молоко. Тоді одержання лікарського білка зведеться до процесу, що відомий людині вже багато тисяч років, – до доїння. Апаратами механічного доїння, звичайно, користуються, але є апарати, що дають можливість подоїти козу, вівцю, свиню, кролика й навіть мишу. Трансгенні тварини дозволять вирішити й ще одну проблему – проблему очищення лікарських білків. Навіть якщо після очищення в препараті залишаться домішки, це будуть нетоксичні для людини білки молока.

Сьогодні більша частина тварин, що виділяє трансгенні продукти в молоко, – це миші. Миші з їхнім коротким терміном вагітності й росту – зручний об'єкт для аналізу експресії введеної генної конструкції, на них відпрацьовують ті методики, які потім використовують для одержання великих трансгенних тварин. Список трансгенних ссавців, що виділяють продукт активності чужорідного білка в молоко, є такий: кролі –інтерлейкін-2 (нг/мол) і тканинний активатор плазміногену (мкг/мол), вівці – 1-антитрипсин (мг/мол) і фактор зсідання крові IX (нг/мол), кози – тканинний активатор плазміногену (мкг/мол). У цей час активно ведуться роботи з одержання тварин-продуцентів рекомбінантних імуноглобулінів людини – вони з'являться в найближчі роки, і галузь їхнього

застосування майже безмежна.

Яку ж кількість трансгенних тварин необхідно отримати, щоб забезпечити потребу в лікарських білках людини? Коли намагаються співвіднести можливу продукцію білка людини й потребу в ньому, то результати аналізу дивують. Так, для того, щоб забезпечити всю світову потребу у факторі зсіданні крові IX, потрібно отримувати за рік до 85 кг цього білка, а для фактора зсідання крові VIII ця кількість і того менша – до 7 кг. При рівні продукції трансгена в 1 мг на 1 мл молока (а сьогодні це цілком реальний рівень) корова, що виробляє до 6 тис. л молока за рік, може зробити до 6 кг лікарського білка. Всю потребу в факторі VIII зможе забезпечити одна або дві корови-біореактори, а для одержання фактора IX у кількості, достатній для всіх хворих на гемофілію у світі, необхідно всього лише маленьке стадо з 15...20 трансгенних корів. Потреба медицини в інших білках, одержуваних із крові людини, більша. Так, для фібриногену це до 3 т. Таку кількість зможе забезпечити стадо в 500 трансгенних корів – одна тваринницька ферма.

Серед рекомбінантних білків, отриманих з молока трансгенних тварин, відомі такі: білок С людини, що запобігає утворенню тромбів; VIII і IX фактори зсідання крові проти гемофілії; тканинний плазмінно-генний активатор, що використовується для лікування венозних тромбів і емболії легеневої артерії; лактоферин; інтерлейкін-2; альфа-1-антитрипсин для лікування емфіземи легень; моноклональні антитіла для лікування різних форм раку.

А ще одне джерело повноцінних білків, частину з яких можна замінити лікувальними, – це яйця. Донедавна головним недоліком пернатих біореакторів була занадто мала концентрація потрібних білків – промислове виробництво при цьому було б нерентабельним.

Восени 2005 року одночасно дві фірми перебороли цей бар'єр. Каліфорнійська *Origen Therapeutics* отримала моноклональні антитіла до раку передміхурової залози в кількості 1...3 мг на яйце. До того ж протиракова активність цих антитіл виявилася в 10...100 разів більшою за антитіла, які отримано звичайним методом, за допомогою химерних клітин. А британська фірма *Oxford Biomedica* у співробітництві з американською компанією *Viragen* і Рослинським інститутом отримали в білку трансгенних яєць антитіла проти одного з видів раку шкіри – меланоми.

Для селекції курей потрібно менше часу, ніж для кіз і тим більше корів. Собівартість виробництва лікувальних курячих білків

буде невисокою: головне – створити трансгенну породу, а далі, із цілою біофабрикою буде не більше турбот, ніж зі звичайною птахофермою. Це дозволяє сподіватися, що пернаті біореактори зможуть змагатися не тільки з ссавцями, а й із традиційними методами одержання вакцин, антитіл та інших білків для потреб медицини.

**Ксенотрансплантація.** Трансгенні тварини можуть стати донорами органів і тканин для пересаджування людині. Основна проблема міжвидової трансплантації – це гіпергостре відторгнення. Воно пояснюється тим, що антитіла організму господаря зв'язуються з антигенними детермінантами на поверхні клітин пересаженого органу, виникає гостра запалювальна реакція (*активація каскаду комплементу*) і швидка втрата трансплантованого органу.

У природних умовах реакція запалювання блокується особливими білками (супресорами). Було зроблено припущення, що коли тварина-донор має один або декілька білків людини – інгібіторів запалювального процесу, то орган, який пересажено, буде захищений від первинної запалювальної реакції.

Із цією метою вивели трансгенних свиней, які несуть різні людські гени інгібітору комплементу. Клітини однієї із цих тварин виявилися зовсім нечутливими до компонентів системи каскаду комплементу. Попередні експерименти з пересадження органів трансгенних свиней приматам показали, що тканини пересаженого органа ушкоджуються рідше, а сам орган не відторгається трохи довше. Можливо, трансгенні свині, що несуть людський ген інгібітору комплементу й позбавлені основного поверхневого білка клітин свиней, що викликає найгостріше відторгнення, можуть стати джерелом органів для трансплантації людині.

Вважають, що на першому етапі ця технологія буде використана для заміни інсулінотерапії у хворих на діабет персадкою людині тканин острівців Лангенгарса, що синтезують інсулін.

**Створення тварин – генетичних моделей спадкоємних захворювань людини.** Багато хвороб мають спадкоємні причини. І це стосується не тільки моногенних захворювань, що відбуваються через мутацію в якомусь одному певному гені. Часто причиною захворювання є цілий комплекс порушень генома: присутність алелей, що визначають схильність до захворювання, гіперфункція якихось генів через наявність додаткових копій цього гена або порушень у його регуляції й багато інших, але з генетично

визначеними причинами. До цієї групи належить більша частина захворювань серцево-судинної й нервової систем, багато ендокринних захворювань. Часто важко встановити конкретну причину захворювання, співвіднести виявлені у пацієнта генетичні дефекти з його анамнезом. В останні 10 років для вирішення цих питань усе частіше залучаються трансгенні моделі спадкоємних захворювань людини.

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

***Розробка методів генної терапії на основі вивчення трансгенних тварин.*** До будь-якого втручання в геном людини необхідно підходити з набагато більшою обережністю, ніж до втручання в геном інших видів тварин і рослин, але бувають ситуації, коли саме такі методи можуть урятувати хворого. Одна з таких ситуацій – ракове захворювання. Надії на лікування хворих від СНІДу також пов'язують із генною терапією. При цьому використовується соматична трансфекція – метод, коли генетичні конструкції вводяться в певні клітини й тканини організму пацієнта. За даними Американської асоціації охорони здоров'я за 2006 рік тільки в США до клінічних випробувань було допущено близько 300 генотерапевтичних розробок. Як і всі інші методи лікування, генотерапевтичні методи розробляються й проходять випробування на модельних трансгенних тваринах.

### 3.3. Види трансгенних тварин

**Трансгенні корови.** Якщо передбачається використовувати молочну залозу як біореактор, то придатною твариною для трансгенозу є велика рогата худоба, яка щорічно дає до 10 000 л молока, в якому міститься до 35 г білка на 1 л. Якщо в молоці буде міститися така кількість рекомбінантного білка й ефективність його очищення становитиме 50%, то від 20 трансгенних корів можна буде отримувати приблизно 100 кг такого білка за рік. За випадковим збігом, саме стільки білка С, що використовується для запобігання тромбоутворення, потрібно щорічно. З іншого боку, однієї трансгенної корови буде цілком достатньо для одержання необхідної щорічно кількості фактора ІХ (фактора Кристмаса) каскадного механізму згортання крові, що вводять хворим на гемофілію для підвищення її зсідання.

Для створення трансгенних корів використовують модифіковану схему трансгенозу мишей методом мікроін'єкцій ДНК. Процедура включає такі основні етапи:

- 1) збирання ооцитів корів, забитих на скотобійні;
- 2) дозрівання ооцитів *in vitro*;
- 3) запліднення спермою бугаїв *in vitro*;
- 4) центрифугування яйцеклітин, що запліднені, для концентрування жовтка, який в нормальних яйцеклітинах запобігає баченню чоловічого пронуклеусу за допомогою мікроскопу;
- 5) мікроін'єкція ДНК в чоловічий пронуклеус;
- 6) розвиток ембріона *in vitro*;
- 7) нехірургічна імплантація одного ембріона самки-реципієнту під час тічки;
- 8) скринінг ДНК нащадків на наявність трансгена.

У тестових експериментах із пула в 2470 ооцитів було отримано два трансгенних теляти. Дослідження в цій галузі тривають, і є надія на вдосконалення методики трансгенозу. Один зі способів полягає в тому, що відбирають незначну кількість клітин з ембріона, що розвивається *in vitro*, і тестують їх на наявність трансгена; така втрата клітин ембріоном не перешкодить його нормальному розвитку. Цей тест дозволить імплантувати лише ембріони, що несуть трансген.

**Трансгенні вівці, кози й свині.** Досліди із трансгенозу на вівцях і козах, в основному, спрямовані на перетворення молочних залоз цих

тварин у своєрідні біореактори для одержання білкових продуктів, що використовуються в медицині. Незважаючи на те, що надої овець і кіз менші ніж у корів, за рік вони дають сотні літрів молока. За допомогою методу, аналогічного використаному для створення трансгенних мишей у трансгенних конструкціях, що містять гени людини під контролем промоторів, специфічних для молочних залоз, було створено трансгенну вівцю і козу, в молоко яких секретували білки людини. Вони були глікозилізовані й мали активність, близьку до тих відповідних білків, що одержані від людини. Експресія трансгенів у клітинах молочних залоз овець і кіз не виявляла ніяких побічних дій ні на самок у період лактації, ні на нащадків, що вигодовуються. На відміну від цього, за введення свиням трансгена гормону росту бугаїв під контролем промотору металотіонеїну спостерігалися несприятливі ефекти. Кількість гормону в різних особин у групі трансгенних свиней розрізнялася, однак у цілому вся ця група швидше збільшувала вагу. На жаль, цей позитивний результат частково знецінювався різними паталогіями: у тварин виявляли виразку шлунку, ниркову недостатність, кульгавість, запалення перикарду, зменшення рухливості суглобів, схильність до пневмонії. Причини цих симптомів невідомі. Можливо, вони пов'язані з довгостроковою присутністю в організмі надлишку гормону росту. У цих експериментах трансген синтезувався більш-менш безперервно. Було створено також трансгенну вівцю з підвищеною швидкістю росту вовни. Для цього кДНК овечого інсуліноподібного фактора росту було поміщено під контроль мишачий промотор гена кератину з високим вмістом сірки, що забезпечувало гіперекспресію кДНК. При цьому в трансгенних овець, на відміну від свиней, ніяких небажаних побічних ефектів не спостерігалося.

Позитивні результати отримали й за експериментів із трансгенними свинями. Наприклад, були створені здорові трансгенні свині, у геномі яких присутня така генетична конструкція: регуляторна ділянка гена  $\beta$ -глобіна людини, два гени  $\alpha_1$ -глобіна людини й один ген  $\beta^A$ -глобіна людини. У результаті її експресії в клітинах крові свиней синтезувався людський гемоглобін, при цьому, при заміні людського промотору гена  $\beta$ -глобіна свинячим, людський гемоглобін синтезувався в значно більшій кількості. Людський гемоглобін, що продукується трансгенними свинями, мав такі ж хімічні властивості, як і природний людський. Його можна було

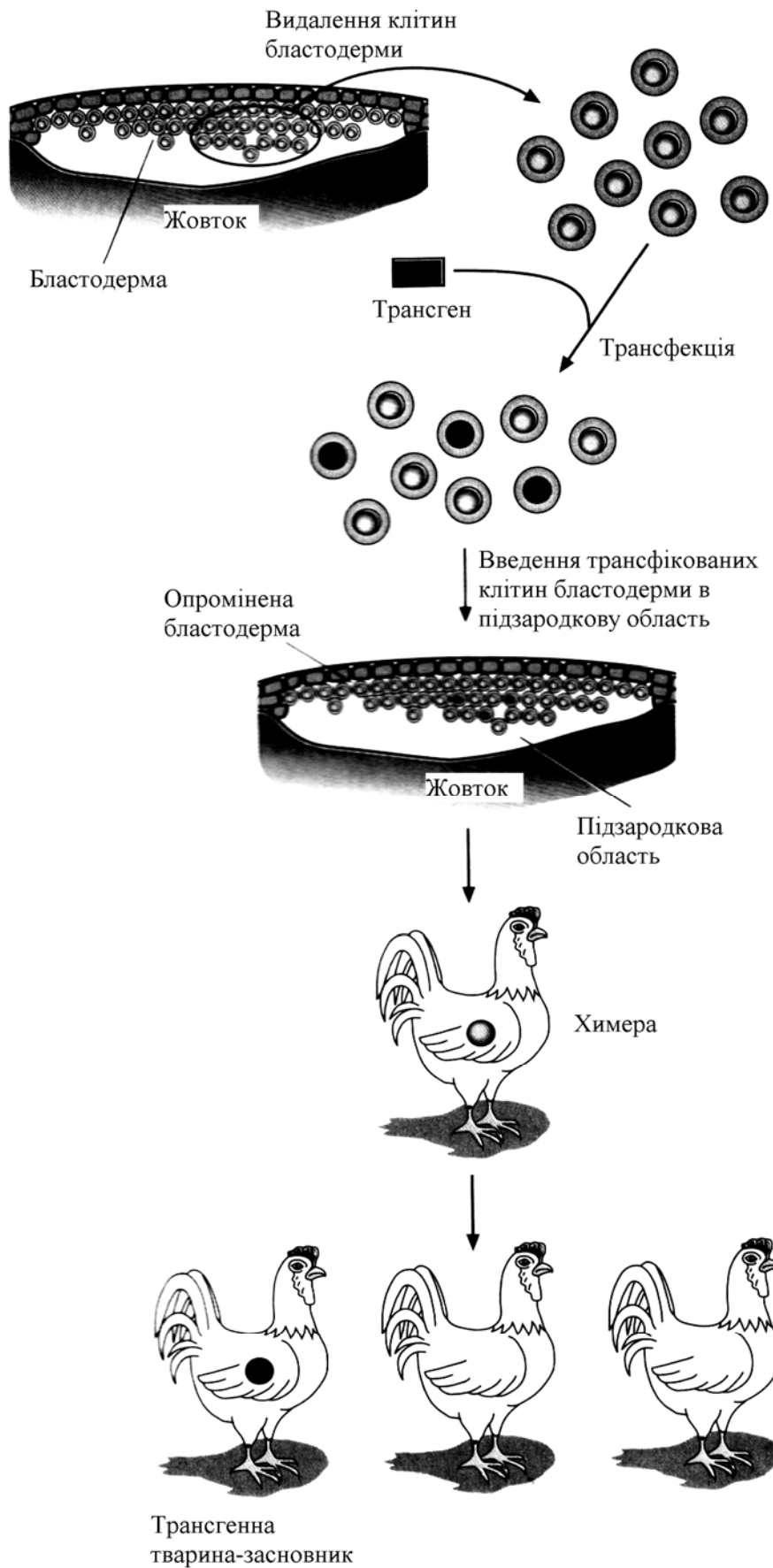


очистити від гемоглобіну свиней звичайною хроматографією.

Ці результати вказують на принципову можливість заміни цільної крові, що використовується за трансфузії, людським гемоглобіном, отриманим методом трансгенезу. Однак, ізольований гемоглобін переносить кисень не так ефективно, як гемоглобін у складі еритроцитів. Більше того, він швидко руйнується в організмі тварини, куди був уведений, а продукти його розпаду токсичні для нирок. Таким чином, одержання замітника людської крові за допомогою трансгенезу – це справа майбутнього.

**Трансгенна птиця.** При створенні трансгенної птиці виникають певні проблеми, що пов'язані з особливостями відтворення і розвитку птиці. Так, за запліднення птиці в яйцеклітину можуть проникнути одразу декілька сперматозоїдів, а не один, як це звичайно буває у ссавців, і визначити певний чоловічий пронуклеус, що з'єднується з жіночим, стає неможливим. Тобто, метод мікроін'єкції для створення трансгенної птиці непридатний. А якщо і вдасться здійснити мікроін'єкцію ДНК в ядро, наступні операції буде важко зробити, оскільки у птиці яйцеклітина після запліднення досить швидко вкривається міцною мембраною, шаром альбуміну і внутрішньою та зовнішньою вапняними оболонками. Використання ретровірусів як вектори неефективне через причини, указані раніше. Ніяких специфічних ES-клітин для птиці також не знайдено (рис. 37).

Більш перспективним є метод з використання рекомбінантних ембріональних клітин. Він полягає у тому, що відокремлюють клітини бластодерми з курячого ембріону, за допомогою катіонних ліпідів, що зв'язані з трансгенною ДНК, проводять трансфекцію, і знову вводять їх до підзародкової зони свіжовідкладених яєць. Частина нащадків буде нести у незначній кількості клітини донору. Таких тварин називають *химерами*. У деяких химер клітини, що створилися з трансформованих клітин, можуть становити лінії зародкових клітин, і після декількох раундів схрещування можна отримати лінії трансгенних тварин. Для збільшення ймовірності створення химер, що мають чужорідні гени в клітинах зародкової лінії, кількість донорських клітин у химерах можна підвищити за рахунок випромінювання ембріонів реципієнту перед введенням у них трансгена (540...660 рад протягом 1 години). Під впливом випромінювання деякі (але не всі) клітини бластодерми гинуть, і співвідношення між трансформованими клітинами і клітинами реципієнта збільшується на користь перших.



**Рис. 37. Створення трансгенної птиці**

Трансгенних курчат можна використовувати для поліпшення генотипу вже існуючих порід – для надання їм (*in vivo*) стійкості до захворювань, кращої ефективності засвоєння кормів, зниження рівня жиру і холестеролу в яйцях, підвищення якості м'яса. Було також запропоновано використовувати яйце, з його високим вмістом білка, в якості джерела білкових продуктів для фармацевтичної промисловості.

**Трансгенні риби.** У міру вичерпання природних рибних запасів усе більшого значення набуватиме розведення риби в штучних умовах. Основна мета досліджень у цій галузі – створення рекомбінантних риб шляхом трансгенозу. До цього часу трансгени вводять мікроін'єкцією ДНК або електропортацією запліднених яйцеклітин різних видів риб – форелі, лосося, коропа та ін. Трансгенну ДНК вводять в цитоплазму запліднених яйцеклітин або клітин ембріонів, що досягли стадії чотирьох бластомерів. Ембріогенез відбувається у риб у водному середовищі поза організмом, тому немає необхідності здійснювати імплантацію. Всі наступні процеси можуть відбуватися в резервуарах з температурою, що регулюється. Після мікроін'єкцій життєздатними залишаються від 35 до 80% ембріонів, а доля трансгенних нащадків коливається від 10 до 70%.

Більшість перших досліджень в цій галузі було спрямовано на визначення впливу трансгена гормону росту на швидкість росту. Як правило, трансгенні лососі були більш крупні і швидше набували вагу ніж контрольні особі. Для експресії було обрано систему з прискореною транскрипцією гена гормону росту в холодній воді, що була придатна для всіх риб, тобто використовувався ген гормону росту риб для запобігання біологічної несумісності. Однорічні трансгенні особі, що були отримані в результаті введення в яйцеклітини генетичної конструкції гормону росту, придатної для всіх риб, важили, приблизно, в 11 разів більше за нетрансгенних. Передбачається, що у наступному гени стійкості до хвороб і стресових впливів, а також гени, що обумовлюють інші біологічні особливості, будуть уведені як риbam помірних зон, так і тропічним риbam.

Нажаль, інтеграція трансгена, як правило, має випадковий характер:

- у деяких випадках чужорідна ДНК стимулює виникнення мутацій;

- не завжди трансгенна тварина характеризується експресією трансгена. Наприклад, експерименти щодо введення гена гормону росту людини сільськогосподарським тваринам дозволили отримати трансгенних кролів і свиней, однак ріст їх не відрізнявся від росту контрольних тварин;
- експресія трансгена в організмі трансгенної тварини окрім позитивного ефекту, що очікується, може викликати і негативну реакцію. Збільшення рівня гормону росту в крові трансгенних овець у деяких випадках приводило до виникнення діабету і загибелі тварин;
- внесення трансгена в ембріон може викликати народження *мозаїків*. Мозаїками вважаються тварини, які мають дві або декілька клітинних ліній, що походять з одної зиготи, але мають різні генотипи. Трансгенні мозаїки, крім клітинних ліній, що містять трансген, мають нетрансгенні лінії. За отриманні від таких тварин нащадків можуть виникнути певні труднощі. Так, якщо клітини гонад не містять трансген, нащадки не можуть успадковувати ін'єктований ген від трансгенних батьків. Дані, які маємо, свідчать, що близько 30% первинних трансгенів, отриманих за рахунок методу мікроін'єкцій, є мозаїками. Частина мозаїків зовсім не здатна створити трансгенну лінію, оскільки в них відсутня спадкова передача трансгена.

### **3.4. Генетична інженерія промислово важливих продуцентів**

Розвиток техніки рекомбінантних ДНК дозволяє проводити виділення генів еукаріот і здійснювати їх експресію у гетерологічних системах. У цей час методи генної інженерії дозволяють конструювати генетичні системи, здатні функціонувати в клітинах прокариот і еукаріот. Ці можливості дозволяють створювати організми, що володіють новими цінними властивостями, наприклад, бактеріальні штами, здатні синтезувати еукаріотичні білки.

Серед білкових продуктів, що викликають великий інтерес, виділяються такі біологічно активні речовини, як гормони. Важливе місце серед них належить білковим і пептидним гормонам. Ці гормони, значна частина яких дуже необхідна в медицині, донедавна

отримували екстракцією із тканин тварин за умови, що гормон не має виражену видову специфічність. Порівняно короткі пептидні гормони намагалися отримувати хімічним синтезом. Але такий шлях одержання виявився нерентабельним уже для молекул, що складаються з декількох десятків ланок. Єдиним джерелом гормонів із у край вираженою видовою специфічністю (гормон росту соматотропін) були органи померлих людей.

Успіхи генетичної інженерії подали надії на можливість клонування генів синтезу ряду гормонів у мікробних клітинах. Ці сподівання значною мірою виправдалися, у першу чергу, на прикладі мікробіологічного синтезу пептидних гормонів. Перші успішні результати експресії хімічно синтезованої послідовності нуклеотидів ДНК, що кодує пептидний гормон, який має 14 ланок, – соматостатин (антагоніст соматотропіну), отримані в 1977 р. у США компанією «Генетек». Для запобігання процесу руйнування гормону в бактеріальних клітинах під впливом пептидази автори застосували підхід, що потім був успішно використаний для одержання інших пептидних гормонів. Був сконструйований гібридний ген, частина якого взята з гена ферменту  $\beta$ -галактозидази кишкової палички, а залишок являв собою фрагмент, що кодує власне соматостатин (фрагмент синтезували хімічно). Уведений у бактеріальні клітини гібридний ген спрямовував синтез білка-химери, що складався більш ніж на 90% з амінокислотної послідовності  $\beta$ -галактозидази. Інша частина являла собою соматостатин. На стику ділянки двох вихідних генів був кодон амінокислоти метіоніну. Це дозволило обробити гібридний білок бромціаном, що розриває пептидний зв'язок, утворений метіоніном; серед продуктів розщеплення був виявлений соматостатин. Даний підхід був використаний для одержання багатьох пептидних гормонів (А- і В-ланцюгів інсуліну, нейропептиду, брадикініну, ангіотензину й ін.).

Генно-інженерними методами за короткий час було створено мікроорганізми – суперпродуценти, що дозволяють одержувати з високими виходами ряд білків вірусів і тварин. Створено штами, у яких до 20% клітинного білка становлять генно-інженерні продукти, наприклад, коров'ячий антиген вірусу гепатиту В, головний капсідний антиген вірусу ящура, ренін теляти, поверхневий антиген вірусу гепатиту В та ін.

### 3.4.1. Одержання рекомбінантного інсуліну

Гормон інсуліну має два поліпептидних ланцюги, А та В, завдовжки 20 і 30 амінокислот, відповідно. Послідовність ланцюгів була встановлена у 1955 р. Сенгером. Синтез обох ланцюгів, що включає 170 хімічних реакцій, у 1963 р. було реалізовано в США, ФРН та Китаї. Але перенести такий складний процес у промисловість виявилось неможливим. Одержували інсулін до 1980 р. за рахунок виділення його з підшлункової залози (підшлункова залоза корови важить 200...250 г., а для одержання 100 г кристалічного інсуліну потрібно до 1 кг вихідної сировини). Тому потреби в ньому задовольняли не повністю. Так, у 1979 р. з 6 млн. зареєстрованих хворих на цукровий діабет, інсулін одержували тільки 4 млн. людей. У 1980 р. датською компанією «Новоіндастрі» розроблено метод перетворення інсуліну свині в інсулін людини ферментативним заміщенням залишку аланіну, що є 30-ю амінокислотою в ланцюгу В, на залишок треоніну. У результаті був отриманий однокомпонентний інсулін людини 99% чистоти.

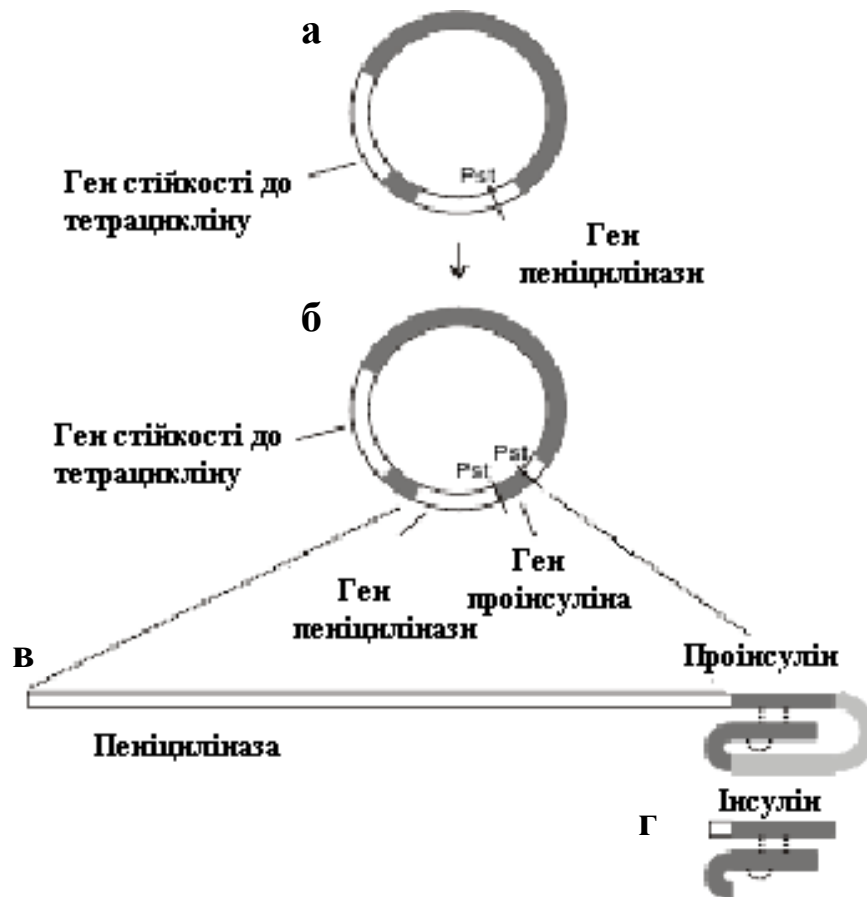
В організмі тварини два поліпептидні ланцюги спочатку є частинами однієї білкової молекули завдовжки 109 амінокислот – це препроінсулін. За синтезу в клітинах підшлункової залози перші 23 амінокислоти є сигналом для проходження молекули крізь мембрану клітини. Ці амінокислоти відщеплюються і утворюється проінсулін завдовжки 86 амінокислот.

У 1980 р. В. Гілберт із колегами виділили мРНК інсуліну з пухлини  $\beta$ -клітин підшлункової залози пацюка (у той час не дозволяли маніпулювати генами людини; рис. 38).

Отриману ДНК-копію мРНК вмонтували в плазмідну *pBR 322*, у середню частину гена пеніцилінази (фермент у нормі виділяється із клітини), яку транспортували в бактерію. Сконструйована плазміда, як виявилось, містила інформацію про структуру проінсуліну, а не препроінсуліну. За трансляції мРНК у клітинах *E. coli* синтезувався гібридний білок, що містить послідовності пеніцилінази й проінсуліну. Гормон із цього білка вищеплювали трипсином. Було доведено, що отриманий таким чином білок впливає на цукровий обмін аналогічно гормону підшлункової залози.

У 1979 р. у США протягом трьох місяців синтезували гени, що кодують А- і В-ланцюги інсуліну; гени зібрали з 18 і 11 олігонуклеотидів, відповідно. Далі гени були вбудовані, як і при

одержанні соматостатину, у плазміді наприкінці гена  $\beta$ -галактозидази кишкової палички. У клітинах *E. coli* здійснювався синтез проінсуліну, а не тільки його окремих ланцюгів. На виділеній матричній мРНК синтезували ДНК-копію. Синтез проінсуліну має певні переваги, тому що процедури екстракції й очищення гормону мінімальні (рис. 39).

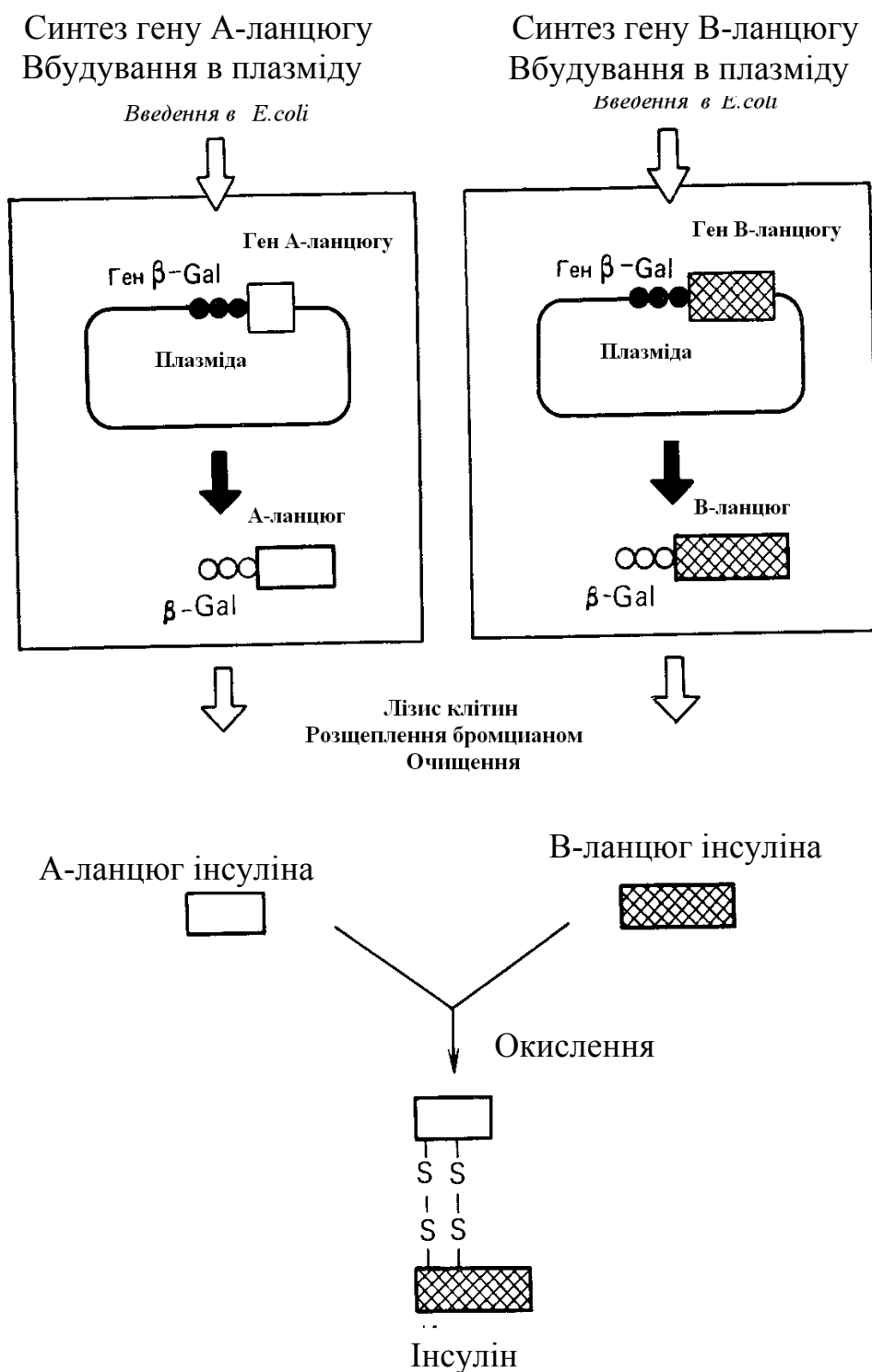


**Рис. 38. Біосинтез інсуліну пацюка у клітинах *E.coli*, що були сконструйовані (за Gilbert e.a., 1980):**

- а) карта плазмиди *pBR322* із двома генами – пеніцилінази і стійкості до тетрацикліну; б) карта, що отримана під час визначення послідовності кДНК рекомбінантної плазмиди у клоні *E.coli*, який продукує інсулін; в) гібридний білок; г) біологічно активний інсулін після видалення пеніцилінази і сегменту проінсуліну

Удосконалювання техніки одержання генно-інженерних штамів-продуцентів за допомогою різних прийомів (ампліфікацією плазмід, інкапсулюванням рекомбінантних ДНК, що вводять, пригніченням протеолітичної активності реципієнтних клітин) дозволило одержати високі виходи гормону, до 200 мг/л культури. Медико-біологічні й

клінічні випробування генно-інженерного білка показали придатність препарату, і у 1982 р. його було допущено до виробництва в багатьох країнах.



**Рис. 39. Отримання інсуліну людини на основі рекомбінантних ДНК (Miller, Baxter, 1980)**



### 3.4.2. Одержання інтерферонів

**Інтерферони** – група білків, здатних продукуватися в ядерних клітинах хребетних. Ці потужні індукційні білки є фактором неспецифічної резистентності, що підтримує гомеостаз організму. Система інтерферонів має регуляторну функцію в організмі, тому що здатна модифікувати різні біохімічні процеси. Інтерферони хребетних, у тому числі людини, розділяють на три групи:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , відповідно, лейкоцитарні, фібробласні й імунні.

Наприкінці 70-х рр. стала очевидною потенційна значимість 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 Хельсінкі (лабораторія – світовий лідер у виробництві інтерферону з лейкоцитів здорових людей) переробляли 50000 л крові. Така кількість препарату приблизно могла забезпечити лікування проти вірусної інфекції 10000 випадків. Перспективи одержання інтерферонів пов'язували з генною інженерією.

У 1980 р. В. Гілберту й А. Вейсману в США вдалося отримати інтерферон у генетично сконструйованій *E. coli*. Вихідні труднощі, з якими вони зіткнулися, – низький рівень мРНК у лейкоцитах, навіть стимульованих ураженням вірусом. За переробки 17 л крові вдалося виділити мРНК і одержати ДНК-копію. Останню вмонтували до плазмиди й клонували в *E. coli*. Було випробувано понад 20000 клонів. Окремі клони були здатні до синтезу інтерферону, але з низьким виходом – 1...2 молекули на клітину. Аналогічні дослідження здійснювали в Японії, Англії, Франції, Росії.

У 1980 р. було встановлено нуклеотидні послідовності  $\alpha$ - і  $\beta$ -інтерферонів: мРНК фібробласного інтерферону складається з 836 нуклеотидів; з них 72 і 203 нуклеотиди припадають на 5'- і 3'-нетрансльовані ділянки, 63 кодують пептид, що відповідає за секрецію інтерферону із клітин, і 498 нуклеотидів кодують 166 амінокислотних залишків – власне інтерферону. Після цього хімічним синтезом було отримано гени  $\alpha$ - і  $\beta$ -інтерферонів, які клонували в *E. coli*. У 1981 р. розшифрували нуклеотидну послідовність імунного інтерферону, що значно відрізнявся від перших двох, але порівнювався за величиною молекули. Істотним моментом був

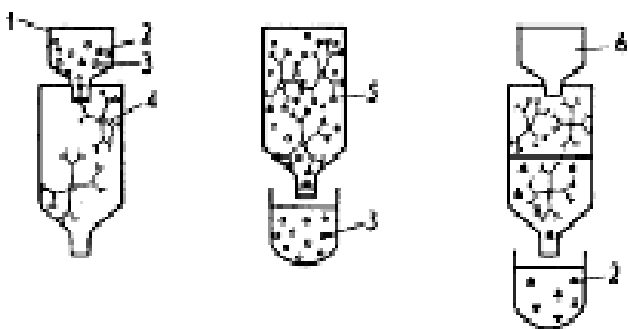
повний синтез гена лейкоцитарного інтерферону людини, здійснений у Великобританії співробітниками фірми «Імперіал кемікал індастрі» і Школи біологічних наук Лестерського університету. За півтора року була синтезована повна послідовність ДНК-копії інтерферону, здатна кодувати  $\alpha_1$ -інтерферон. Синтез олігонуклеотидів здійснили новим методом, що дуже прискорив синтез гена. Спочатку до поліакриламідної смоли був приєднаний нуклеотид, далі здійснювали приєднання пар нуклеотидів, використовуючи агент, що конденсує у безводному піридині. Кожний цикл тривав півтори години, тому протягом року можна було синтезувати послідовність завдовжки в 5000 нуклеотидів. Було синтезовано 67 олігонуклеотидів, які за допомогою лігази з'єднали у дволанцюгову ДНК, що складається з 514 пар нуклеотидів. Отриманий ген вбудовували в клітини двох бактерій: *E. coli* та *Methylophilus methylotrophus*, в яких відбувалась експресія.

Зусилля, спрямовані на одержання генно-інженерних інтерферонів, порівняно з методом культури клітин, дозволили знизити витрати більш ніж у 100 разів. Було отримано різні типи інтерферонів на основі генно-інженерних клітин бактерій і дріжджів. Це дало змогу розгорнути медико-біологічні й клінічні випробування препаратів. Одержувані протягом 1980–1981 рр. препарати інтерферонів було очищено на 80% і вони мали питому активність більше 107 міжнародних одиниць на 1 мг білка. Розширення клінічних випробувань інтерферонів, розпочатих у цей період, залежало від підвищення ступеня їх очищення. Прогрес у цьому напрямку був досягнутий застосуванням моноклональних антитіл, які можна використовувати для афінної хроматографії (при цьому необхідні білки затримуються у колонці з антитілами).

Технологічна схема одержання генно-інженерних інтерферонів (як одна з можливих) принципово зводиться до такого:

- 1) індукція синтезу й виділення інтерференової мРНК із клітин;
- 2) одержання кДНК, комплементарної інтерференової мРНК із лейкоцитів;
- 3) вбудовування кДНК у плазмиду;
- 4) уведення реконструйованої плазмиди в клітини *E. coli*;
- 5) розмноження бактерій, що містять реконструйовану плазмиду, у культуральному середовищі;
- 6) сепарування клітин *E. coli*;
- 7) дезінтеграція й екстракція клітин *E. coli*;

- 8) осадження (наприклад, поліетиленаміном) з наступним центрифугуванням;
- 9) висолювання інтерферону із супернатанта сульфатом амонію;
- 10) діаліз осаду інтерферону;
- 11) розчинення інтерферону, пропущення розчину через колонку з імуносорбентом (пришитими моноклональними антитілами, рис. 40);
- 12) елюїрування інтерферону з наступною хроматографією на целюлозному катіонообміннику.



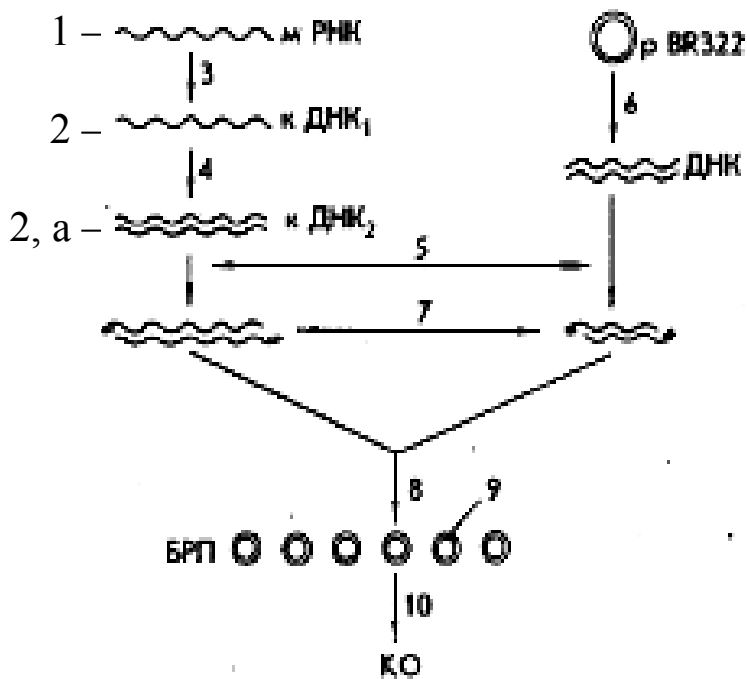
**Рис. 40. Схема очищення рекомбінантних інтерферонів за допомогою моноклональних антитіл:**

- 1 – діаліз із інтерфероном та іншими бактеріальними білками;
- 2 – інтерферон;
- 3 – баластні білки;
- 4 – моноклональні антитіла (МкАТ);
- 5 – інтерферон, що зв'язався з МкАТ;
- 6 – слабка кислота

Із зазначених 12 стадій тільки 8 останніх фактично реалізуються на виробництві, в той час як перші 4 стадії виконуються в лабораторних умовах. До речі сказати, ці 4 стадії найбільш важкі й складні (рис. 41).

Бактерії з генами інтерферону людини продукують специфічний білок у кількості 200...250 мкг/л бактеріальної суспензії. Крім *E. coli* вдається одержувати людський інтерферон за допомогою *Bac. subtilis*, здатну секретувати синтезовані білки до навколишнього середовища (в *E. coli* вони накопичуються в периплазматичному просторі), а також за допомогою *Saccharomyces cerevisiae*, що ростуть на середовищах з більш дешевими субстратами. На них не діють фаги, вони крупніші за бактерій і легше сепаруються, у їхніх клітинах здійснюється процесінг преінтерферонів. Застосовують, також, культури бактерій з родин *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. Усі названі мікроорганізми конститутивно (не адаптивно) утворюють інтерферони, що не відрізняються від природних. Проти всіх класів інтерферонів отримані моноклональні антитіла, за допомогою яких проводять швидке й високоякісне очищення продуктів, застосовуючи

імуноафину хроматографію.



**Рис. 41. Етапи клонування гена інтерферону:**

- 1 – мРНК інтерферону з індукованих клітин;
- 2 – кДНК<sub>1</sub> комплементарна одноланцюгова ДНК;
- 2, а – кДНК<sub>2</sub> комплементарна дволанцюгова ДНК;
- 3 – зворотна транскриптаза;
- 4 – синтез дволанцюгової ДНК;
- 5 – кінцева трансфераза;
- 6 – рестрикція;
- 7 – кДНК з липкими кінцями;
- 8 – відпалювання;
- 9 – ДНК інтерферону;
- 10 – введення в клітини *E. coli* рекомбінантної плазмиди;
- КО – клонування і відбір колоній;
- БРП – «бібліотека» рекомбінантних плазмід

Інтерферони володіють двома типами біологічної активності – противірусної й протиклітинної. Відносно вірусів дія трьох інтерферонів майже однакова за ефективністю, але відносно клітин більш активний  $\gamma$ -інтерферон, причому, проти пухлинних клітин він активніший, ніж проти нормальних клітин. На практиці інтерферони застосовують за вірусних інфекцій, ревматоїдного артрити ( $\gamma$ -інтерферон), імунопатології та в онкології.

Інтерферони  $\alpha$  (ІФа) кодуються родиною генів, що складається, приблизно, з 20 ніалельних генів. Підтипи ІФа виявляють різну специфічність і мають свої особливості. Поєднати ці особливості в одній молекулі ІФа можливо за рахунок створення комбінованого гібридного гена (рис. 42).

Порівняння послідовностей кДНК ІФа<sub>2</sub> і ІФа<sub>3</sub> показало, що вони містять однакові сайти рестрикції *RE1*, *RE2*, *RE3* в позиціях 60, 92 і 150 п.н. Після розщеплення і наступного лігірування фрагментів було отримано декілька гібридних генів. Виявилось, що в ряді випадків властивості гібридів різко відрізняються від початкових індивідуальних ІФ.

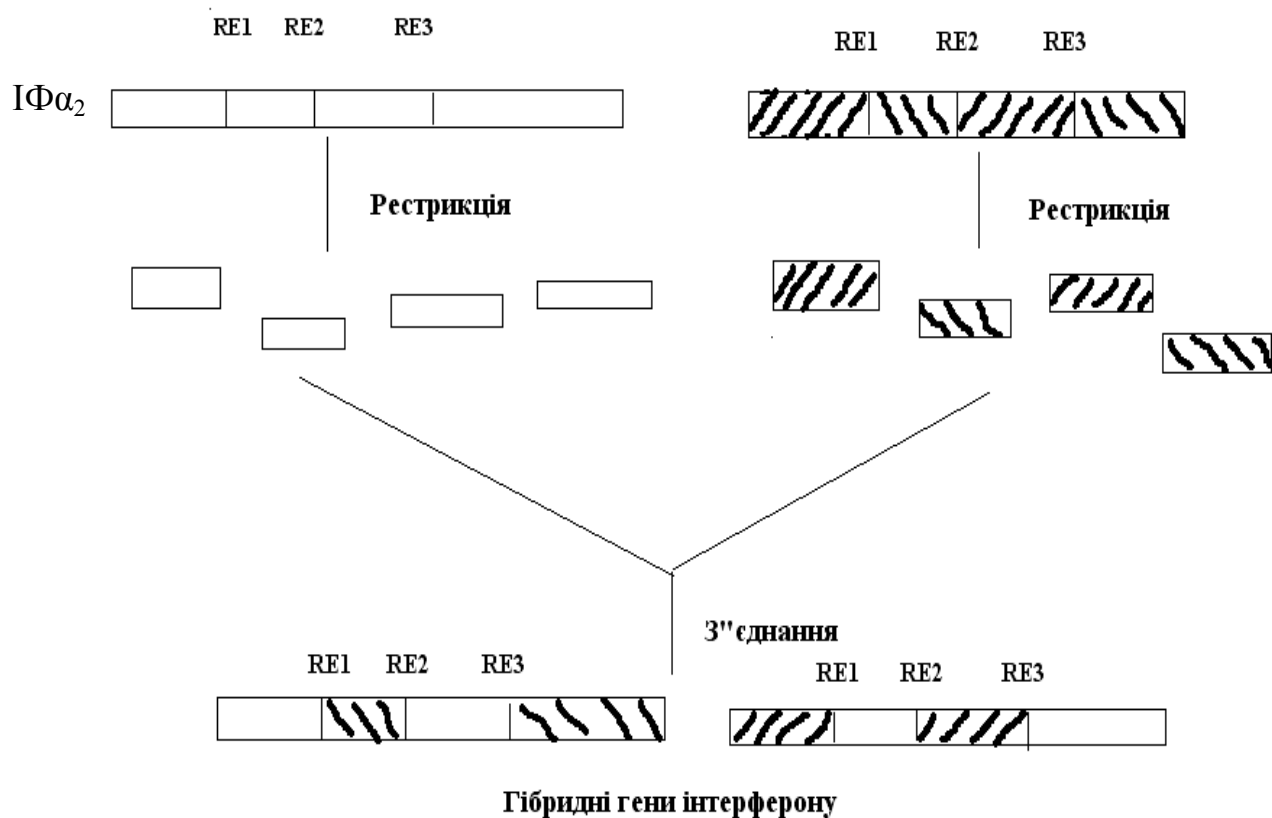


Рис. 42. Одержання гібридних генів інтерферону людини

### 3.4.3. Біосинтез соматотропіну

Соматотропін (гіпофізарний гормон росту) вперше був виділений у 1963 р. із трупного матеріалу. Вихід гормону із одного гіпофіза становив близько 4...6 мг у перерахунку на готовий фармацевтичний препарат. Для лікування карликовості необхідна доза – 6 мг на тиждень протягом року. Крім недостатньої кількості, отримуваний екстракцією препарат був гетерогенним, проти нього вироблялися антитіла, які зводили нанівець дію гормону. Більше того, існувала небезпека, що при отриманні препарату могло статися зараження організму вірусами, що повільно розвиваються. Тому діти, які одержували даний препарат, потребували багаторічного медичного спостереження.

Генно-інженерний препарат має безперечні переваги: доступний у великих кількостях, гомогенний, не містить вірусів. Синтез соматотропіна, що складається з 191 амінокислотного залишку, був здійснений в США Г.В. Гедделем із співробітниками у 1979 р. (компанія «Генентек»). За хіміко-ферментного синтезу ДНК

створюється ген, що кодує попередник соматотропіну, тому було вибрано спеціальний шлях клонування. На першому етапі клонували дволанцюгову ДНК-копію мРНК і розщеплюванням рестриктазами отримували послідовність, що кодує всю амінокислотну послідовність гормону, окрім перших 23 амінокислот. Далі клонували синтетичний полінуклеотид, відповідний цим 23 амінокислотам із стартовим кодоном AUG на початку. Два отримані фрагменти з'єднували і приладнували до пари *lac*-промоторів і ділянки скріплення рибосом. Зконструйований ген трансплантували в *E. coli*. Синтезований у бактеріях гормон володів необхідною молекулярною масою, не був пов'язаний з якимось білком; його вихід становив близько 100000 молекул на клітину. Гормон, проте, містив на N-кінці поліпептидного ланцюга додатковий залишок метіоніну; при видаленні останнього, вихід гормону був низьким.

У 1980 р. було доведено, що генно-інженерний соматотропін володіє біологічною активністю нативного гормону. Клінічні дослідження препарату також пройшли успішно. У 1982 р. гормон було отримано на основі сконструйованої кишкової палички в Інституті Пастера в Парижі. Вартість гормону до 1990 р. знизилася до 5 дол./од.

У 40-х роках ХХ століття було встановлено стимулюючий ефект екстракту гіпофіза на ріст тварин і величину надоїв у корів. Визначено, що цей вплив чинить соматотропін – гормон росту (ГР). ГР є складним поліфункціональним білком, що бере участь у процесах стимуляції росту (соматогенна активність), посиленні діяльності молочних залоз (лактогенна активність), впливає на обмін вуглеводів та ліпідів. Це означає, що ГР в різних типах клітин здатний зв'язуватися як з рецепторами, які відповідають за збільшення синтезу білка, розвиток м'язів і скелету та ін., так і з пролактиновими рецепторами. Використання одного з активних центрів гормону (центру росту, центру діяльності молочних залоз, центру інсуліноподібної дії та центру антиінсулінової дії) дасть можливість вибірково впливати на функціонування організму. Це, тим більш важливо, що проведені дослідження виявляють інколи за використання ГР одночасне збільшення росту тварини і виникнення в неї діабету. Вирішити цю проблему можна двома шляхами. Оскільки ген ГР має складну структуру і містить інтрони, то процедура клонування починається з отримання кДНК на підставі мРНК за допомогою ревертази. Створюються гомогенні фрагменти ДНК

завдовжки 531 п.н., до яких потім ферментативним шляхом приєднують регуляторні елементи для забезпечення експресії цього рекомбінантного гена у клітині – реципієнті. На етапі створення кДНК можливо за допомогою рестриктаз відокремити певні центри активності і в подальшому використовувати міні-гени ГР із спрямованою дією. Другий шлях полягає в тому, щоб зменшити зв'язування гормону з рецепторами тих клітин, стимуляція яких не бажана. Для цього в отриманих фрагментах кДНК здійснюють *сайт-специфічний мутагенез* (мутацію на певних ділянках ДНК), внаслідок якого відбувається заміна одних амінокислот на інші, завдяки цьому високоспецифічні рецептори певних клітин не розпізнають гормону, зв'язування не відбувається і модифікований гормон росту зв'язується лише зі «своїм» рецептором.

Оскільки ГР є видоспецифічним, крім ГР людини було отримано за допомогою генної інженерії препарати ГР для великої рогатої худоби, свиней, кролів та ін. Ін'єкції бактеріального препарату коровам збільшують надій приблизно на 10...50% залежно від умов годівлі і утримання. Причому підвищення надою спостерігається як у низькопродуктивних, так і високоудійних корів. Позитивні результати одержано також за використання ГР бактеріального походження в м'ясному тваринництві. Добові прирости залежно від виду тварин, умов утримання та дози гормону змінювалися в межах 20...30%, що сприяло скороченню часу нагулу молодняку.

Відомо, що в організмі тварини синтез ГР регулюється за допомогою релізінг-факторів гіпоталамусу, які, у свою чергу, поділяються на ліберини і статини. Соматоліберин (СЛ) посилює синтез ГР, а соматостатин (СС) – пригнічує синтез ГР. СЛ – це білки, що складаються з 44 амінокислот, вони також є видоспецифічними. Гени ряду СЛ були клоновані і використовувалися для ін'єкцій тваринам. Внутрішньовенне введення СЛ викликає швидку стимуляцію секреції ГР у кровопотік і виявляє такий самий вплив, як і введення препаратів ГР.

Інший шлях збільшення синтезу ГР полягає в пригніченні створення релізінг-фактора СС. Найбільш просто і ефективно можна забезпечити зниження концентрації СС в крові за допомогою антитіл, проводячи для цього пасивну або активну імунізацію. В першому разі імунізують модельних тварин, від яких можна одержати значну кількість антисироватки. АнтиСС антитіла після внутрішньовенного введення тваринам, викликають швидке зниження концентрації СС у

крові. В іншому разі, імунізують безпосередньо ту тварину, в крові якої бажано знизити концентрацію СС. Використання антиСС антитіл у дослідах з ягнятами спричинило на 13-му тижні збільшення маси в імунізованих ягнят на 76% порівняно з контролем. У телят підвищення ефективності приростів під впливом антиСС антитіл у середньому було 27% за скорочення часу відгодівлі на 20%.

Аналізи якості м'ясних продуктів від тварин з прискореним ростом, що обумовлено антиСС антитілами, показали збільшення м'язової маси та зниження вмісту жиру.

Поряд з гормонами за допомогою генної інженерії можна створювати й інші препарати для тваринництва, наприклад, такі, як інгібітори протеаз та  $\beta$ -антагоністи. Інгібітори протеаз зменшують швидкість розпаду білків і сприяють накопиченню м'язової маси,  $\beta$ -антагоністи змінюють метаболізм жирів і здатні зменшувати відкладення жиру та підсилювати утворення м'язової тканини.

### **3.5. Вакцинація, лікарські засоби в тваринництві**

Понад два століття тому, 14 травня 1796 р., відбулася знаменна для медицини і всієї біологічної науки подія: англійський медик Е. Дженнер в присутності лікарської комісії ввів восьмирічному хлопчику в надрізи шкіри на руці рідину, отриману з пухирців, що були на руках жінки, яка була уражена віспою корів за доїння хворої корови. Через декілька днів на місці надрізів утворилися ранки, у хлопчика піднялася температура, його ознобило. Згодом ранки підсохли, вкрилися сухими шкірочками, які відпали, і залишилися невеликі рубці на шкірі. Дитина повністю одужала.

Через місяць Е. Дженнер знову заразив цього хлопчика таким самим способом, але вже гноєм з нашкірних пухирців хворого натуральною віспою. Однак хлопчик не захворів. Таким чином було доведено, що людина, яка перенесла схожу хворобу – віспу корів легкої форми, після одужання набуває надійного захисту від такої небезпечної інфекції, як натуральна віспа. Виниклий стан несприйняття до інфекційного захворювання дістав назву імунітет.

Незважаючи на те, що природа збудників віспи корів і натуральної віспи не була відома в той час, метод щеплень проти віспи, запропонований Е. Дженнером і названий вакцинацією (від лат. *vaccina* – корова), швидко почав розповсюджуватися. Так, у 1800 р.



в Лондоні було вакциновано 16 тис. чоловік, а у 1801 р. – 60 тис. Поступово такий метод захисту від віспи здобув загальне визнання і став використовуватися в багатьох країнах.

Однак наука, що вивчає механізми формування імунітету, – імунологія – виникла лише наприкінці ХІХ ст. після відкриття ряду бактерій, що викликають інфекційні хвороби у людей і тварин. Для зародження і розвитку імунології велике значення мали роботи видатного французького мікробіолога Л. Пастера, який першим довів, що мікроб «убиваючий» може перетворитися на мікроб «захищаючий» від інфекції, якщо послабити його патогенні властивості.

Як визнання досягнень Е. Дженнера в розробці методу імунізації проти віспи, свій метод захисту від сказу Л. Пастер також назвав вакцинацією. З того часу всі способи профілактичного щеплення проти інфекційних захворювань називають вакцинацією, а препарати, що при цьому використовують, – вакцинами.

У 1890 р. Е. Беринг із співробітниками дійшли висновку, що після імунізації дифтерійним або правцевим токсином у крові тварин з'являється якийсь фактор, що нейтралізує або руйнує відповідний токсин і тим самим запобігає захворюванню. Речовина, що викликає знезараження токсину, дістала назву антитоксин, а пізніше було введено більш загальний термін – *антитіло*. Те, що викликає утворення цих антитіл, почали називати **антигеном**.

Антигени – це речовини, що несуть ознаки генетично чужорідної інформації. Антигенність придатна насамперед білкам, а також деяким складним поліцукрам, ліпополіцукрам, а інколи препаратам нуклеїнових кислот. Антитіла – це особливі захисні білки організму, так звані імуноглобуліни. Антитіла здатні зв'язуватися з антигеном, що викликає їх утворення, і інактивувати його. Агрегати антиген-антитіло в організмі, зазвичай, видаляються спеціальними «клітинами-сміттярами» – фагоцитами, відкритими видатним російським ученим І.І. Мечниковим (1901 р.), або руйнуються системою компліменту.

У той час як більшість бактеріальних інфекцій вдається лікувати за допомогою антибіотиків, задовільних методів лікування вірусних захворювань майже не існує. Найпростішим і надійним методом боротьби із вірусними інфекціями є імунопрофілактика – вакцинація.

Віруси дуже дрібні мікроорганізми. Вони настільки дрібні та просто побудовані, що можуть розмножуватися лише

використовуючи чисельні макромолекули клітини, необхідні для біосинтезу білків і нуклеїнових кислот. Тому віруси здійснюють свою життєдіяльність виключно всередині живих клітин. Це можуть бути окремі клітини, наприклад, бактерії, або цілі організми. Вірусні часточки (*віріони*) різноманітні за морфологією, але всі вони обов'язково містять нуклеїнову кислоту, що вкрита чохлам із значної кількості білкових молекул. Часточки деяких видів вірусів покриті додатковими оболонками, що містять не лише білки, а й ліпіди. Поверхневі білки вірусів зазвичай володіють вираженими імуногенними властивостями, тобто викликають формування імунної відповіді у зараженому організмі.

Під час проникнення вірусу в організм і розвитку інфекційного захворювання в імунній системі індукуються процеси, що спрямовані на інактивацію вільного вірусу і знищення заражених клітин, здатних виділяти інфекційний агент. Вільний вірус інактивується насамперед внаслідок взаємодії з антитілами, що специфічно зв'язуються з поверхневими антигенами вірусних часточок. За утворення антитіл відповідають В-клітини імунної системи (В-лімфоцити). Слід зазначити, що у відповідь на кожен антиген активується розмноження строго специфічних В-лімфоцитів, що синтезують антитіла, які здійснюють зв'язування цього антигена і видалення його з організму. Такий *імунітет* називають *гуморальним*. Найважливішим механізмом знищення заражених вірусом клітин, на поверхню яких потрапили деякі антигени вірусу, є активація розмноження специфічних Т-лімфоцитів, що лізують ці клітини. Даний тип відповіді імунної системи називають *клітинним імунітетом*. Внаслідок минулої інфекції в організмі тварини, що перехворіла, зберігається незначна кількість сенсibilізованих В- і Т-лімфоцитів, які за повторної інфекції таким самим вірусом можуть швидко розмножуватися і забезпечувати стійкість організму до даного патогену. Такий стан організму називають імунною пам'яттю.

Початкова стійкість до повторної інфекції обумовлена, головним чином, впливом специфічних антитіл на вільний вірус. З моменту початку розвитку інфекції (зараження клітин і розмноження в них вірусу) важливу роль відіграють імунні механізми, що спрямовані на лізис заражених клітин і обмеження за рахунок цього розмноження вірусу. Закінченню інфекційного процесу також сприяють антитіла, що впливають на вільний вірус.

Імунний організм або абсолютно стійкий до інфікуючого

мікроорганізму, або переносить захворювання в легкій формі. Тому медицина і ветеринарія приділяють значну увагу розробці методів ефективною і безпечною імунізації людини і тварин. Існують різні типи вакцин, кожен з яких має певні переваги та недоліки.

### 3.5.1. Вакцини, які отримані біотехнологічними методами

Як правило, сучасні вакцини створюють на основі вбитих (інактивованих) патогенних мікроорганізмів або живих, але невірулентних (*атенуйованих*) штамів. Для цього штам дикого типу вирощують у культурі, очищують, а далі інактивують або модифікують таким чином, щоб він викликав імунну відповідь, досить ефективну до вірулентного штаму. Незважаючи на значні успіхи у створенні вакцин проти таких захворювань як краснуха, дифтерія, коклюш, правець, віспа й поліомієліт, виробництво сучасних вакцин стикається з рядом обмежень:

- не всі патогенні мікроорганізми вдається культивувати, тому для багатьох захворювань вакцини не створені;
- для одержання вірусів тварин і людей необхідна дорога культура тваринних клітин;
- титр вірусів тварин і людей в культурі й швидкість їхнього розмноження часто бувають дуже низькими, що робить виробництво вакцин дорогим;
- необхідно суворо дотримуватися запобіжних заходів, щоб не допустити інфікування персоналу;
- за порушення виробничого процесу в деякі партії вакцини можуть потрапити живі або недостатньо ослаблені вірулентні мікроорганізми, що може спричинити ненавмисне поширення інфекції;
- атенуйовані штами можуть ревертирувати до вихідного штаму, тому необхідно постійно контролювати вірулентність;
- деякі захворювання (наприклад, СНІД) не можна попереджати за допомогою традиційних вакцин;
- більшість сучасних вакцин мають обмежений термін придатності й зберігають активність тільки за зниженої температури, що ускладнює їх використання в країнах, що розвиваються.

Останнім десятиріччям, з розвитком технології рекомбінантних ДНК, з'явилася можливість створення нового покоління вакцин, що

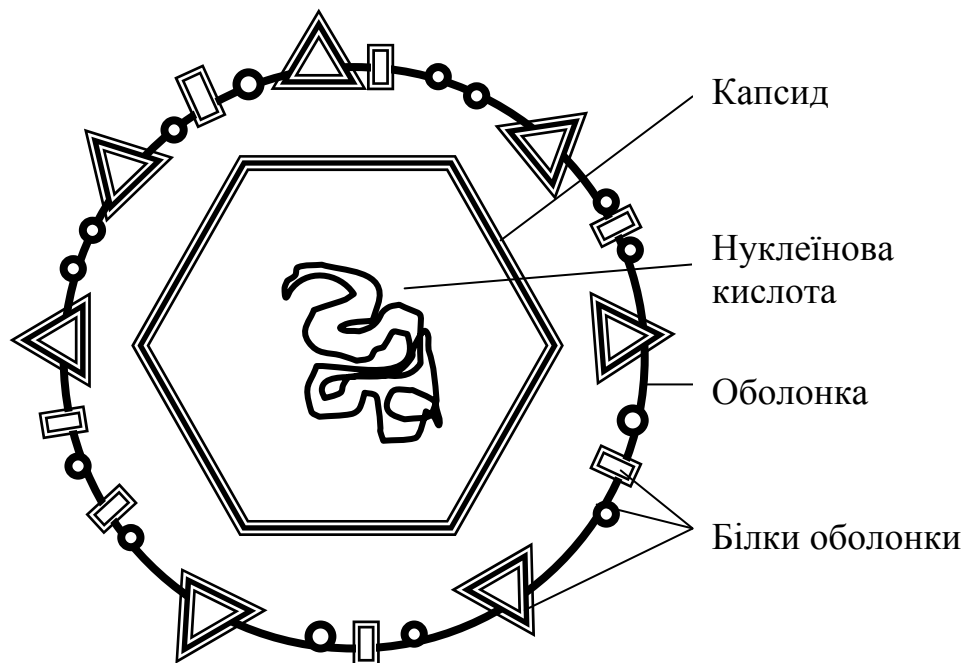
позбавлені недоліків традиційних вакцин. Для їх розробки використовують такі методи генної інженерії:

1. *Модифікація патогенного мікроорганізму* за рахунок *делеції* (вилучення) з генома ділянки гена, що відповідає за вірулентність. Такий вірус можна використовувати як живу вакцину, оскільки вирощування в культурі виключає імовірність спонтанного відновлення цілого гена.
2. *Створення живої непатогенної системи*, що містить окремі антигенні детермінанти неспорідненого патогенного організму. Така система здатна викликати імунну відповідь на патогенний мікроорганізм.
3. *Створення субодиничних вакцин*, які використовують у разі, коли патогенний мікроорганізм не здатний рости в культурі. Тоді ділянки генів цього мікроорганізму, що відповідають за синтез білків антигенних детермінант, вилучають, клонують і здійснюють їх експресію (процес реалізації генетичної інформації) у клітинах-господарях, наприклад, в *E. coli*.
4. *Створення системи специфічного руйнування клітин-мішеней*. Деякі патогенні мікроорганізми діють не безпосередньо на організм, а на окремі його клітини, які після інфікування починають виробляти речовини, що небезпечні для організму. Для таких захворювань можна сконструювати ген, що відповідає за синтез химерного білка, одна частина якого зв'язується з інфікованою клітиною, а друга – руйнує її. Ця система не є дійсною вакциною, хоча вона і діє лише на інфіковані клітини.

**Субодиничні вакцини.** Як правило, вакцини містять непошкоджені патогенні мікроорганізми, але вони повинні бути неживі або атенуйовані. Антитіла, що виробляються у відповідь на їх уведення, зв'язуються з поверхневими білками патогенного організму і запускають імунну відповідь. Однак, що стосується вірусів, було показано, що для здійснення синтезу антитіл в організмі-власника достатньо очищених поверхневих білків вірусу (білків *капсиду* або зовнішньої оболонки; рис. 43). Вакцини, що містять лише окремі компоненти патогенного організму, мають назву «субодиничні» і створюються за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Переваги їх полягають у тому, що такі вакцини стабільні, безпечні, їх хімічні властивості відомі, в них відсутні додаткові білки і нуклеїнові кислоти, які можуть викликати небажані побічні ефекти в

організмі господаря. Недоліками є те, що очищення таких вакцин досить дороге, а будова білка (антигенної детермінанти) буває, що відрізняється від цього білка у складі вірусного капсиду або оболонки, а це може викликати зміну його антигенних властивостей.



**Рис. 43. Будова вірусу тварин.**  
(у деяких вірусах капсид оточений білковою оболонкою)

Для створення будь-якої субодиничної вакцини, насамперед, необхідно ідентифікувати ті компоненти патогенного мікроорганізму, що індукують вироблення антитіл. У випадку вірусу простого герпесу (*HSV, herpes simplex virus*) типу 1 (*HSV-1*) таким компонентом є глікопротеїн *D* оболонки (*gD*). У відповідь на введення цього глікопротеїну мишам у них виробляються антитіла, що нейтралізують інтактний *HSV*. Ген *gD HSV-1* був ізольований, клонований в одному з експресуючих векторів у клітинах ссавців, крім того ген модифікували видаленням частини, що кодує С-кінцевий трансмембранний домен (ділянка гена, що відповідає за певну функцію), який регулює процес зв'язування з мембраною клітини. У подальшому модифікованим геном трансформували яйцеклітини китайського хом'ячка (СНО-клітини), які глікозилірували білковий продукт і секретували його до зовнішнього середовища, оскільки він не міг вбудовуватися в клітинну мембрану. Лабораторні випробування показали, що антитіла, які створювались у відповідь на

введення модифікованого білка *gD*, більш ефективні відносно *HSV-1* і *HSV-2*.

*Вірус ящура (FMDV, foot-and-mouth disease virus)* найвищою мірою вірулентний і викликає масову загибель великої рогатої худоби і свиней. Для захисту від *FMDV*-інфекції використовують вакцину, що містить вірус, інактивований формаліном. У світі щорічно виробляється приблизно 1 млрд. доз цієї вакцини.

Основною антигенною детермінантою, що індукує утворення антитіл, є вірусний капсидний білок 1 (*VP1, viral protein 1*). Це більш слабкий антиген, ніж інтактні вірусні частки, але все-таки він індукує утворення антитіл і забезпечує захист тварин від інфекції. Тому було розпочато спроби клонувати *VP1*-ген.

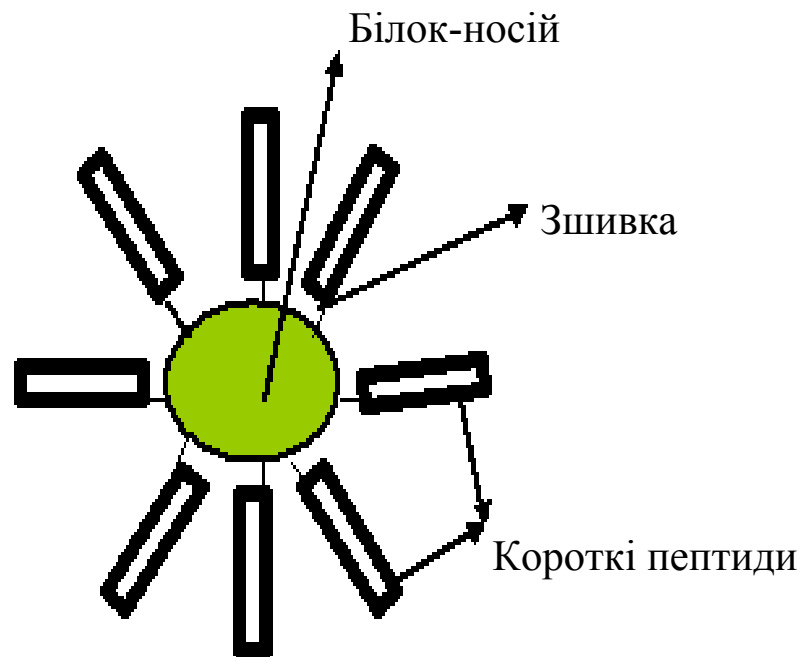
Геном *FMDV* являє собою одноланцюгову РНК. Тому спочатку синтезували повнорозмірну дволанцюгову кДНК завдяки приблизно 8000 п.н. Згодом її розщепили за допомогою рестриктаз і клонували отримані фрагменти в експресуючому *E. coli*-векторі. Продукт, що кодує послідовність *VP1*-гена, ідентифікували імунологічними методами як складову химерного білка, що побудований з частини молекули реплікази бактеріофага *MS2* і повнорозмірного *VP1*-білка *FMDV*, завдяки чому він і індукує вироблення нейтралізуючих *FMDV* антитіл.

Так чином, субодинична вакцина проти ящура незабаром буде готова для проведення доклінічних випробувань.

**Пептидні вакцини.** Чи може невелика ділянка білкової молекули (домен) бути ефективною субодиничною вакциною й індукувати вироблення антитіл? Здається, що ті домени, які доступні для антитіла (тобто ті, що перебувають на поверхні віруса), мають імуногенні властивості, а внутрішні домени несуттєві, якщо вони не впливають на конформацію імуногенного домена. Якщо це припущення вірне, то короткі пептиди, що імітують *епітопи* (антигенні детермінанти), можна використовувати для створення вакцин.

Враховуючи ці припущення, синтезували хімічними методами домени *VP1 FMDV* і перевірили можливість створення на їхній основі пептидних вакцин. Кожний з пептидів, що відповідають амінокислотним залишкам 141...160, 151...160 і 200...213 С-кінцевої ділянки *VP1* і амінокислотним залишкам 9...24, 17...32 і 25...41 М-кінцевої ділянки, скріпити окремо з інертним білком-переносником, щоб запобігти їх руйнуванню, і ввели морським свинкам (рис. 44).

Синтез антитіл у кількості, достатній для захисту тварини від наступних *FMDV*-інфекцій, спостерігався тільки за введення пептиду 141...160. Введення ж цілого *VP1* або пептидів 9...24, 17...32 і 25...41 індукувало синтез антитіл у менших кількостях.



**Рис. 44. Короткі пептиди, що скріплені з білком-носієм, і є основою пептидної вакцини**

Більш довгий пептид, що складається з амінокислотних залишків 141...158 і 200...213, які були з'єднані двома проліновими залишками, індукував ефективний синтез антитіл у морських свинок навіть у тому разі, коли він не був зшитий з білком-носієм. Ця двопептидна молекула виявилася ефективнішою будь-якого ізольованого пептиду й блокувала проліферацію *FMDV* у великої рогатої худоби й морських свинок.

Ці результати є досить багатообіцяючими, однак кількість (доза) пептидного матеріалу, що необхідна для індукції імунної відповіді, майже в 1000 разів вища, ніж у випадку вбитої *FMDV*-вакцини. Щоб вирішити цю проблему, фрагмент ДНК, що кодує пептид з амінокислотних залишків 142...160 *VP1 FMDV*, зшили з геном, що кодує коров'ячий білок гепатиту В (*HBsAg*). За експресії цього химерного гена в *E. coli* або культури тваринних клітин його продукти – білкові молекули – у процесі самозбирання утворювали

стабільні «27-м часточки», на поверхні яких був пептид з *VPI FMDV*. Ці частки володіли високої імуногенністю. Таким чином, *HBcAg* можна використовувати як ефективну молекулу-носії синтетичних пептидів.

І все-таки існує кілька обмежень використання коротких пептидів як вакцини:

- епітоп, що використовується для створення ефективної пептидної вакцини, повинен являти собою коротку, але безперервну ділянку білкової молекули, а це буває не завжди;
- конформація пептиду повинна бути такою ж, як і в епітопі у інтактній вірусній частці;
- ізольований епітоп може не володіти достатньою імуногенністю. У майбутньому синтетичні пептидні вакцини можуть стати високо-специфічними, відносно недорогими, безпечними й ефективними альтернативами традиційним вакцинам, хоча для цього слід провести ще чимало досліджень.

**Генна імунізація.** Новий підхід, що дозволяє індукувати в організмі імунну відповідь без уведення антигена, заснований на включенні до клітин тварини-мішені гена, що кодує білок-антиген. У перших експериментах такого роду *E. coli*-плазмиду, що містить клонований ген білка-антигена, транскрипція якого була під контролем промотора вірусу тварин, що кон'югували з мікрочастинками золота й бомбардували ними клітини вуха миші. Згодом з'ясувалося, що клоновану кДНК можна вводити до клітин і за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції розчину з більшою кількістю плазмиди, що несе відповідну ДНК. Для цього необхідно в  $10^3 \dots 10^4$  разів більше ДНК, ніж за бомбардування мікрочастинками. В одному з експериментів більш ніж у 75% випадків ген включався в клітини миші, і синтезований білок-антиген індукував синтез антитіл. Цей підхід дозволяє уникнути очищення антигена, що потребує багато часу й засобів, або використання для створення вакцини технології рекомбінантних ДНК. Крім того, отримані з його допомогою білки з більшою ймовірністю піддаються коректній посттрансляційній модифікації, ніж білки, що синтезовані організмами-господарями. Цей метод, що дістав назву генна імунізація, можна використовувати для вакцинації свійських тварин.

Перспективи генної імунізації були ретельно вивчені. В одній із серій експериментів мишам у квадрицепси обох задніх кінцівок вводили розчин з *E. coli*-плазмидою, що несе кДНК нуклеопротейну



вірусу грипу А, транскрипція якої була під контролем промотора вірусу саркоми Рауса або цитомегаловірусу. Хоча рівень експресії гена нуклеопротеїну був настільки малий, що не піддавався реєстрації, через два тижні після імунізації в крові мишей виявлялися антитіла до нього. Вживаність імунізованих мишей була значно вищою, ніж у мишей з контрольної групи. Більше того, вони були нечутливі й до іншого штаму вірусу грипу. Такий перехресний захист не виробляється за введення традиційних протигрипових вакцин, отриманих на основі поверхневих антигенів вірусу, і тому кожна вакцина специфічна лише до одного штаму вірусу. Більше того, традиційні вакцини зберігають свою ефективність доти, поки залишаються незмінними поверхневі антигени. На жаль, для генів поверхневих антигенів характерна висока частота мутацій, а це призводить до появи штамів вірусу, що істотно різняться. Білки, такі як нуклеопротеїн, відносно стабільні й активують імунну систему за іншим механізмом, ніж поверхневі антигени.

ДНК-імунізація дозволяє не тільки уникнути очищення білкових антигенів, а й індукувати імунну відповідь, спрямовану саме на білок, що кодується плазмідною, а не на саму плазмиду. Тому той самий вектор можливо використовувати для доставки різних білків або для багаторазового введення того ж гена.

**Атенуйовані вакцини.** У деяких випадках, як живі, вакцини можна використовувати генетично модифіковані (рекомбінантні) мікроорганізми (бактерії або віруси). Такі вакцини містять або непатогенні мікроорганізми, що синтезують антигенні детермінанти певного патогенного агента, або штами патогенних мікроорганізмів, у яких модифіковані чи *делетировані* (вилучені за рахунок делеції) гени вірулентності. У цьому разі основні антигенні детермінанти є складовими компонентами бактеріальних або вірусних часток і мають таку ж конформацію, яку вони набувають у хвороботворному мікроорганізмі. Ізольований антиген часто втрачає вихідну конформацію й викликає лише слабку імунну відповідь.

Інший спосіб одержання непатогенних штамів, придатних для створення на їхній основі живих вакцин, полягає у видаленні з генома патогенних бактерій хромосомних часток, відповідальних за незалежні життєво важливі функції. При цьому краще делетувати принаймні дві такі частки, оскільки імовірність їхнього одночасного відновлення дуже мала. Передбачається, що штам з подвійною делецією буде мати обмежену здатність до проліферації й знижену

патогенність, але забезпечить вироблення імунної відповіді.

Різні штами *Salmonella* викликають гострі кишкові інфекції, постнатальну інфекцію, черевний тиф, харчову токсикоінфекцію. Для профілактики всіх цих захворювань необхідно мати ефективну вакцину. Щоб отримати атенуйовані штами *Salmonella*, вносили делеції в гени *ara*, що кодують ферменти біосинтезу ароматичних сполук, і в гени *pur*, що кодують ферменти метаболізму пуринів. Такі штами з подвійною делецією викликають легку форму інфекції і мають в  $10^6$  разів меншу вірулентність. На їхній основі вже створено ефективні пероральні вакцини для мишей, овець, великої рогатої худоби, курчат, а нещодавно – і для людини.

**Векторні вакцини.** Ще одним напрямом створення живих вакцин є використання вірусу коров'ячої віспи, або вірусу вісповакцини (ВВВ). Геном вірусу повністю *секвенований* (визначена нуклеотидна послідовність). ДНК ВВВ реплікується у цитоплазмі інфікованих клітин завдяки наявності у вірусі генів ДНК-полімерази, РНК-полімерази і ферментів, що забезпечують синтез мРНК. Тому, якщо у геном ВВВ вбудувати чужорідний ген таким чином, щоб він був під контролем ВВВ-промотора, то відбуватиметься його експресія незалежно від регуляторних і ферментних систем господаря. Оскільки геном ВВВ має досить великий розмір, в одну ДНК можна вбудовувати декілька чужорідних генів, однак кожен під контролем окремого ВВВ-промотора, для запобігання рекомбінації між різними ділянками вірусної ДНК. ВВВ використовується для створення так званих *векторних вакцин*, за допомогою яких відбувається доставка і експресія в організмі-господаря генів, що відповідають за вироблення антигенних білків і, як наслідок, синтез захисних антитіл організмом тварини. Перевагами ВВВ є те, що він: 1) має широкий спектр господаря; 2) зберігає життєздатність протягом багатьох років; 3) не володіє онкогенною дією; 4) здатний реплікуватися в клітині-господарі і збільшувати кількість антигена, який активує утворення антитіл і стимулює імунну відповідь організму; 5) здатний вмещувати декілька генів антигенних білків і при цьому його власна вірулентність зменшується ще більше.

Недоліком живої вакцини є те, що за вакцинації особин із зниженим імунітетом, у них може розвинути важка вірусна інфекція. Для вирішення цієї проблеми користуються двома способами:

- уводять у геном ВВВ ген, що кодує речовину інтерлейкін-2 людини, яка стимулює клітинний імунітет і обмежує

- проліферацію* (ріст і розвиток) вірусу;
- інактивують вірус після вакцинації за рахунок створення ВВВ чутливого до інтерферону. За виникнення небажаних побічних ефектів після вакцинації в організм тварини вводять інтерферон, що одразу пригнічує проліферацію вірусу.

### ***Контрольні запитання***

1. Що розуміють під терміном трансгеноз?
2. Якими методами можна здійснити введення чужорідної ДНК в геном тварини?
3. Які проблеми запобігають розповсюдженню введенню чужорідного гена за допомогою ретровірусних векторів?
4. У чому полягає особливість генного таргетингу?
5. Які основні напрями створення трансгенних тварин є в наш час?
6. Які проблеми можуть виникнути за інтеграції трансгена в геном тварини?
7. Укажіть обмеження, з якими стикаються виробники сучасних вакцин.
8. У чому полягає особливість методу генної імунізації?
9. Які проблеми можуть виникнути за використання соматотропіну? Які існують шляхи для вирішення цих проблем?
10. Яким чином можна запобігти виникненню проблем при застосуванні живих вакцин?

## РОЗДІЛ 4

### КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

Клітинна інженерія – конструювання спеціальними методами клітин нового типу. Клітинна інженерія включає реконструкцію життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин, об'єднання цілих клітин, що належали різним видам (і навіть до різних царств – рослинам і тваринам), з утворенням клітини, що несе генетичний матеріал обох клітин, та інші операції. Клітинна інженерія використовується для вирішення теоретичних проблем у біотехнології, створення нових форм рослин і тварин, що володіють корисними ознаками.

Новий етап біотехнології, що інтенсивно розвивається в цей час, обумовив появу зовсім нових нетрадиційних об'єктів – тканин і клітин вищих багатоклітинних організмів, тварин і рослин, що культивуються, а також мікроорганізмів, створюваних методами генетичної інженерії. На відміну від мікроорганізмів культури клітин вищих організмів є порівняно новими об'єктами, використання яких дозволяє налагодити виробництво цінних біологічно активних речовин, вакцин і моноклональних антитіл.

В останні роки дуже широко застосовують метод злиття протопластів. Цей метод, очевидно, є універсальним способом введення генетичної інформації до клітин різного походження. Простота методу робить його доступним для селекції промислово важливих продуцентів. Метод відкриває нові можливості для одержання міжвидових і міжродинних гібридів та схрещування фенотипічно віддалених форм живого. Отримано позитивні результати злиття бактеріальних, дріжджових і рослинних клітин та міжвидові й міжродинні гібриди дріжджів. Є дані про злиття клітин різних видів бактерій і грибів. Вдалося одержати гібридні клітини за результатом злиття клітин організмів, що належать до різних царств: тваринного й рослинного. Ядерні клітини жаби були злиті із протопластами моркви; гібридна рослинно-тваринна клітина росла на середовищах для рослинних клітин, однак досить швидко втрачала ядро й покривалася клітинною стінкою.

Досить успішно за останні роки проводяться роботи зі створення

асоціацій клітин різних організмів, тобто, одержують змішані культури клітин двох або більше організмів з метою створення штучних симбіозів.

Найбільш перспективним напрямком клітинної інженерії є гібридомна технологія. Гібридні клітини (гібридоми) утворюються за результатом злиття клітин з різними генетичними програмами, наприклад, нормальних диференційованих і трансформованих клітин. Блискучим прикладом досягнення даної технології є гібридоми, отримані за результатом злиття нормальних лімфоцитів і мієломних клітин. Ці гібридні клітини мають здатність до синтезу специфічних антитіл, а також до необмеженого росту в процесі культивування.

Перспективним є клональне розмноження тваринних клітин для генетичних маніпуляцій. Великі перспективи має техніка клітинних культур тваринних клітин для одержання біологічно активних сполук. Культури пухлинних клітин або нормальні клітини, трансформовані *in vitro*, зберігають у ряді випадків здатність синтезувати специфічні продукти. Незважаючи на багато поки ще не переборених труднощів, показана можливість одержання ряду речовин у культурі тваринних клітин:

<b>Продукт</b>	<b>Клітини або їхнє джерело</b>
Гормон росту	Пухлина гіпофізу
Колаген	Фібробласти
Кортикостероїди	Пухлина наднирників
Гістамін	Пухлина із гладких клітин
Меланін	Меланома райдужної оболонки сітківки
Мукополісахариди	Фібробласти
Фактор росту нервової тканини	Нейробластома

Важливий напрямок клітинної інженерії пов'язаний з ранніми ембріональними стадіями. Так, запліднення яйцеклітин у пробірці дозволяє перебороти безпліддя. За допомогою ін'єкції гормонів можна одержати від однієї тварини десятки яйцеклітин, штучно їх запліднити *in vitro* і імплантувати до матки інших тварин. Ця технологія застосовується у тваринництві для одержання монозиготних близнюків. Розроблено новий метод, заснований на здатності індивідуальних клітин раннього ембріона розвиватися в нормальний плід. Клітини ембріона поділяють на кілька рівних

частин і трансплантують реципієнтам. Це дозволяє розмножувати тварин прискореним шляхом. Маніпуляції на ембріонах використовують для створення ембріонів різних тварин. Підхід дозволяє перебороти міжвидовий бар'єр і створювати химерних тварин. У такий спосіб отримані, наприклад, вівце-цапині химери.

Ідея про можливості культивування клітин поза організмом уперше була висловлена наприкінці минулого століття, але перші культури клітин отримали на початку нашого століття, і ними виявилися, як не дивно, клітини тварин, а не рослин. А культивування рослинних клітин на штучних поживних середовищах довгий час не вдавалося. І лише у 30-і роки були досягнуті перші успіхи в цій галузі, які й забезпечили бурхливий розвиток даного напрямку.

#### 4.1. Культивування клітин. Історія методу

Визнання ідеї про те, що клітини тканин вищих тварин можна виділити з організму і потім створити умови для їх росту та відтворення *in vitro*, датується першим десятиліттям ХХ ст. Після того як стало відомо, що подібні процеси реальні, настав другий етап робіт, початок якому поклала демонстрація можливості вирощування й репродукції в таких клітинах фільтрівних інфекційних агентів-вірусів. Третій етап історії починається відтоді як була показана практична можливість одержання в клітинах тварин значної кількості вірусного матеріалу для застосування у вакцинних препаратах, і триває до часу, коли:

- 1) стало можливим вбудувати в клітини специфічні екзогенно отримані гени, що здатні до експресії;
- 2) було підтверджено можливість вирощування в культурі з поодинокі клітини цілої популяції.

Коли такі популяції отримували із клітини, що виділяла в навколишнє середовище антитіла, всі молекули антитіл у надосадовій рідині були однаковими. Причини й наслідки цих двох феноменів у наш час інтенсивно досліджуються, й вони знаменують собою початок четвертого етапу робіт у даній галузі.

Щоб показати здатність клітин тварин рости і розподілятися в культурі, необхідно було опанувати ряд підходів і методик:

1. Методики одержання клітин, вільних від екзогенних прокаріотів і грибів;

2. Методики розроблення середовищ, у яких ріст «вирізаних із тканини» або ізольованих клітин не гальмується;
3. Методики спостереження за клітинами в динаміці їхнього розвитку;
4. Методики безперервного культивування культур клітин тварин *in vitro* і підтримки їх вільними від інших біологічних агентів.

Науковою основою для розроблення цих методик стає уявлення про клітину як основний структурний елемент живих організмів тваринного й рослинного походження. Ідея про те, що клітини тканин тварин можна виділити з організму і потім створити умови для росту й відтворення їх *in vitro* виникла на базі концепції, що належить Клоду Бернару. Він припустив, що не тільки живі організми здатні зберігати сталість внутрішніх умов поза залежністю від змін у навколишньому середовищі. Клітина поза організмом тварини теж буде прагнути підтримувати свої внутрішні умови. Якщо різниці між внутрішніми й зовнішніми умовами будуть незначними, то існує висока ймовірність росту і подвоєння клітини. Таке розуміння явища приводить до необхідності розробки середовищ, здатних підтримувати й стимулювати ріст клітин поза організмом.

Дещо пізніше, у 1885 році, У. Ру (*W. Roux*) показав можливість збереження поза організмом живих тканин на практиці. Він зберігав у життєздатному стані оболонку курячого ембріона в теплому фізіологічному розчині. Згодом він став автором, який активно публікувався із проблем ембріології *in vitro*. У 1897 р., Леб Ж. (*Loeb J.*) підтримував у життєздатному стані клітини крові й сполучної тканини в пробірках із сироваткою і плазмою крові. І. Льюнгрен (1898) показав можливість підтримки експлантатів шкіри людини у життєздатному стані в кислому середовищі зі збереженням здатності до реімплантації. Додаткові експерименти були проведені Р. Джоллі (1903), який спостерігав подвоєння клітини у висячій краплі, що містила лейкоцити саламандри, а В. Біб і К. Евінг (1906) підтвердили це за пересадження лімфосаркомної тканини собаки.

Продовжуючи роботи У. Ру, Р. Харрисон удосконалив методику «висячої краплі». Він використав невеликі шматочки тканини, що були відірвані від медулярної судини жаби і впроваджені до її лімфатичного тромбу, і витримував їх у вигляді краплі на нижній стороні покривного скла, розташованого поверх поглиблення на предметному склі. У 1907 р. йому вдалося спостерігати за допомогою такої «камери» ріст нервових клітин протягом декількох тижнів; він

установив, що швидкість росту цих клітин становить 20 мкм за 25 хв. У той час як експерименти Харрисона були спрямовані на те, щоб одержати відповіді на питання, що ставляться до фізіології нервових клітин жаби, методика, якою він користувався, була застосована К. Барроузом для інших клітин тканин теплокровних тварин. Цей дослідник у 1910 р. замість лімфатичного тромбу використав тромб плазми курки.

У 1913 р. Алексіс Каррель застосував плазму крові, збагачену екстрактом ембріона. Додаток такого екстракту прискорювала ріст тканин. Використана методика забезпечувала значно більшу ймовірність успіху, ніж та, що використовували С.А. Левіс (1911) і Л.М. Рід (1908). Рід готувала культури клітин з кісткового мозку морської свинки й намагалася вирощувати експлантати на середовищі певного хімічного складу. Робота Карреля привернула велику увагу, тому що вона була опублікована під назвою, що інтригує, – «Культивування «безсмертних» клітин». Інкубація клітин серця ембріона курки була розпочата 17 січня 1912 р. Пересівання клітин продовжив Еблінг, працюючи з ними 34 роки, як він сам заявляв. Оскільки Каррель був хірургом і досить компетентним з питань асептики, він зміг зробити істотний внесок у культивування клітин тварин *in vitro*. У той же час організація і технічні умови проведених експериментів були дуже громіздкими. Асистенти Карреля були одягнені в довгополі гумові халати темного кольору з каптурами для повного прикриття голови. Процедури були тривалими й обтяженими багатьма деталями. У результаті тих вимог, що висувалися автором стосовно складних заходів обережності для запобігання контамінації (від лат. *contaminatio* змішання), навколо даного предмета створилася атмосфера таємничості і винятковості, що гальмувало прогрес, а не сприяло йому. Проте ним було досягнуто багато чого. Зокрема, навіть за відсутності антибіотиків він досяг успіху в пересадженні клітин, використовуючи хірургічну техніку для відторгнення окремих колоній і перенесення їх у нові умови росту. Каррель також продемонстрував своїм колегам наукове значення тих спостережень, що можуть бути зроблені в процесі пересадження клітин.

У ході здійснених робіт було внесено ряд виправлень у рецептуру середовища культивування. Зокрема, М. Тірод модифікував розчин Рінгера й на додаток до курячої сироватки і ембріонального екстракту почав використовувати коагулят фібрину.



Для спостереження за клітинами тварин, що поділяються, Канті у 1928 р. розробив метод кінофотомікрографії. У цей же період було розроблено додатковий і дуже істотний підхід до техніки роботи із клітинами. Мається на увазі застосування трипсину для вивільнення клітин з тканинної матриці, в якій вони знаходяться. Однак, ця методика не дістала визнання доти, поки у 1937 р. Х. Сіммс і Дж. Стідлман використали її для пасирування клітин між культурами плазми. Ця методика дає можливість успішно застосовувати в культурах індивідуальні клітини, а не тканини.

Уперше клони клітин у культурі з одиночної клітини були отримані Ерлом В. зі співробітниками у 1948 році. Ігл Г.М. (1955) систематично досліджував харчові потреби клітин в спеціальних умовах. Вважалося, що стала один раз клітинна лінія має необмежений час життя, поки у 1961 р. Л. Хейфлік та П. Мурхед не виділили лінію диплоїдних клітин людини (НДС) *WI-38*. Щодо лінії *WI-38* було показано, що період її існування в культурі обмежується близько 50 подвоюваннями популяції. Перед відмиранням популяції для клітин цієї лінії характерний феномен старіння. Однак, за відмирання ці клітини залишалися диплоїдними і не мали ознак злоякісних змін. Клітини, виділені з ракових пухлин або трансформовані в ході культивування, характеризуються «безсмертністю» і корелюють із гетероплоїдністю. Перші суспензійні культури клітин тварин, як правило, ґрунтувалися на клітинах злоякісних тканин. Це – клітини *HeLa*, виділені з ракової пухлини шийки матки людини. Лінія карциноми шийки матки, що перевивається, була виділена ще у 1952 році Г.С. Джеєм зі співробітниками, вона використовується й у цей час у багатьох лабораторіях світу.

Наступний етап в історії культивування диплоїдних клітин людини пов'язаний із установленням факту, що вони є генетично стабільними й вільними від усіх відомих латентних і онкогенних вірусів. Тому лінії диплоїдних клітин людини дозволено застосовувати для одержання продуктів, що призначаються для людей. Ця догма залишається діючою і у наш час, хоча новітні відкриття чітко показали присутність у клітинах, виділених з нормальних тканин, потенційних онкогенів, ідентичних тим, ще знайдені в таких відомих онкогенних вірусах, як вірус саркоми Рауса і вірус саркоми Молоні. Раус П. ще у 1910 році індукував пухлину, використавши профільтований екстракт курячої пухлини. Ця

пухлина була індукована РНК-вірусом (вірус саркоми Рауса). Пізніше встановили, що ряд вірусів здатні індукувати виникнення пухлин, такі віруси називаються онкогенними.

## 4.2. Введення клітин у культуру

Для культивування поза організмом живі клітини можуть бути отримані декількома способами. Вони можуть бути виділені із крові, але до росту в культурі здатні лише лейкоцити. Моноядерні клітини можуть бути виділені з м'яких тканин за допомогою таких ферментів як колагеназа, трипсин, проназа, що руйнують позаклітинний матрикс. Крім того, у поживне середовище можна помістити шматочки тканин.

Відповідно до мети і завдань експериментальної роботи можна виділити два напрямки культивування клітин тварини:

- культури клітин;
- культури органів і тканин (органні культури).

Культури клітин позбавлені структурної організації, втрачають характерну гістіотипову архітектуру й пов'язані з нею біохімічні ознаки і, звичайно, не досягають зрівноваженого стану за відсутністю спеціальних умов. Клітини в культурах розмножуються, що забезпечує одержання великої маси клітин, потім їх ідентифікують (за фенотиповими ознаками, шляхом вирощування на селективному середовищі, генотиповими), розділяють на ідентичні паралелі і, якщо це необхідно, зберігають.

Список типів клітин, що вже введені в культуру, досить великий. Це елементи сполучної тканини людини (фібробласти), скелетні тканини (кістка й хрящі), скелетні, серцеві і гладенькі м'язи, епітеліальні тканини (печінка, легені, нирки й ін.), клітини нервової системи, ендокринні клітини (наднирники, гіпофіз, клітини острівців Лангерганса), меланоцити й різні пухлинні клітини.

Популяція клітин не завжди гомогенна й має фіксований фенотип. Деякі культури, наприклад, кератиноцити епідермісу, містять стовбурові клітини, клітини-попередники й кератинизовані лускаті клітини. У такій культурі відбувається постійне оновлення за рахунок стовбурних клітин, проліферація і дозрівання клітин-попередників, а також необоротна диференціація, що супроводжується «лушчінням» лускатих клітин до культурального

середовища.

Яку тканину краще брати для введення в культуру, дорослу або ембріональну, нормальну або пухлинну? Культури, отримані з ембріональних тканин, характеризуються кращою виживаністю й більш активним ростом порівняно з відповідними зрілими тканинами. Причиною цього є низький рівень спеціалізації й наявність клітин-попередників, що реплікуються, в ембріонах. *Проліферативна* (від лат. *proles* нащадки + *facere* робити; розростання тканини шляхом новоутворення клітин) здатність дорослих тканин нижче, вони містять більше спеціалізованих клітин, що не подвоюються. Одержання первинних культур клітин дорослих тканин і їхнє розмноження є більш складним завданням, тривалість життя таких культур, як правило, невелика. Нормальні тканини дають початок культурам з обмеженим часом життя, в той час як культури, отримані з пухлин, здатні проліферувати необмежено довгий час. Диференціація нормальних клітин у культурі звичайно супроводжується повним припиненням проліферації клітин. У культурах пухлинних клітин можлива часткова диференціація за збереження здатності до проліферації.

Свіжоотримані культури називаються *первинними* культурами до початку *пасирування* або *субкультивування*. *Пасирування* (розділ) клітин – це відбір невеликої кількості клітин для вирощування в іншій лабораторній судині. Культуру клітин можна використовувати значно довше, якщо регулярно здійснювати відбір клітинного матеріалу, що дозволяє запобігти передчасному старінню культури внаслідок підвищення щільності заселення клітин. *Суспендовані* культури (окремі клітини, що розташовані в поживному середовищі) пасирувати простіше, тому що для цього досить лише відібрати необхідну кількість клітин, помістити їх в інші судини і додати свіже поживне середовище. *Адгезивні* ж клітини (від лат. *adhaesio* прилипання) перед цим варто розділити. Найчастіше для цієї мети використовують суміш трипсину або інші ферментні суміші. Невелика кількість клітин, що розподілені, може бути використана для заселення нової культури.

Клітини первинної культури зазвичай гетерогенні й характеризуються низькою проліферацією. У них найбільш повно представлені типи клітин тієї тканини, звідки вони були отримані. Пасирування забезпечує можливість продовження існування культури, можливість клонування, дослідження й збереження

властивостей клітин. При цьому утворюються більш однорідні популяції, а також втрачаються спеціалізовані клітини. Після декількох пересівань лінія клітин або гине, або *трансформується* й стає *постійною клітинною лінією*. Властивістю «безсмертя» володіють, головним чином, клітини, отримані з пухлин. Поява постійної лінії клітин констатується за морфологічними змінами (зменшення розміру клітин, зниження їх адгезивності, округлення, збільшення ядро/цитоплазматичного відношення), за збільшенням швидкості росту (час подвоєння клітин у культурі знижується з 36...48 до 12...36 годин), за зниженням залежності від сироватки, за збільшенням ефективності клонування, за зниженням залежності від субстрату, за збільшенням гетероплоїдності (хромосомні різниці між клітинами) і анеуплоїдності. Нормальні клітини можуть трансформуватися в постійну лінію, не стаючи при цьому злоякісними.

### 4.3. Характеристика клітин, що культивуються *in vitro*

Клітини одного й того типу в тканині взаємодіють одна з одною і узгоджують швидкість розподілу, щоб підтримувати належну щільність популяції. «Соціальний» контроль такого роду чітко проявляється за реакцій на пошкодження. Наприклад, при пошкодженні епітелію, клітини по краях рани стимулюються до розподілу й наповзання на оголену поверхню, поки вона знову не буде закрита; у цей момент швидко проліферація і рух клітин припиняються. Подібне явище можна спостерігати на дисоційованих клітинах у культурі. Епітеліальні клітини або фібробласти, поміщені в чашку, за наявності сироватки будуть «приклеюватися» до поверхні, розпластуватися й розподілятися, поки не утвориться суцільний моношар, у якому сусідні клітини стикаються.

Коли культура стане моношаровою, рух клітин припиняється. Нормальні клітини перестають розподілятися, це явище відомо як гальмування проліферації, що залежить від щільності. Якщо такий моношар «поранити» голкою таким чином, щоб на чашці утворилася вільна від клітин смужка, клітини із країв цієї смужки починають просуватися на вільне місце й розподілятися.

Поведінка клітин у культурі характеризується двома основними параметрами: контактним гальмуванням і адгезією.

**Контактне гальмування** – або регуляція клітинного росту, залежить від кількості клітин на одиниці площі. Максимальна щільність для нормальних клітин –  $10^4/\text{см}^2$ , для пухлинних клітин –  $10^6/\text{см}^2$ . Нормальні клітини, що ростуть на поверхні субстрату, створюють моношар, а ріст пухлинних клітин характеризується безладністю у зв'язку з чим утворюється багатошарова структура.

*Адгезія*, тобто з'єднання клітин між собою і субстратом, що пригнічує процеси росту клітин, у пухлинних клітин виражена значно менше, ніж у клітини з нормальною програмою розвитку.

Меншу здатність до адгезії і нижчу ступінь контактного гальмування пухлинних клітин, в першу чергу, пов'язують з нерівномірним розташуванням на їх поверхні рецепторів, які реагують на *мітогени* – речовини, що прискорюють подвоєння клітин і *халогени* – речовини, що затримують процес подвоєння. Таким чином, пухлинні клітини зберігають здатність до тривалого розмноження в культурі.

Щільність клітинної популяції, за якої клітини в суцільному моношарі перестають розподілятися, збільшується з підвищенням концентрації факторів росту в середовищі. Крім того, виявилось, якщо культуральна рідина буде протікати по поверхні чашки з острівцями клітин, то клітини, що омиваються середовищем, яке щойно пройшло над іншими клітинами, будуть розподілятися повільніше за ті, які обмиваються середовищем, що пройшло над вільними від клітин ділянками. У середовищі, що протікало над клітинами, можливо бракує поживних речовин або факторів росту.

Фактор росту, звичайно, присутній у середовищі в концентрації до  $10^{-10}$  М (приблизно одна молекула в об'ємі сфери діаметром 3 мкм). Один фібробласт має до  $10^5$  рецепторів фактора росту, кожний з яких високоспоріднений до нього. Таким чином, у кожній клітині досить рецепторів, щоб зв'язати всі молекули ростових факторів в об'ємі сфери діаметром близько 150 мкм.

Крім того, вважають, що значна частина фактора росту, пов'язаного рецепторами клітинної поверхні, швидко поглинається шляхом ендоцитозу й руйнується. Із цього зрозуміло, що сусідні клітини конкурують між собою за навіть незначної кількості факторів росту. Такого роду конкуренція важлива як для клітин у тканині, так і для клітин, що культивуються, вона запобігає росту популяції вище певного рівня її щільності.

Конкуренція за фактори росту й поживної речовини не єдиний

фактор, що впливає на швидкість розподілу в клітинній культурі. Форма клітин під час їх розпластування і руху по поверхні субстрату на вільні місця теж дуже впливає на їхню здатність розподілятися. За культивування нормальних клітин у суспензії, коли вони не прикріплені до твердої поверхні й тому мають округлу форму, процес розподілу не відбувається (залежність розподілу від прикріплення). Вплив розпластування клітин на проліферацію можна продемонструвати за вирощування клітин на субстратах з різною адгезивністю поверхні або на таких субстратах, де є лише дрібні адгезивні ділянки, на яких клітина може прикріпитися, але не може розпластатися. Частота розподілу клітин зростає зі збільшенням ступеня розпластування. Можливо, що сильно розпластані клітини можуть уловлювати більше молекул фактора росту й поглинати більше поживних речовин завдяки своїй більшій поверхні.

Однак, деякі типи клітин, що майже не здатні до проліферації в суспензії, охоче розподіляються, як тільки їм вдається вступити в контакт із ділянкою субстрату, навіть, якщо ця ділянка настільки мала, що клітина не може на ній розпластатися. Цикл прикріплення й відкріплення, імовірно, дозволяє перегрупувати адгезивні контакти як між клітинами, так і між клітинами й матриксом, щоб вмонтувати знову виниклі дочірні клітини в тканину, перед тим як вони зможуть почати наступний цикл розподілу. Ослаблення контактів, очевидно, становить важливу особливість проліферативної поведінки більшості типів клітин. Наприклад, у ранній стадії реакції фібробластів на ростовий фактор відбувається руйнування їхніх фокальних контактів. Втрата керованості росту в ракових клітин майже завжди пов'язана з незворотним зменшенням клітинної адгезивності, що проявляється також у втраті фокальних контактів за вирощування таких клітин у культурі.

Зміна ростових властивостей клітин, що культивуються, називається **трансформацією**. Трансформація – процес незворотний і, мабуть, включає генетичні зміни. Зміна ростових властивостей є однією з адаптивних особливостей, що дозволяє клітинам проліферувати в умовах, несприятливих для нетрансформованих клітин. У такий спосіб в умовах, які обмежують ріст нормальних клітин, трансформовані клітини будуть рости до більш високої щільності популяції, що, очевидно, буде пов'язано з їхньою зниженою потребою у факторах росту. Є докази, що основна зміна за трансформації пов'язана зі зміною транспортування поживних

речовин через клітинну мембрану, а це, у свою чергу, може зробити клітини менш залежними від геометричних факторів росту.

Трансформовані клітини здатні рости в умовах, в яких геометричні характеристики, а саме, відношення площі поверхні до об'єму менш сприятливі. Отже, трансформовані клітини будуть рости в суспензійних культурах, утворюючи сферичні клони. Так, трансформовані клітини за введення імунологічно толерантній тварині у відносно невеликих кількостях, можуть утворювати пухлини. Із цієї причини трансформація іноді прирівнюється до злоякісних змін. Трансформація може бути або вірусною, або спонтанною. Більшість досліджень виконані із клітинами, що піддаються вірусній трансформації. Коли при цьому використовували добре відомі віруси, що трансформують, такі, як віруси SV40 і поліоми, то властивості трансформованих клітин виявлялися дуже чітко і були описані детально. Аналогічні зміни, що спостерігалися після спонтанної трансформації, призвели до припущення, що така трансформація є результатом активації послідовностей генів (онкогенів), що вже були присутні у геномі трансформованої до цього клітини, подібної до такої у вірусному геномі. Багато досліджень підтвердили, що спонтанно трансформовані клітини мають таку ж послідовність основ у ДНК, як і в клітинах, трансформованих вірусами.

Старіння характерне для клітин, що мають обмежений потенціал проліферації, тобто низьку щільність насичення за ідеальних умов культивування. Прикладом можуть бути лінії диплоїдних клітин людини. Підвищена здатність до росту трансформованих клітин означає, що трансформація переважає над процесом старіння.

Старіння, безумовно, залежить від генетичних факторів, тому що кожний вид має характерну тривалість життя, але варіабельність усередині популяцій за цим показником свідчить також про вплив фенотипу. За адаптування диплоїдних клітин людини (лінія WI38) вже із самого початку було показано, що клітини, які культивуються, можуть виявляти феномен старіння й мають обмежений час життя ( $50 \pm 10$  подвоєнь популяції). Залежні від віку зміни, що при цьому спостерігалися, включали подовження міжмітотичних інтервалів ( $19 \pm 25\% - 31 \pm 41\%$ /год.), зміну метаболізму, рівнів ферментів і експресії продукту. Слід зазначити, що не встановлено чіткого зв'язку між тривалістю життя залежно від походження клітини (миша, людина) і потенціалом подвоєння їх клітин у культурі.

Межа або ліміт Хейфліка (англ. *Hayflick limit*) – межа розподілу соматичних клітин, названа на честь її відкривача Л. Хейфліка. У 1965 році Хейфлік спостерігав, як клітини людини, що подвоюються в клітинній культурі, гинуть приблизно після 50 подвоєнь і проявляють ознаки старіння за наближення до цієї межі.

Такий ліміт був знайдений у культурах усіх цілком диференційованих клітин як людини, так й інших багатоклітинних організмів. Максимальне число подвоєнь залежить від типу клітин і ще більше розрізняється залежно від організму. Для більшості клітин людини межа Хейфліка дорівнює 52 подвоєнням.

Межа Хейфліка пов'язана зі скороченням теломер, ділянок ДНК на кінцях хромосом. Переважна більшість соматичних клітин не мають активної теломерази, і тому при кожному подвоєнні клітини теломери скорочуються, оскільки ДНК-полімераза не здатна реплікувати кінці молекули ДНК (можливо, теломери інколи скорочуються під впливом деяких інших факторів). Коли після певного числа подвоєнь теломери зникають зовсім, клітина зазвичай стає заблокованою на певній стадії клітинного циклу або запускає програму апоптозу, тобто самогубства.

Для пояснення старіння і загибелі клітин запропоновано декілька гіпотез. Одна з них пов'язує старіння з накопиченням соматичних мутацій, порушенням процесів транскрипції і трансляції, біосинтезом у зв'язку з цим значної кількості неактивних або частково активних молекул, що викликає збільшення аномальних продуктів обміну. Однак є дані, що віруси у старих і молодих клітинних культурах розмножуються однаково успішно, тобто, апарат біосинтезу білка клітини-господаря, який бере участь у процесі репродукції вірусів функціонує однаково добре як у старих, так і в молодих клітинах.

Друга гіпотеза – гіпотеза запрограмованої загибелі клітин припускає, що смерть клітин – це результат реалізації генетичної програми. Існують експериментальні дані, які підтверджують, що загибель клітин у культурі та організмі настає після числа подвоєнь, що збігається, і є наслідком реалізації генетичної програми.

Ще одна з гіпотез пояснює загибель клітин накопиченням речовини – *липофусцину*, яка утворюється в результаті розпаду білкових структур, ліпідів і гемі. За подвоювання клітин, ліпофусцин, що накопичується, розподіляється між дочірніми клітинами. Однак не зрозуміло, чому ліпофусцин не впливає на



тривалість життя в культурі пухлинних клітин?

Обмежені за тривалістю життя клітинні лінії, наприклад, лінії диплоїдних клітин фібробластів, не є ідеальними об'єктами для цілей виробництва, оскільки їх повинні використовувати до того, як у клітинах відбудуться серйозні зміни старіння. З практичної точки зору це означає, що період життя цих клітин, коли їх можна застосовувати з метою виробництва, коливається між 12 і 30 пасажами (у першому випадку – для приготування посівного матеріалу). Трансформовані ж клітини не мають обмеженої тривалості життя, крім того, субстрати з них характеризуються більш високою щільністю популяції клітин, значними швидкостями росту й здатністю рости в суспензіях. Усе це обумовлює їхню перевагу в біотехнології для використання як субстратів для генерації різних продуктів.

#### 4.4. Поживні середовища і умови культивування

Після витягнення клітин із тканини або організму й переміщення їх до культури, культуральне середовище повинно забезпечувати всі зовнішні умови, які клітини мали *in vivo*. Це сприяє виживанню клітин, їхній проліферації й диференціації. Позаклітинне середовище повинно забезпечувати клітини поживними і гормональними факторами, тобто володіти всім необхідним для росту й виживання клітин.

Культури клітин тварин і людини висувають певні вимоги до рідкої (поживне середовище), газоподібної (концентрація газів) і твердої (поверхня субстрату) фази. Поживне середовище – це розчин певного складу, до якого додаються компоненти нез'ясованого біологічного походження (добавки плазми, сироватки крові, екстракти тканини й т.ін.). Основу поживних середовищ становлять сольові розчини. Мінеральні компоненти в цих розчинах підібрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс середовища в процесі культивування. Сталість рН середовища є одним з головних вимог умов культивування.

Для приготування поживних середовищ звичайно використовуються *сольові розчини Ерла й Хенкса*. Ці розчини, як і фосфатно-сольовий буфер Дульбекко й Фогта використовуються

також для зрошення й промивання клітин за пасажування культур, виділення клітинних ліній та інших маніпуляцій з культурами клітин. Важливою умовою культивування є також осмотичний тиск. Він визначається числом молів осмотично активних часток (йонів і нейонізованих молекул) розчинених речовин на 1 кг розчинника (осмоляльність) або на 1 літр розчину (осмолярність). У розведених водяних розчинах ці величини близькі.

**Стандартні середовища для ведення культур тваринних клітин.** Середовища Ігла *MEM* (*minimal essential medium*) і *BME* (*basal medium, Eagle*). Частіше використовується *MEM*. Воно містить мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін й інозит, що виконують роль вуглеводного субстрату. *MEM* використовується тільки із сироваткою, тому що в ньому відсутні біотин, вітамін  $B_{12}$ , йони заліза та мікроелементи. Основою є розчин Ерла.

**Середовище Дульбекко *DME* або *DMEM* (подвійна модифікація середовища Ігла).** Використовується за культивування клітин різних типів, у тому числі нетрансформованих клітин і гібридом. Є основою для безсироваткових середовищ. Містить подвійну концентрацію амінокислот, гліцин, серин, піруват, залізо. За використання цього середовища необхідний інкубатор з 10% концентрацією  $CO_2$ .

**Середовище Іскова *IMDM* – модифікація середовища Дульбекко.** До нього додано незамінні амінокислоти, біотин, вітамін  $B_{12}$ , селеніт натрію. До середовища введено *HEPES* і зменшено концентрацію  $NaCl$  і  $NaHCO_3$ . Середовище без сироватки звичайно використовується для культивування лімфоцитів і кровотворних клітин.

**Середовище МакКоя 5A і серія середовищ *RPMI*.** Середовище МакКоя 5A розроблено у 1958 році для підтримки клонального росту клітин карциносаркоми Уолкера 256 за наявності сироватки, та в наступному – інших первинних культур і різних клітинних ліній. Виробляється в модифікації Івката й Грейса (*RPMI*) і призначене для культивування лейкоцитів за наявності сироватки, часто застосовується і для культивування гібридом. Концентрація  $CO_2$  в атмосфері за культивування становить 5%.

**Середовище 199** розроблено у 1950 році для культивування фрагментів серця з ембріона курчати. Для середовища характерний широкий спектр поживних речовин і невисока їхня концентрація.

Використовується без добавок для підтримки первинних клітин, а із сироваткою – як ростове середовище для клітин, що швидко розмножуються. Нормальні клітини, що зберігають специфічні функції, не розмножуються на стандартних середовищах. Для оптимального росту клітин звичайно додають 5...20% фетальної (ембріональної) сироватки.

Сироватка являє собою надзвичайно складну суміш дрібних і великих молекул, здатних як викликати, так і гальмувати ріст клітин. До головних функцій сироватки належать: забезпечення гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин і їхні функції; забезпечення факторами прикріплення й розпластування клітин; забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди й т.ін. Білки сироватки, що безпосередньо і специфічно беруть участь у стимуляції клітинного розподілу, називаються **факторами росту**.

Більшість ростових факторів присутні у сироватці в концентрації декількох нанограмів на мілілітр і нижче. Деякі із цих факторів специфічні для клітин на певній стадії диференціації, дія інших не обмежена якимось одним типом клітин. Той самий тип клітин може бути стимульований різними ростовими факторами. Наприклад, фібробласти розмножуються у відповідь на фактори росту фібробластів, епідермісу, тромбоцитів й соматомедину. Всі ці речовини є мітогенами (стимулюють мітоз). Важливим фактором росту практично для всіх типів клітин є гормон інсулін. З інших гормонів найчастіше застосовуються глюкокортикоїди (гідрокортизон, дексаметазон), стероїди (естрадіол, тестостерон, прогестерон) і гормони щитовидної залози (трийодтиронин). Гормони стимулюють або пригнічують ріст залежно від типу клітин і їх щільності. Глюкокортикоїди, наприклад, впливають на проліферацію клітин, змінюючи їх чутливість до факторів росту.

Для перенесення низькомолекулярних факторів (вітамінів, амінокислот, ліпідів й інших) необхідні транспортні білки. В цій ролі виступає альбумін. Транспортування заліза забезпечує трансферин, а поверхня більшості клітин, що культивуються, містить рецептори для цього білка. До факторів прикріплення й розпластування клітин належать колаген і фібронектин.

Останніми роками розроблено середовища без сироватки для розмноження клітин. Найчастіше ці середовища вузькоспеціалізовані, тобто призначені для певного типу клітин. До базового середовища

додається інсулін, трансферин, гідрокортизон або його аналог дексаметазон і т.ін.

Безсироваткові середовища мають певні переваги:

- поліпшення відтворюваності результатів досліду внаслідок більшої стабільності складу середовища;
- зниження ризику зараження культури вірусами, грибами, мікоплазмою;
- полегшення очищення продуктів клітинного метаболізму; зниження впливу додаткових білків на результати біологічних досліджень;
- відсутність цитотоксичності сироватки.

Культитивування клітин за наявності сироватки має і ряд недоліків:

- для більшості тканин сироватка не є фізіологічною рідиною, з якої вони контактували у вихідній тканині (наприклад, сироватка викликає ріст фібробластів, але гальмує ріст епідермальних кератиноцитів);
- сироватка може бути цитотоксичною;
- спостерігається значна варіабельність складу сироваток різних партій;
- сироватки можуть містити недостатню кількість специфічних ростових факторів, що викликає необхідність додаткового їх введення до культур клітин.

Багато клітин ссавців, перш ніж розпочати проліферацію і створити клітинний моношар, повинні прикріпитися до субстрату й розпластатися на ньому. У зв'язку із цим встає питання підбору певного матеріалу. В наш час як субстрат використовують кілька матеріалів.

Скло – найкраще пирекс (алюмоборосилікатне скло), тому що натрійсилікатне скло може збільшувати лужність середовища і його необхідно кип'ятити в слабкій кислоті перед застосуванням. З кожним використанням придатність такого скла зменшується.

Пластик – найчастіше використовують полістирол, полікарбонат, полівінілхлорид, тефлон та інші.

Метали – придатною є як неіржавіюча сталь, так і титан, тому що ці речовини хімічно інертні й мають високий негативний поверхневий заряд. Клітини прикріплюються за рахунок електростатичних взаємодій, тому поверхня культуральних судин повинна змочуватися і бути негативно зарядженою. Цього можна

досягти хімічною обробкою агентами, що окислюють, або фізичними впливами (високовольтним розрядом, ультрафіолетовим світлом, бомбардуванням високоенергетичними електронами). Іноді поверхню судини покривають речовиною, що полегшує прикріплення клітин. Найчастіше для цього використовують колаген і поліамінокислоти.

#### 4.5. Системи культивування клітин

Усі способи вирощування клітин тварин можуть бути співвіднесені або до інтактних (нетрансформованих за допомогою вірусів), або до вірусотрансформованих клітин. Успіх культивування перших багато в чому обумовлений наявністю й щільністю адгезинів, завдяки яким вони проявляють ефект «розпластування» на поверхні скла, металу або пластику. Однак, такі клітини не ростуть у суспензійних культурах.

Вірусотрансформовані клітини тварин, навпаки, добре ростуть у вигляді суспензійних культур і гірше або зовсім не ростуть в адгезированому стані. Є такі штами тваринних клітин, які можуть рости й у прикріпленому стані, і у вигляді суспензії клітин, що прикріпилися, розмножуються, ростуть і розвиваються, поки не зіллються в моношар, тобто щільність клітин є гальмівним сигналом. Однак, за зміни поживного середовища на нові порції спостерігається подальше розростання клітин у формі декількох шарів, що злилися. Подібного результату можна домогтися за використання інших факторів впливу на клітинні культури (гормони, ферменти, рН і т.ін.). Проте, на практиці широко користуються моношаровими культурами.

Є дві основні системи культивування клітин:

1. *Непротічні культури* – тип культур, у якому клітини вводять у фіксований об'єм середовища. У міру росту клітин відбувається використання поживних речовин і накопичення метаболітів, тому середовище повинно періодично змінюватися, що призводить до зміни клітинного метаболізму, названого ще і фізіологічною диференціацією. Згодом, у наслідок виснаження середовища відбувається припинення проліферації клітин.

Збільшити тривалість життя непротічних культур можна декількома способами:

- переривчастий (частина культури замінюється рівним об'ємом свіжого середовища);

- постійний (об'єм культури збільшується з постійно низькою швидкістю, а невеликі порції клітин періодично віддаляються);
- перфузійний (здійснюється постійне надходження свіжого середовища до культури й одночасне видалення рівного об'єму використаного (безклітинного) середовища).

Перфузія може бути відкритою, коли із системи віддаляється все середовище, і закритою, коли середовище, що видаляється, проходить через додаткову судину, де відновлюється його рН і здійснюється аерація, а далі повертається до культуральної судини.

Усі системи непротічних культур характеризуються накопиченням відходів у тій або іншій формі й мінливістю зовнішніх умов.

2. *Протічні культури* забезпечують дійсні гомеостатичні умови без зміни концентрації поживних речовин і метаболітів, а також числа клітин. Гомеостаз обумовлений постійним надходженням середовища до культури й одночасним видаленням рівного об'єму середовища із клітинами. Такі системи придатні для суспензійних культур і моношарових культур на мікроносіях.

Існує два великих напрямки в культивуванні тваринних клітин: моношарові культури й суспензійні культури.

**Глибинне вирощування клітин у моношарі.** Ріст клітин у вигляді моношару залежить від адгезивних білків – фібронектинів (від лат. *fibra* – нитка, *nectere* – зв'язувати або з'єднувати), що забезпечують міжклітинну адгезію, прикріплення клітин до підкладки і спрямовують їх переміщення. У тваринному організмі клітини, здатні до переміщень (особливо в період ембріонального розвитку, при загоєнні ран), і пов'язані з базальними мембранами, містять на своїй поверхні великомолекулярні глікопротеїнові молекули фібронектину, відкритого у 1973 р. Р.О. Хайнсом (Англія), К. Гамбергом і С.І. Хакоморі (США) при вивченні нормальних і пухлинних клітин. Фібронектин під час полімеризації утворює довгі нитки навколо клітин, що контактують із клітинною мембраною і зв'язуються із цитоскелетним білком-актином.

Молекула фібронектина складається із двох субодиниць з молекулярною масою близько 250 кДа, які містять невеликі за розмірами домени, що з'єднані на одному кінці двома S-S-містками. Розміри однієї субодиниці 60...70 x 2-3 нм; на цю довжину припадає від 2145 до 2445 залишків амінокислот. Кожен домен відповідає за одну функцію фібронектину, наприклад, за з'єднання з фібрином,

інший домен – за прикріплення до пластика й т.ін.

Доведено, що фібронектин є у всіх представників царства *Animalia*. Амфотерний глікопротеїнфібронектин в ізольованому вигляді стимулює адгезію, якщо додавати його до поживного середовища в концентрації близько 1...5 мкг/мол. Амфоліт у цьому разі є містком між негативно зарядженою поверхнею тваринної клітини й субстратом, що несе негативний або позитивний заряд. Вільна енергія поверхні твердого носія може бути високою (чисті поверхні скла, металів, металевих окислів) або низькою (поверхні з органічних полімерів), хоча зрозуміло, що за відповідних обробок низькоенергетичні поверхні трансформуються у високоенергетичні. Як сполучні містки можливо застосовувати йони кальцію або магнію.

Поряд із щільністю заряду в здатності клітин до прикріплення велике значення мають характеристики субстрату: гідрофільність його поверхні (змочуваність), довжина й горизонтальність. Розпластуваність клітин на підкладці стане вищою, якщо кількість негативних зарядів буде не нижче 5 на площі 10 нм<sup>2</sup>. Адгезивні властивості більше виражені для поверхонь, що змочуються, порівняно з гідрофобними, за довжиною вони повинні бути більше нормальної довжини клітин; субстрати зі скривленою поверхнею гірші за гладкі – зростаючі клітини поширюються в напрямку найменшої кривизни субстрату. Якщо, наприклад, прикріплення клітин до агар-агару прийняти за одиницю, то до тефлону вони прикріплюються в 5 разів швидше, до поліетилену – в 8 разів, до поліпропілену – в 9 разів, до гуми – в 12 разів, до алюмінію – в 15 разів, до скла – в 16 разів, а до сталі й полістирену – в 20 разів.

Великомасштабне культивування тваринних клітин у моношарі націлене на одержання найбільшої концентрації клітин у найменшому об'ємі газової фази. Вибір клітин не настільки великий, але деякі з них повністю адаптовані до умов вирощування *in vitro*. У 1964 р. уперше були отримано лінії сполученотканих клітин – фібробластів *VHK 21* від сірійського хом'яка. Ці клітини пасируються необмежено довго і спочатку використовувалися для репродукції вірусу ящура за приготування відповідних вакцин.

Варто мати на увазі, що нормальні диплоїдні клітини людини, наприклад, лінії *WI-38*, можуть поділитися обмежену кількість разів (50±10) і виявляють феномен старіння. У той же час такі клітини, як *HeLa*, виділені з ракової пухлини шийки матки людини, виявилися безсмертними при пасеруванні. За доступності донорської тканини

використовують клітини нирок кролів, мавп, собак (лінія *МДСР*), 10...14-денних ембріонів курей, клітини з мигдалин, амніону, легенів ембріона людини 12...16-тижневого віку, клітини епідермісу дорослої людини, фібробласти мишей (лінія *LS*), диплоїдні фібробласти людини (лінія *MRC-5*) та інші.

Обрані клітини вирощують у суворо асептичних умовах, застосовуючи спеціальне устаткування під час повільного обертання ролерної системи або погойдування для омивання більшої площі культурального середовища. Клітини по чергово занурюються у рідку та в газоподібну фазу. При цьому з надлишком забезпечуються їхні дихальні потреби киснем.

Під час циклу культивування клітин слід враховувати різні параметри. Одні з них належать до числа константних, інші – до числа варіабельних. Константними є якість матеріалу, форма й обсяг культиватора, варіабельними – швидкість обертання або погойдування, якість і обсяг середовища, тип клітин і розмір (величина) посівного матеріалу, рН і температура середовища, постачання кисню і вміст  $\text{CO}_2$  у культиваторі, окислювально-відновний потенціал і концентрація основних джерел живлення. Перші три варіабельних показники можна підтримувати постійними, переводячи їх у розряд константних.

Контроль за розвитком клітин здійснюють за допомогою прямих (підрахунок) і непрямих методів (за каламутністю, підрахунком ядер, визначенням загального білка).

Посівний матеріал (інокулят, від лат. *inoculatio* – щеплення) помітно позначається на швидкості росту клітин у моношаровій культурі. У разі застосування первинних клітин необхідно мати їх у більш високій щільності на  $1 \text{ см}^2$  внутрішньої (робочої) поверхні культиватора.

Якщо ж використовують клітинні лінії (а не первинні клітини), то щільність інокуляту може бути трохи меншою, тому що вони, майже всі 100%, здатні до адгезії на поверхні культиватора. Погойдування або клітин, що омиваються середовищем, безсумнівно позначається на їхньому прикріпленні.

Моношарові культури також мають ряд переваг:

1. Легко можна провести повну заміну середовища і промити клітини перед додаванням свіжого поживного середовища. Це важливо в тих випадках, коли ріст клітин відбувається в одних умовах, а вироблення продукту в інших умовах, наприклад, за



перенесення клітин із середовища з сироваткою в безсироваткове середовище. Можна також повністю видаляти небажані компоненти.

2. Дозволяють забезпечити високу щільність клітин.
3. У багатьох клітин експресія необхідного продукту відбувається більш ефективно, якщо клітини прикріплені до субстрату.
4. Моношарові культури можуть бути використані для будь-якого типу клітин, що забезпечує найбільшу гнучкість досліджень.
5. У деяких випадках, наприклад, для розповсюдження вірусів, потрібні тісні міжклітинні контакти.

Недоліками моношарових культур є:

- потреба великого простору;
- зростання вартості й трудомісткості за збільшення масштабу;
- недостатньо ефективний контроль, обумовлений труднощами відбору проби;
- труднощі у визначенні й контролюванні рН, концентрації кисню.

Слід зазначити, що застосування мікроносіїв усуває ці недоліки.

Існує кілька різних різновидів цього способу культивування.

1. Культивування в плоских флаконах (матрацах).
2. Культивування в обертових суліях, коли в кожний момент часу 15...20% поверхні сулії покрито поживним середовищем, а клітини перебувають перемінно то в середовищі, то в повітрі.
3. Культивування в колонках на мікроносіях, якими є щільно впаковані скляні намиста, що не зміщуються, діаметром 35 мм, стопка пластин й ін., а поживне середовище обмиває їх, протікаючи зверху вниз.

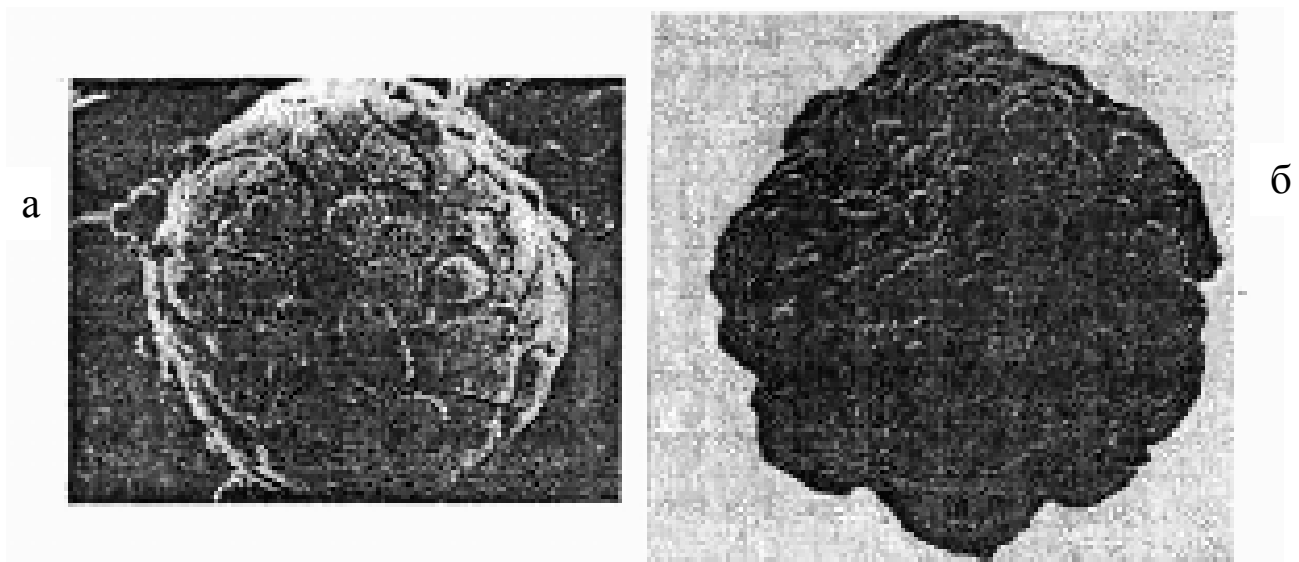
#### ***Глибинне вирощування клітин у суспензійних культурах.***

Площу вирощуваних клітин можна істотно збільшити, використовуючи мікроносії, що створюють суспензію у поживному середовищі, й на поверхні яких клітини закріплюються, а потім розростаються у вигляді моношару. Такі суспензійні мікроносії із клітинами моделюють глибинні культури, наприклад, мікроорганізмів. Отже, у таких системах сполучаються моношарові й суспензійні культури тваринних клітин.

Як мікроносії застосовують позитивно заряджені ДЕАЕ-сефадекси, сефадекси з колагеновим покриттям, негативно заряджений полістирол, порожні скляні сфери й ін. Так, наприклад, окремі фірми пропонують мікросфери з пористого жужільного скла,

які можуть бути використані для іммобілізації клітин ссавців. Пори їх доступні для пенетрації (від лат. *penetratio* – проникнення) клітин усередину матрикса. Пористі сфери придатні для іммобілізації суспензійних клітин, що прилипають (наприклад, гібридом).

Необхідна кількість їх приблизно дорівнює  $10^4$ /мл, а для інокуляції необхідно до  $10^5$  клітин. За збільшення кількості мікроносія зростає доза клітин в інокуляті (рис. 45).



**Рис. 45. Мікросфери для іммобілізації клітин ссавців з мікропористих, біологічно інертного скла – (а) і склашляку (так званий *Cultispher-G*) – (б); (збільшення  $\times 10000$ )**

Підхід до вибору середовищ і контрольованого параметра культивування залишається тим самим. Клітини після вирощування відокремлюють від мікроносіїв центрифугуванням (у тому числі – у градієнті щільності), фільтруванням, або, частіше, обробкою трипсином з наступним промиванням і сепаруванням.

Суспензійні клітини на мікроносіях застосовують із метою одержання вірусних вакцин (проти сказу, поліомієліту, ящура).

Можливості перенесення генетичної інформації з еукаріотичних клітин у прокаріотичні зняли проблему масового культивування тваринних клітин для одержання таких продуктів, як інтерферон, гормони, лімфокіни й інших. Тут успішно розвивається рДНК-біотехнологія. Клітинам тварин у глибинних культурах майже у всіх випадках необхідна захисна матриця, функцію якої беруть на себе білки сироватки крові, що додають до середовища культивування. Цим ще раз підтверджується більш висока травмованість клітин

тварин порівняно з мікробними й рослинними клітинами. Проте, основні підходи до вибору обладнання й реалізації біотехнологічних процесів з використанням тваринних клітин багато в чому аналогічні з такими в мікробній біотехнології. Наприклад, системи культивування в обох випадках можуть бути хемостатичними, циклічними, безперервними або напівбезперервними.

На противагу суспензійним культурам клітин на мікроносіях розроблено способи інкапсулювання їх у полімерні сфери (полілізинові, агарозні, з полімерних смол), коли клітини не зазнають тієї механічної напруги, що вони повинні виявляти у вільному вигляді. Ці способи стали вигідними для культивування гібридом з метою одержання моноклональних антитіл. Діаметр мікрокапсул, розмір пор у них і їхня товщина можуть бути незалежно проконтрольовані в процесі виготовлення й оптимізовані для конкретного типу гібридом.

Таким чином, глибинне вирощування тваринних клітин можна реалізувати трьома варіантами:

- 1) моношар клітин статичний, а культуральне середовище рухливе;
- 2) середовище культивування статичне, а моношар клітин рухливий;
- 3) клітини (наприклад, на мікроносіях, у мікросферах) і середовище культивування рухливі.

Ці варіанти вирощування клітин слід брати до уваги за вибору або проектування відповідного обладнання.

**Інші способи вирощування клітин.** У наш час у дослідно-промислових умовах одержують інтерферон, вирощуючи лімфобласти людини у вигляді культур, коли певна частина клітинної суспензії заміщається свіжим середовищем, наприклад, *ultrosor NY* (Німеччина), а частина, що залишається, «старої» культури виконує роль інокулята. Інтерферони можливо отримувати в періодичній культурі, коли частину її відбирають через певні інтервали часу за безперервного підживлення свіжим поживним середовищем з постійною швидкістю його подачі. Тоді об'єм культури прогресивно зростає, так само як прогресивно знижуються швидкості її росту й розведення.

Як би довго не вдавалося підтримувати клітини в циклічних культурах із підживленням, в остаточному підсумку вони гинуть і весь цикл доводиться починати спочатку. Тривалий час можна вирощувати клітини ссавців у безперервних хемостатних культурах,

коли вдається добиватися сталості концентрації субстрату, що лімітує, і щільності клітин. Теорія й практика безперервного культивування вперше сформульовані у 1950 р. Ж. Моно, і, незалежно від нього, А. Новиком і Л. Сцілардом, що запропонували термін «хемостат». У хемостатах швидкість подачі свіжого середовища й добору культури рівні (як і обсяг їх). Швидкість росту, розвитку й розмноження клітин контролюється швидкістю підведення компонента, що лімітує, а чисельність – його концентрацією. Як агент, що лімітує ріст, найчастіше використовують глюкозу, рідше – фосфат й інші речовини. За правильним підбором умов вирощування в хемостатах вдається на порядок збільшити вихід клітин порівняно з періодичним культивуванням. Причому, хемостатні культури відрізняються нагромадженням фізіологічно однотипних клітин.

Природно, що час, що витрачається на підготовку суміжних циклів і їхню реалізацію при періодичному культивуванні, є непродуктивним.

#### 4.6. Гібридизація тваринних клітин

Припущення про те, що соматичні клітини можуть зливатися одна з одною, було висловлено ще на початку ХІХ століття у зв'язку з відкриттям багатоядерних клітин (*полікаріонів*). В історичному аспекті викликає інтерес та обставина, що відкриття полікаріонів як би підтверджувало помилкове уявлення М. Шлейдена, який вважав, що нові клітини зароджуються у вигляді пухирців усередині цитоплазматичної мембрани батьківських клітин.

Гібриди соматичних клітин були відкриті лише у 60-х роках ХХ століття. У 1960 р. Панський зі співробітниками повідомили про виділення лінії гібридних клітин. Гібридні клітини були отримані шляхом змішування двох ліній, виділених раніше з однієї клітини мишачої саркоми. Вихідні лінії відрізнялися за кількістю й морфологією хромосом, а також за здатністю до утворення пухлини за введення їх мишам. Гібридні клітини містили число хромосом, відмінне від вихідних клітинних ліній, а також поверхневі антигени клітин обох батьківських ліній. Далі встановили, що клітинні гібриди можливо отримати, використовуючи клітини різних видів тварин. Агентом, що індукує злиття, виступав інактивованій вірус *HVJ*,

названий також вірусом Сендай. Із цього часу вірус Сендай став широко використовуватися в експериментах зі злиття клітин.

Зливатися можуть як клітини різного типу, що належать одному і тому ж виду (наприклад, мишачі фібробласти і мишачі лімфобласти), так і клітини тварин різних видів (наприклад, миша/людина, хом'як/курка, комар/людина). У першому разі батьківські клітини, що зливаються, розрізняються між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями, а продукти злиття є *внутрішньовидовими гібридами*. У другому разі створюються *міжвидові гібриди*, що відрізняються від початкових батьківських клітин, у першу чергу, генотипово. Багатоядерні клітини (*полікаріони*), що створилися внаслідок злиття клітин двох різних типів (А і В), можуть бути у трьох комбінаціях – АА, ВВ, АВ. Полікаріони, що містять ядра лише одного клітинного типу (АА і ВВ), називаються *гомокаріонами*; полікаріони, до складу яких входять ядра обох батьківських типів (АВ), належать до *гетерокаріонів*. Злиття у гетерокаріонах ядер після злиття клітин викликає створення клітинного гібриду – *синкаріону* (рис. 46).

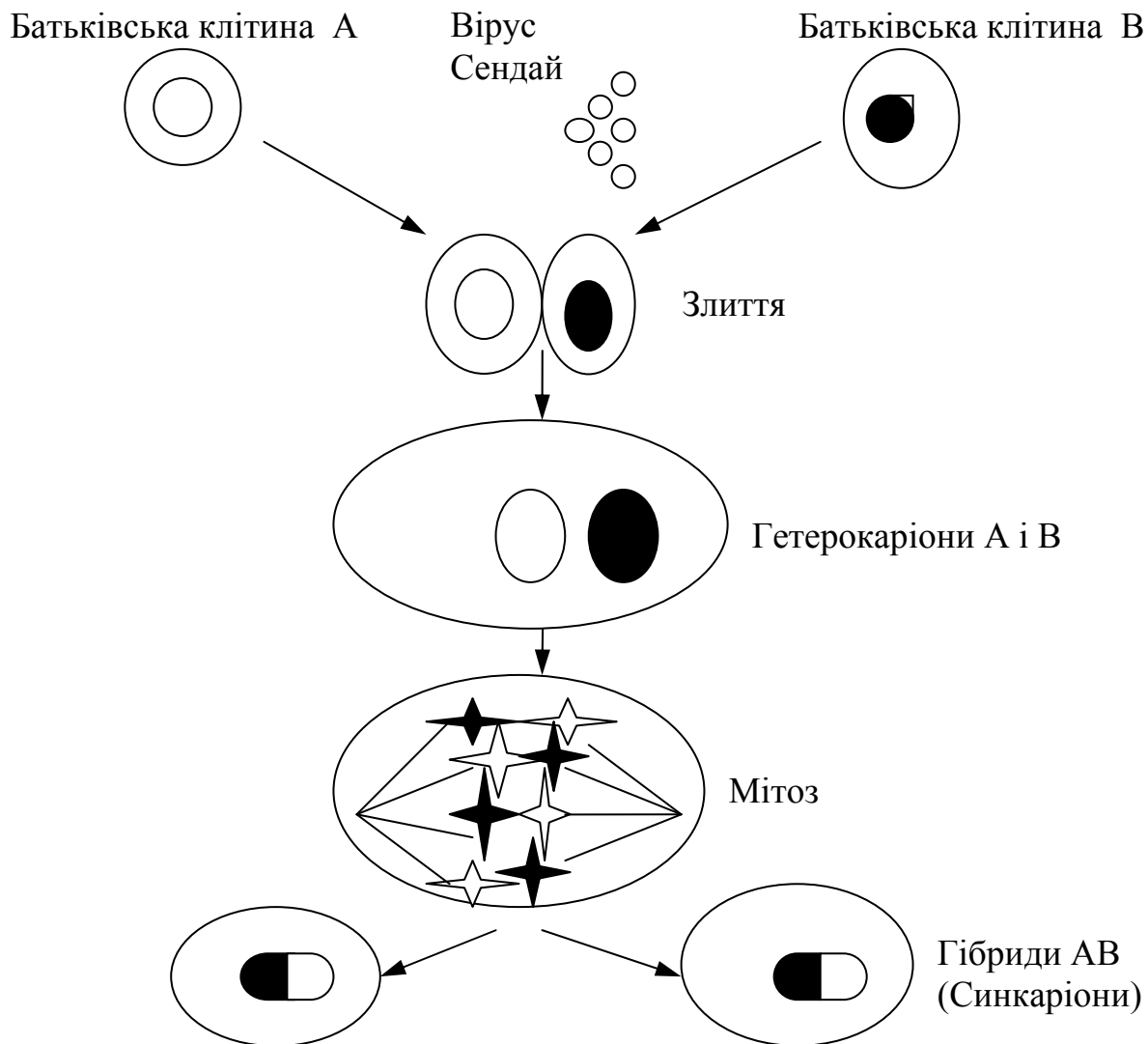
За вивчення міжвидових гібридних клітин, здатних до проліферації, було зроблено два дуже важливих спостереження:

- у гібридах можуть виявитися обидва геноми;
- у довгоіснуючих міжвидових гібридах елімінуються хромосоми одного виду.

Злиття клітин не обов'язково повинно бути чимось стимульоване. Як *in vivo*, так і *in vitro* воно може проходити й без додавання спеціальних агентів. Незважаючи на те, що всі злиття такого роду можна вважати спонтанними, деякі з них постійно відбуваються в процесі онтогенезу, тобто, еволюційно запрограмовані. Дотепер нерозгаданою залишається одна із складних загадок біології, яка полягає в тому, що мембрани, які є всередині клітини зливаються часто, тоді як мембрани, що розмежовують клітини, зливаються рідко.

Відбирають синкаріони, що створилися, за допомогою селективних середовищ. Для злиття використовують, як правило, *клітини – ауксотрофи*, тобто клітини, що позбавлені можливості синтезувати певну речовину, яка необхідна для їх росту. Але за наявності цієї речовини у середовищі такі клітини можуть рости і розвиватися. У наведеному прикладі клітина А є ауксотрофом за

речовиною  $\beta$ , але при цьому здатна синтезувати речовину  $\alpha$ , в той час як клітина В є ауксотрофом за речовиною  $\alpha$  і при цьому синтезує речовину  $\beta$ . У разі, коли в середовищі відсутні речовини  $\alpha$  і  $\beta$ , гомокаріони АА і ВВ, так само як і клітини А і В, будуть гинути в зв'язку з відсутністю необхідних компонентів, а синкаріони АВ виживуть, оскільки кожна зі складових гібриду забезпечує іншу необхідними інгредієнтами.



**Рис. 46. Схеми злиття двох одноядерних клітин А і В, що належать тваринам двох різних видів (за Рінгерцем Н. та Севіджом Р., 1979)**

У той же час нормальні клітини в природних умовах укривай рідко зливаються одна з іншою. Виняток становить процес запліднення. Крім того, як подібний рід, як виняток є і процес плазмогамії у вищих

грибів, коли одноядерні гаплоїдні клітини зливаються, утворюючи двоядерні (дикаріони) організми. Такі клітини розмножуються мітотично, залишаючись двоядерними, і в результаті утворюють добре відомі плодові тіла.

У природних умовах злиття клітин відбувається й у ссавців. Наприклад, клітини можуть зливатися за формування м'язових трубочок. Ще в XIX столітті було показано, що міофібрили поперечносмугастих м'язів утворюються в полікаріонах – великих подовжених багатоядерних клітинах. Полікаріони – продукт злиття одноядерних міобластів. Злиття пухлинних клітин – досить звичайне явище, при цьому пухлинні клітини *in vivo* іноді зливаються й з нормальними. Експерименти спонтанного злиття клітин проводилися й *in vitro*. За проведення подібних експериментів одержують так званих *химерних* або *алофенних* мишей – тварин, у тканинах яких містяться клітини різних генотипів.

**Механізм злиття клітин.** Для індукції злиття клітин використовуються речовини різної природи. Йони  $\text{Ca}^{2+}$ , поліетиленгліколь, лізолецитин, моноолеат гліцерину, вірус Сендай.

Лізолецитин – поверхнево-активна речовина ліпідної природи, продукт деградації лецитину шляхом обробки останнього фосфоліпазою А. Лізолецитин ушкоджує мембрани і токсичний для живих систем. Цитотоксичний ефект цієї речовини можна зменшити, знижуючи його концентрацію або додаючи під час обробки альбумін.

Моноолеат гліцерину також сполука ліпідної природи, але його пошкоджуюча дія менш виражена, а частота злиття клітин при застосуванні цієї речовини зростає в 4...7 разів порівняно зі спонтанним процесом. Інші аглютинуючі агенти, що здатні викликати злиття клітин, було досліджено спеціально. До них належать лектини рослин та антитіла.

Перевага вірусу Сендай як агента, що зливає, має здатність до злиття, в повній відсутності цитотоксичного ефекту. Вірус перед вживленням інактивують, опромінюючи ультрафіолетовою лампою протягом 5 хвилин, при цьому він втрачає здатність до розмноження, але зберігає можливість зливати клітини. Вірус Сендей має два недоліки:

- необхідно нарощувати, титрувати, концентрувати й інактивувати вірус;
- клітини рослин і грибів не мають рецепторів до цього вірусу, тому він не придатний для їх гібридизації.

Перший етап злиття – зближення мембран сусідніх клітин і встановлення між ними тісного контакту. Мембрани повинні бути наближені одна до одної на відстань у декілька ангстрем так, щоб між ними стали можливі взаємодії, подібні до гідрофобних зв'язків. Викликають подібне зближення агенти, що індукують аглютинацію клітин. Міксовіруси, наприклад, Сендай, поряд з іншими вірусами, які не обумовлюють злиття, насамперед викликають аглютинацію клітин, тобто досить тісне їх зближення, що необхідне для успішного наступного злиття.

Поліетиленгліколь також викликає агрегацію клітин, хоча механізм дії його невідомий. Можливо, завдяки тому, що у водяному розчині ПЕГ несе невеликий негативний заряд, молекули цього розміру досить великі, щоб між клітинами виникали електростатичні зв'язки. Підтвердженням цієї гіпотези є посилення аглютинації клітин, викликані ПЕГ: двовалентні йони, очевидно, утворюють містки між ПЕГ і негативно зарядженими вуглеводами, що є на клітинній поверхні. Відповідно до іншої гіпотези, протопласти зливаються внаслідок дегідратації. Поглинання води індукує утворення пор на поверхні мембрани і відбувається перетікання внутрішньоклітинного матеріалу. Після злиття ділянки з порами певний час зберігаються. Існує два припущення, що пояснюють виникнення пор:

1. За високої концентрації ПЕГ (20...30%) уся вільна вода поглинається ним, викликаючи розриви в мембрані;
2. ПЕГ зменшує полярність води, що викликає перерозподіл полярних і гідрофобних компонентів мембрани, що стабілізують ліпідні шари.
3. З великим успіхом для цих цілей використовується ПЕГ з молекулярною вагою від 1500 до 7500.

Лектини й антитіла – дво- або полівалентні сполуки; їхня аглютинуюча функція пов'язана зі здатністю однієї молекули якоїсь із цих сполук взаємодіяти з рецепторами, що є на поверхні двох клітин, що й приводить до утворення зв'язку між клітинами. Достатня кількість таких молекулярних зв'язків може утримувати клітини разом, перешкоджаючи їхній розбіжності внаслідок броунівського руху або в через електростатичне відштовхування чи активну міграцію клітин.

На другому етапі гликопротеїди, що розташовані на поверхні, починають вивільнятися з ділянок мембрани, що лежать між



віріонами, і притягуються до місць прикріплення вірусних часток. Вуглеводні компоненти – найменш вивчена частина клітинної поверхні. У мембранах вони бувають у вигляді нейтральних цукрів, а також ковалентно зв'язуються з ліпідами або білками. Саме в такому вигляді вони беруть активну участь у багатьох біологічних процесах. Установлено, що гликопротеїди обумовлюють антигенну специфічність клітин, несуть негативний заряд, характерний для клітин при фізіологічно нейтральних рН, беруть участь у розпізнаванні та адгезії клітин, визначають рецепторні ділянки для вірусів, бактерій, агентів, що здатні до аглютинації, приєднуються до процесу регуляції проникності мембран для йонів. Ці властивості й обумовлюють їх участь у злитті клітин.

Вуглеводи перешкоджають злиттю клітин, оскільки розподіляють ліпідні шари мембран, не даючи їм стикатися, тому що на поверхні нормальної клітини рецепторні ділянки розташовані рідко або поодиночі. У результаті трансформації вірусом відбувається їхнє об'єднання в групи. Гликопротеїди мігрують у мембрані до місця адсорбції вірусу, залишаючи вільними сусідні ділянки, де й відбувається злиття клітин. У деяких випадках для видалення вуглеводних груп, що перешкоджають злиттю клітин, беруть участь лізосомні ферменти. При цьому відбувається з'єднання лізосом із плазматичною мембраною і локальне вивільнення глікозидаз. Така лізосомна активність може бути запрограмована (у гаметах, міобластах, макрофагах, тобто клітинах, що зливаються в природних умовах) або викликана експериментально за індукованого злиття клітин.

Третій етап – міцелізація ліпідів, що оголилися, двох протилежних мембран. Міцели – ліпідні краплі, де молекули ліпідів гідрофільними головками звернені до води, а гідрофобні «хвости» жирних кислот заховані усередину. Цей процес посилюється при високих значеннях рН і високої концентрації іонів кальцію. В обох клітинах починається ендоцитоз вірусних часток.

Четвертий етап – злиття мембран. Завдяки місткам, утвореним  $\text{Ca}^{2+}$ , розмір міцел зменшується. Під дією АТФ і  $\text{Ca}^{2+}$  активізуються мікрофіламенти. Цитоплазматичний місток, що виник, стабілізується і розширюється завдяки функціонуванню мікрофіламентів. На останніх етапах злиття клітин важливу роль відіграє наявність АТФ. АТФ утворюється завдяки діяльності мітохондрій. Полікаріони, що створюються при злитті двох або трьох клітин, являють собою не

безформні роздуті або дволопасні кулі цитоплазми, а приймають форму, характерну для однієї з батьківських клітин або проміжну між ними. Форму клітини обумовлюють мікротрубочки і мікрофіламенти. У процесі злиття клітин мікрофіламенти, які розташовані під цитоплазматичною мембраною, беруть безпосередню участь, тому що забезпечують об'єднання цитоплазм клітин, що злилися, і стабілізацію знову утвореної системи. Однак, формування цитоскелету – енергозалежний процес, що вимагає великої кількості АТФ. Можливо, цим обумовлена присутність мітохондрій у місцях злиття клітинних мембран.

#### 4.7. Моноклональні антитіла

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

Багато дослідників намагалися знайти способи отримання антитіл з вузькою специфічністю. У 1975 році Д. Келер і Ц. Мільштейн запропонували принципово новий метод створення гомогенних антитіл. Внаслідок соматичної гібридизації (злиття) мієломних клітин (пухлинних клітин лімфоцитарної системи) і В-лімфоцитів, які продукують антитіла після імунізації тварин відповідним антигеном, було отримано клони гібридних клітин – гібридами, що синтезують моноклональні антитіла (*моноАТ*, або *моноати*).

Передумовою для виникнення методу отримання гібридів, що синтезують моноклональні антитіла, була розробка двох методичних підходів:

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

У мишей досить легко можна отримати мієломи. Ці пухлини є

нащадками однієї клітини (тобто мають моноклональне походження). Пухлини індукують у тварин шляхом внутрішньочеревного введення мінеральних масел або інертного твердого пластика. Однак, необхідні мієломи вдалося отримати лише в двох лініях мишей. Виявилось також, що білки, що продукують мієломні клітини, володіють невідомою антигенною специфічністю і можуть здійснювати негативний вплив на синтез необхідних антитіл. Тому в наш час, як правило, використовують варіанти мієлом, що не здатні створювати власні імуноглобуліни, і вся гібридомна продуктивність спрямована на синтез величезної кількості моноклональних антитіл зі специфічністю, яка цікавить дослідників. Ще однією особливістю мієлом, що використовуються для гібридизації, є відсутність у них ферменту гіпоксантинфосфорибозилтрансферази, який бере участь у синтезі ДНК. Цей фермент забезпечує запасний шлях синтезу аденозинмонофосфату в тому випадку, коли звичайний ланцюг ферментативних реакцій заблокований (наприклад, за присутності інгібітора – аміноптерину). На поживному середовищі, яке містить гіпоксантин, аміноптерин і тимидін (ГАТ-середовище) такі мієломні клітини розмножуватися не здатні. Тобто мієломні клітини є ауксотрофами – клітинами-мутантами, які позбавлені певної ділянки гена, що відповідає за синтез ферменту, необхідного для підтримки процесів життєдіяльності клітини у селективному середовищі. Партнером для злиття з мієломою є імунні лімфоїдні клітини селезінки або лімфовузлів, що самі по собі нежиттєздатні в культурі.

Другою передумовою методу створення гібридом є техніка гібридизації соматичних клітин. Злиття клітин лімфоцитів з мієломами може здійснюватися і спонтанно, однак вихід гібрида зростає в присутності 40...50% розчину поліетиленгліколю (ПЕГ) або в апараті для електрозлиття (рис. 47).

Гібридами відбирають за властивістю розмножуватися на ГАТ-середовищі. Здатність мієломних клітин до швидкого розмноження відновлюється за рахунок додавання клітинам селезінки генів, що відповідають за синтез ДНК по запасному шляху. Селекція на ГАТ-середовищі дозволяє позбавитися мієломних клітин, які не злилися, або злилися одна з одною і відіграє важливу роль через дуже малий вихід процесу гібридизації (один гібрид на 500 тис. клітин селезінки).

Однак, не всі клітини, що ростуть на ГАТ-середовищі, є гібридомами – продуцентами специфічних антитіл. Тому важливим етапом отримання гібридом є відбір клітин, що стабільно синтезують

антитіла до антигену. Засновано цей відбір на визначенні певних антитіл і здійснюється за допомогою імуноферментного аналізу.

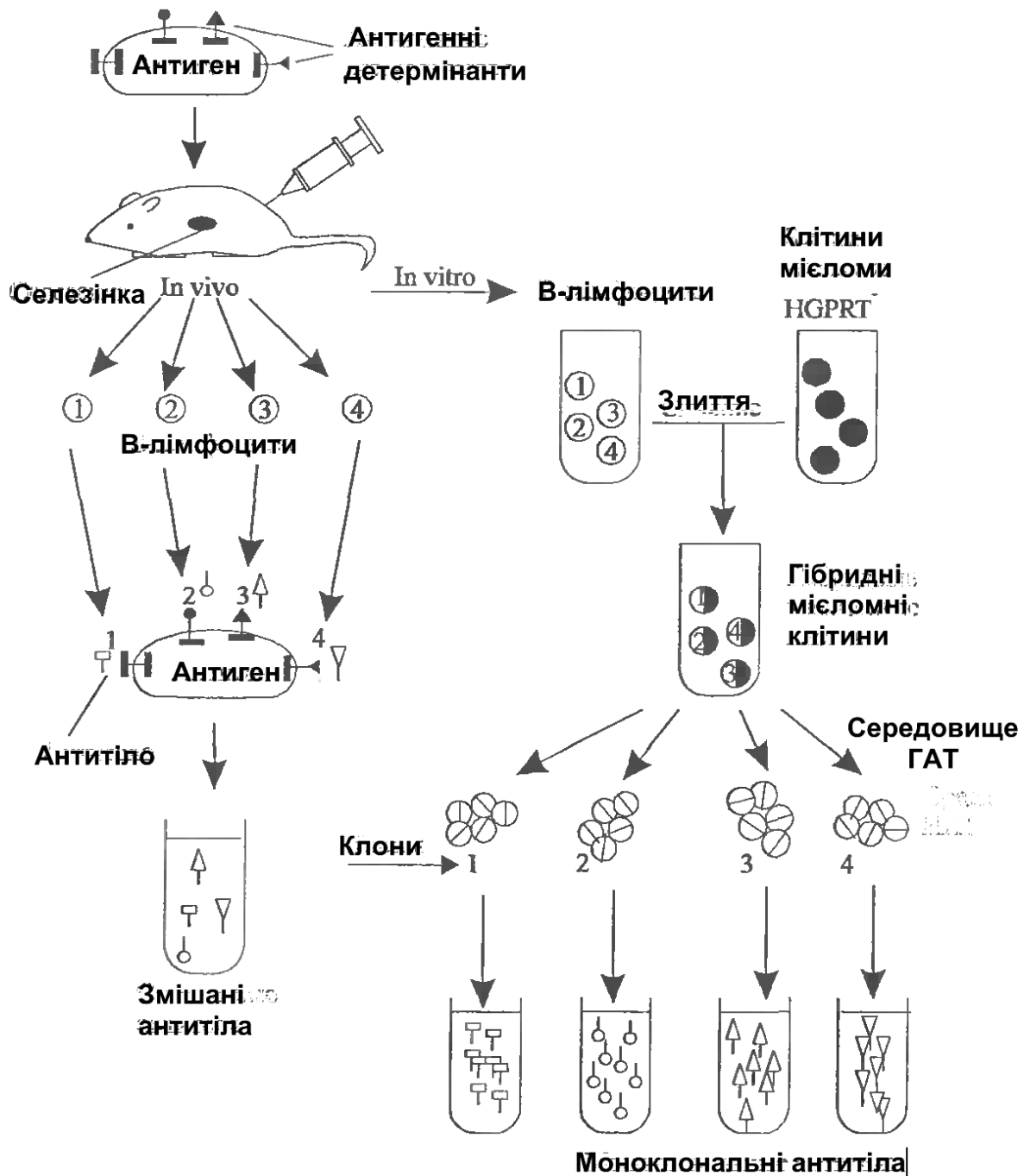


Рис. 47. Схема отримання моноклональних антитіл

Антитіла, що виявлені на цій стадії, не обов'язково є моноклональними. В осередку, де культивуються клітини, може бути виявлено дві і більше гібридом, кожна з яких синтезує власний тип антитіл. Тому наступним етапом після селекції є клонування гібридом, метою якого є розподілення клітин і нарощування окремих клонів з однієї клітини. Важливою особливістю клонування є те, що

воно дозволяє не лише позбавитися від клітин, що втратили здатність синтезувати антитіла, а і відібрати клони необхідної специфічності із стабільними спадковими властивостями.

Гібридами, які вирощують у судинах для культивування, синтезують 5...10 мкг антитіл на 1 мл середовища. За використання спеціальних носіїв кількість антитіл можна збільшити до 100 мкг/мл.

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

Таким чином, *процес отримання гібридом*, що синтезують певні моноклональні антитіла, складається з таких етапів:

1. Імунізація мишей, що відбувається в три (якнайменше) етапи:

- внутрішньочеревне введення антигена з повним ад'ювантом Фрейнда (*ад'юванти* – це сполуки, які при введенні в організм викликають неспецифічне збільшення імунної відповіді і тим самим підвищують здатність організму реагувати на будь-який імуноген). Повний ад'ювант Фрейнда, що дуже широко використовується в наш час для імунізації, складається з суміші мінеральних масел, емульгатора і вбитих мікобактерій (за відсутності бактерій ад'ювант називається неповним);
- повторне введення антигена через 4...5 тижнів з неповним ад'ювантом Фрейнда;
- внутрішньочеревне і внутрішньовенне введення антигена за 3...4 дні до злиття без ад'юванта.

2. Злиття клітин. Селезінку імунізованої миші подрібнюють у гомогенізаторі. У наступному клітини селезінки і мієломні клітини центрифугують і додають розчин ПЕГ, що полегшує процес злиття клітин. До суміші додають ГАТ-середовище і розносять по лунках. Через 7...10 днів відбирають культуральну рідину з кожної лунки і тестують на наявність антитіл.

3. Тестування гібридом. Тестування проводять за допомогою методів імуноферментного аналізу (ІФА), при цьому одночасно визначають ферментативну активність антитіл, що створилися.

4. Клонування гібридом проводять або в напіврідкому агарі, або методом граничних розріджень. Вміст лунок, у яких отримали позитивний результат при тестуванні, оцінюють під мікроскопом для оцінки числа гібридом. У подальшому розріджують до концентрації 3 клітини/мл і розподіляють по лунках. Через 10 днів окремі клони знов

тестують методом ІФА.

5. Нарощування гібридом. Клони, що виявилися позитивними, нарощують, доки вони не займуть 2/3 поверхні лунки 96-лункової плати. Потім їх переносять до лунки 24-лункової плати, а за декілька днів їх об'єднують і пересаджують у 50 мл флакони для культивування. За необхідності клітини можуть бути перенесені в судини для культивування об'ємом 250 мл і більше.

6. Нарощування гібридом у вигляді асцитної рідини. Мишам внутрішньочеревно вводять  $10^6$ ...  $10^7$  клонованих гібридомних клітин у розчині для підтримки їх росту. На 14...21 добу відбирають 4...5 мл асцитної рідини.

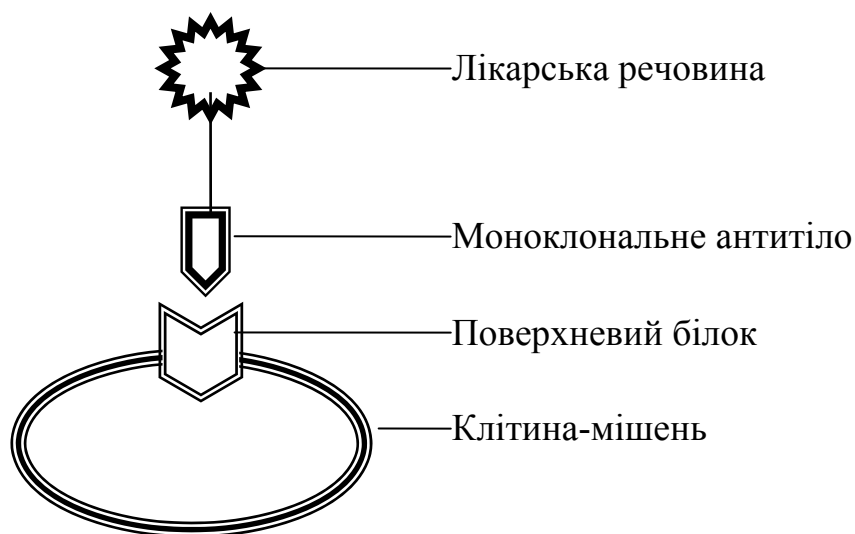
7. Заморожування гібридомних клітин. Заморожування необхідно здійснювати на всіх стадіях отримання гібридом. Швидкість зниження температури  $1^\circ\text{C}$  за 1 хв. Клітини вносять у спеціальні ампули, які розміщують у холодильнику ( $-70^\circ\text{C}$ ), а далі переносять у рідкий азот. Розморожують клітини швидко, поміщають ампули у водяну баню за температури  $37^\circ\text{C}$ . Розморожені клітини розріджують гібридомним середовищем, центрифугують і осад розміщують у лунках плат з розчином для росту клітин.

8. Зберігання моноклональних антитіл. Культуральна рідина з моноклональними антитілами добре зберігається протягом одного року за температури  $4^\circ\text{C}$  у присутності 0,1% азиду натрію. Вона може зберігатися невизначено довго за температури  $-70^\circ\text{C}$ ; при цьому необхідно запобігати повторного заморожування-відтаювання. Асцитна рідина повністю стабільна при зберіганні у стерильному стані за температури  $4^\circ\text{C}$ .

**Лікарські речовини, що пов'язані з моноклональними антитілами.** Часто ліки, які використовують при певних захворюваннях не виявляють необхідної ефективності, що може бути пов'язане з тим, що вони не доходять до органу чи клітини необхідної концентрації. Для полегшення доставки лікарської речовини до місця дії можна приєднувати її молекули до моноклональних антитіл специфічних по відношенню до певних ділянок поверхні визначених клітин, наприклад, пухлинних (рис. 48).

Для цього потрібно, щоб моноклональне антитіло було в необхідній кількості і достатньо очищене, зв'язувалося з високоспецифічним білком клітини-мішені і за необхідності мало здатність проникати в середину пухлини. У цьому разі доза лікарської речовини, що необхідна для лікування, значно

зменшується порівняно з безпосереднім використанням.



**Рис. 48. Схематичне зображення системи цільової доставки лікарської речовини з використанням моноклональних антитіл**

Першою стадією за отримання гібридних моноклональних антитіл, які містять два різних центри для зв'язку з антигенами, один з яких спрямований до певного антигена, а інший – до ферменту або лікарської речовини, є створення звичайної гібридоми, що синтезує моноклональні антитіла. Цю гібридому, яка відіграє роль мієломної клітини, зливають з лімфоцитами, отриманими при імунізації мишей іншим антигеном (ферментом або лікарською речовиною). Внаслідок злиття і відбору створюється вторинна гібридома, що здатна синтезувати антитіла подвійної специфічності.

У наш час головним чином отримують гібридоми, що синтезують моноклональні антитіла миші або пацюка. Однак, їх не завжди можна використовувати з медичною метою. Для отримання ізотипів гібридом людини було випробувано гібридизацію мієлом пацюка з лімфоцитами людини. Однак, практичного значення такі гібридоми не знайшли через генетичну нестабільність.

Ще один підхід полягає у введенні імунних клітин людини мутантним мишам, які практично позбавлені власної імунної системи. Після трансплантації імунних стовбурових клітин людини цим мишам, вони набувають клітини імунної системи людини і у відповідь на введення антигена можуть виробляти антитіла людини.

Також спробували ввести до зародка мишей гени імуноглобулінів людини з метою створення трансгенних мишей, які у

відповідь на імунізацію певним антигеном будуть здатні виробляти імуноглобуліни людини. Для отримання від трансгенних тварин клітин, що синтезують специфічні моноклональні антитіла, можна використовувати стандартну гібридомну технологію, потім провести скринінг (тотальний відбір) позитивних клітинних ліній і визначити тих, що створюють антитіла та кодуються генами імуноглобулінів людини.

Однак, усі ці методи дуже складні і моноклональні тіла, що створюються незначною кількістю, дуже дорогі, що не дозволяє широко використовувати їх у лікуванні. Для вирішення цієї проблеми була спроба створити так звані біореактори на основі генетично модифікованих бактерій, рослин і тварин.

Методика отримання функціональних антитіл за допомогою *E. coli* така:

1. На підставі мРНК, що виділена з клітини В-лімфоциту миші або людини, синтезують кДНК. Необхідно враховувати, що молекула антитіла (імуноглобуліну) складається з двох легких (L) і двох важких (H) білкових ланцюгів, які з'єднані водневими зв'язками. Кінцеві ділянки L- і H-ланцюгів створюють антигензв'язуючий сайт. Окремі домени (частини) молекули антитіла виконують різні функції, що спрощує маніпуляції з генами антитіл.
2. Проводять окрему ампліфікацію (множення) кДНК, що кодує H- і L-ланцюги.
3. Ампліфіковані кДНК обробляють специфічними рестриказами і вбудовують у вектор на основі бактеріофага  $\lambda$ . Оскільки кДНК H- і L-ланцюгів містять різні сайти рестрикції, кожна нуклеотидна послідовність вбудовується у власний вектор. На цьому етапі також здійснюється клонування багатьох різних сегментів H- і L-ланцюгів.
4. кДНК H- і L-ланцюги об'єднують в одному комбінаторному векторі при цьому створюється широкий спектр генів різних антитіл (за рахунок комбінацій різних ділянок). Пул антитіл ссавців включає  $10^6 \dots 10^8$  різних антитіл. Бібліотека на основі комбінаторного вектора або комбінаторна бібліотека містить майже таку ж кількість клонів, тобто можна очікувати, що вона вироблятиме таку ж кількість різних антитіл.
5. Скринінг клітин для виявлення антигензв'язуючої активності антитіл.



6. Вектор, що містить кДНК Н- і L-ланцюгів уводять у клітину *E. coli*.
7. Виділення моноклональних антитіл із клітин *E. coli*.

**Застосування моноклональних антитіл.** Найбільш широко використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Якщо до антитіл приєднати радіоактивні або магнітоактивні матеріали й ввести їх у живий організм, то можна виявити в ньому патологічні зони. Такі моноанти приєднуються до уражених хворобою клітин організму, а відповідні індикаторні матеріали дозволяють з'ясувати їхнє місцезнаходження.

Моноанти використовуються й у процесах очищення речовин. Сучасні технології засновані на приєднанні антитіл до твердої матриці носія. До них додають суміш молекул, що містить антиген, який шукають. Потім комплекси антиген-антитіло відмиваються від домішок, не пов'язаних з матрицею. Після руйнування ковалентних зв'язків антиген-антитіло в розчині залишаються вільні антигени.

Якщо отримати антитіла певного типу й імунізувати ними тварину, то утворюються анти-антитіла (анти-ідіотипні антитіла). Вони діють на імунну систему як псевдоантиген і тому можуть бути використані для її стимуляції. На цьому принципі засновано одержання вакцин нового типу. Набори моноантів можуть бути також призначені для боротьби з алергенами.

Моноклональні антитіла застосовуються у медичній терапії для знайдення «мішені». Припускається, що різні ракові захворювання обумовлені активацією ендогенних генів, які викликані хімічними агентами, внутрішніми хромосомними перебудовами. Ці гени кодують певні білки, і тому ракові клітини можуть містити унікальні білки на поверхні клітини. Можливо, саме ці білки беруть участь у супресії росту здорових клітин. Інактивуючи ці білки, можна гальмувати ріст ракових клітин.

Завдяки високій специфічності моноанти широко використовуються як зонди для точного визначення природи молекул поверхні клітин і клітинних органел. З їхньою допомогою також можна проводити детекцію активності ферментів.

Метод молекулярної гібридизації (ММГ) – заснований на принципі взаємодії вірусних геномів з комплементарними до них ділянками ДНК, які помічені радіоізотопами або ферментами, чи фарбами. Для визначення структури вірусних геномів використовують моноанти. Певне антитіло здатне зв'язуватися з

певною антигенною детермінантою або певною речовиною, що синтезує вірус. Знаючи структуру антитіла можна з'ясувати структуру антигена і на підставі цього визначити ділянку гена, що відповідає за синтез антигена. Ділянку ДНК гена, що було визначено, можливо синтезувати або виділити з генома вірусу і використовувати для проведення досліджень.

Поряд з безсумнівними перевагами моноклональні антитіла мають і недоліки. Вони нестабільні за зберігання у висушеному вигляді, в той час як суміш звичайних (поліклональних) антитіл завжди містить групу антитіл стійких при обраних умовах. Моноклональні антитіла часто мають надто низьку спорідненість до антигена і надмірно вузьку специфічність, що не дозволяє їх використання проти мінливих антигенів, які характерні для інфекційних агентів і пухлинних клітин. Тому одним із завдань біотехнології є розробка методів, засобів, прийомів клітинної інженерії, що будуть сприяти створенню нових форм продуцентів або формуванню принципово нових способів їх культивування.

### ***Контрольні запитання***

1. Яку тканину краще брати для введення до культури, дорослу або ембріональну, нормальну або пухлинну?
2. У чому полягає значення процесу пасирування клітин за вирощування в культурі?
3. Які фактори впливають на процес розподілу в культурі?
4. Про що свідчить поняття «межа Хейфліка»? Чим пояснюється виникнення цієї межі?
5. У чому різниця між двома системами культивування клітин?
6. У чому полягає особливість клітин-ауксотрофів?
7. Які речовини використовують для індукції злиття клітин?
8. Які відбуваються етапи в процесі злиття клітин?
9. З яких етапів складається процес отримання гібридом?
10. Яким чином створюють вторинні гібридами? В чому полягає особливість продуктів вторинної гібридами?
11. Вкажіть напрями застосування моноклональних антитіл.

## РОЗДІЛ 5

# БІОТЕХНОЛОГІЯ В СЕЛЕКЦІЇ ТА ВІДТВОРЕННІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Система великомасштабної селекції в скотарстві, теоретичною основою якої є генетика популяції, заснована на принципах точної генетичної оцінки тварин і широкого використання (завдяки штучному заплідненню) генетично цінних плідників. Найточніший метод оцінки генотипу бугаїв – їх оцінка за якістю потомства.

Слід зазначити, що природні популяції організмів є генетично гетерогенними, тобто складаються із особин різного генотипу, внаслідок існуючого в таких популяціях множинного алелізму і постійного виникнення нових (в основному рецесивних) алелів генів завдяки мутаційному процесу. Внаслідок природного відбору виживають організми, які через особливості своїх генотипів найбільш пристосовані до умов навколишнього середовища і мають найбільшу кількість нащадків. Штучний відбір – здійснюється людиною з метою отримання нових сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. При цьому людина може відібрати необхідні генотипи за значно коротший час, обмежити або уникнути випадкового схрещування, штучно збільшити мутаційну мінливість. Популяції сільськогосподарських тварин є штучними. Вони створюються за використання тварин з переважним генотипом для отримання в конкретних умовах інший тип з певними параметрами господарських ознак і селекційно-генетичних характеристик. Поняття тип в даному формулюванні має цілий спектр показників: екстер'єр, конституція, напрям продуктивності (молочний, м'ясо-молочний, м'ясний), пристосованість до певної технології, стресостійкість, плодючість, резистентність до захворювань.

Кожна категорія тварин робить різний генетичний внесок у прогрес популяції. Для розрахунку генетичного внеску тієї або іншої категорії тварин визначають такі параметри генетичного прогресу, як інтенсивність відбору, генетичну мінливість, точність оцінки племінної цінності та інтервал між генераціями. Згідно з дослідженнями різних авторів категорії племінних тварин роблять такий внесок у генетичний прогрес популяції: батьки плідників –

близько 40%, матері бугаїв – до 40%, батьки корів – до 20% і матері корів – до 10%. Таким чином, найбільший генетичний внесок у селекційний процес вносять батьки бугаїв, найменший – матері корів. Це пов'язано з тим, що штучне осіменіння і довготривале зберігання сперми дозволяють точніше визначати племінну цінність бугаїв і проводити їх інтенсивний відбір. Отже, для підвищення генетичного прогресу вирішальне значення мають оцінка і відбір бугаїв із подальшим їх використанням. А від однієї корови у середньому можна одержати 2...3 телички і 2...3 бугайці, які народжуються в різні роки і від різних батьків. При цьому точно визначити племінну цінність корів практично неможливо.

## 5.1. Трансплантація ембріонів

Основним методом удосконалення існуючих порід великої рогатої худоби є штучне осіменіння корів з використання спермопродукції високопродуктивних бугаїв. Прискорення процесу тиражування корів з високими параметрами продуктивності забезпечує біотехнологічний метод **трансплантації ембріонів** (ТЕ). Суть методу полягає в тому, що генетично видатні самки звільняються від необхідності виношування плоду і вигодовування потомства. Крім того, їм проводять гормональну стимуляцію з метою збільшення виходу яйцеклітин, потім вилучають сформовані зародки на ранніх стадіях і пересаджують менш цінним у генетичному відношенні реципієнтам.

На основі цього методу в селекційно-племінній роботі з великою рогатою худобою відкриваються можливості прискореного розмноження генетично цінних тварин за материнською лінією. Метод ТЕ часто має назву *МОЕТ* – (англ. *multiple ovulation and embryo transfer*), що означає індукцію суперовуляції у тварин, штучне осіменіння тварин, вилучення ембріонів, їх оцінка і трансплантація реципієнтам.

Відомо, що на відміну від плідників, коли завдяки штучному осіменінню можна одержати десятки тисяч його нащадків, від корів за традиційними способами відтворення одержують у середньому лише 3...8 телят. Яєчник телиць і корів містить велику кількість ооцитів (120...200 тис.). Таким чином, можливості розмноження самок з цінним генотипом у скотарстві вельми обмежені.

### 5.1.1. Значення трансплантації ембріонів

Традиційні селекційні програми базуються на використанні методу штучного осіменіння, за якого інтенсивність селекції в основному визначається за рахунок батьків бугаїв і матерів бугаїв. У селекційному процесі застосовується метод *МОЕТ*, коли одну корову-донора використовують протягом року п'ять разів, кількість одержаних від різних донорів ембріонів широко варіює, але в середньому становить близько 25 придатних для пересадки ембріонів за рік від одного донора за середньої приживлюваності свіжовилучених зародків на рівні 60...70%, а заморожених-розморожених – на рівні 50%. Цей метод дозволяє точніше визначити племінну цінність корів, забезпечує прискорене розмноження тваринних цінних генотипів, зокрема бугаїв-поліпшувачів, більш ніж в 10 разів підвищує інтенсивність великомасштабної селекції, сприяє збільшенню темпів генетичного прогресу за рахунок ефективнішого відбору матерів корів, а також підвищує ефективність відбору матерів бугаїв. ТЕ збільшує роль родин у формуванні структури породи і має важливе значення для відбору кращих «бугайвідтворних» корів.

Генетичний прогрес за рахунок застосування трансплантації ембріонів очікується у тому разі, коли від однієї корови-донора одержано 10 телят на рік. Під час ТЕ для отримання наступного материнського покоління можливо з популяції відібрати лише 10% кращих корів, у той час як за традиційних способів відтворення і селекції матерями наступного покоління є 90% корів. Скорочення частки матерів з 90 до 10% в результаті використання ТЕ можливе за умови щорічного отримання 10 телят від кожної корови-донора.

ТЕ дає можливість не тільки збільшити інтенсивність селекції серед корів, але і точніше оцінити племінну цінність бугаїв, також підвищити генетичний прогрес у популяції за рахунок скорочення інтервалу між генераціями. Зокрема, за використання ТЕ можливий перехід на більш раннє оцінювання бугаїв і корів за племінними якостями. При цьому рекомендовано проводити оцінювання за сибсами та напівсибсами. Перевага цього оцінювання полягає в тому, що воно скорочує тривалість випробування, а за наявності великої кількості сибсів (при ТЕ коли корову-донора осіменяти спермою одного і того ж бугая) і напівсибсів її точність може бути цілком задовільною. Крім того, система *МОЕТ* дозволяє скоротити інтервал між генераціями з 7-ми до 4-х років. Вся племінна робота при цьому

проводиться в одному стаді, що має назву селекційне ядро, яке формується з кращих корів.

Також ТЕ у поєднанні з методами кріоконсервування ембріонів дозволяє без особливих витрат зберігати генетичні ресурси аборигенних і зникаючих порід великої рогатої худоби шляхом створення ембріобанків (для збереження генофонду локальних порід у банк закладають не менше 1000 спермодоз від п'яти бугаїв кожної лінії і створюють запас ембріонів як мінімум від 25 неспоріднених між собою бугаїв і 150...200 корів). Життєздатність ембріонів, що зберігаються в ембріобанку, повинна забезпечити одержання не менше 10 нащадків від кожного плідника. Вважається, що для відновлення породи достатньо мати 150...200 заморожених ембріонів. Перевага збереження генетичних ресурсів шляхом заморожування ембріонів, порівняно із заморожуванням сперми, полягає у тому, що у разі потреби протягом однієї генерації можна відновити необхідне поголів'я чистопорідних тварин, оскільки ембріони містять у собі гени обох батьків. Як реципієнтів при цьому можна використовувати тварин будь-якої породи.

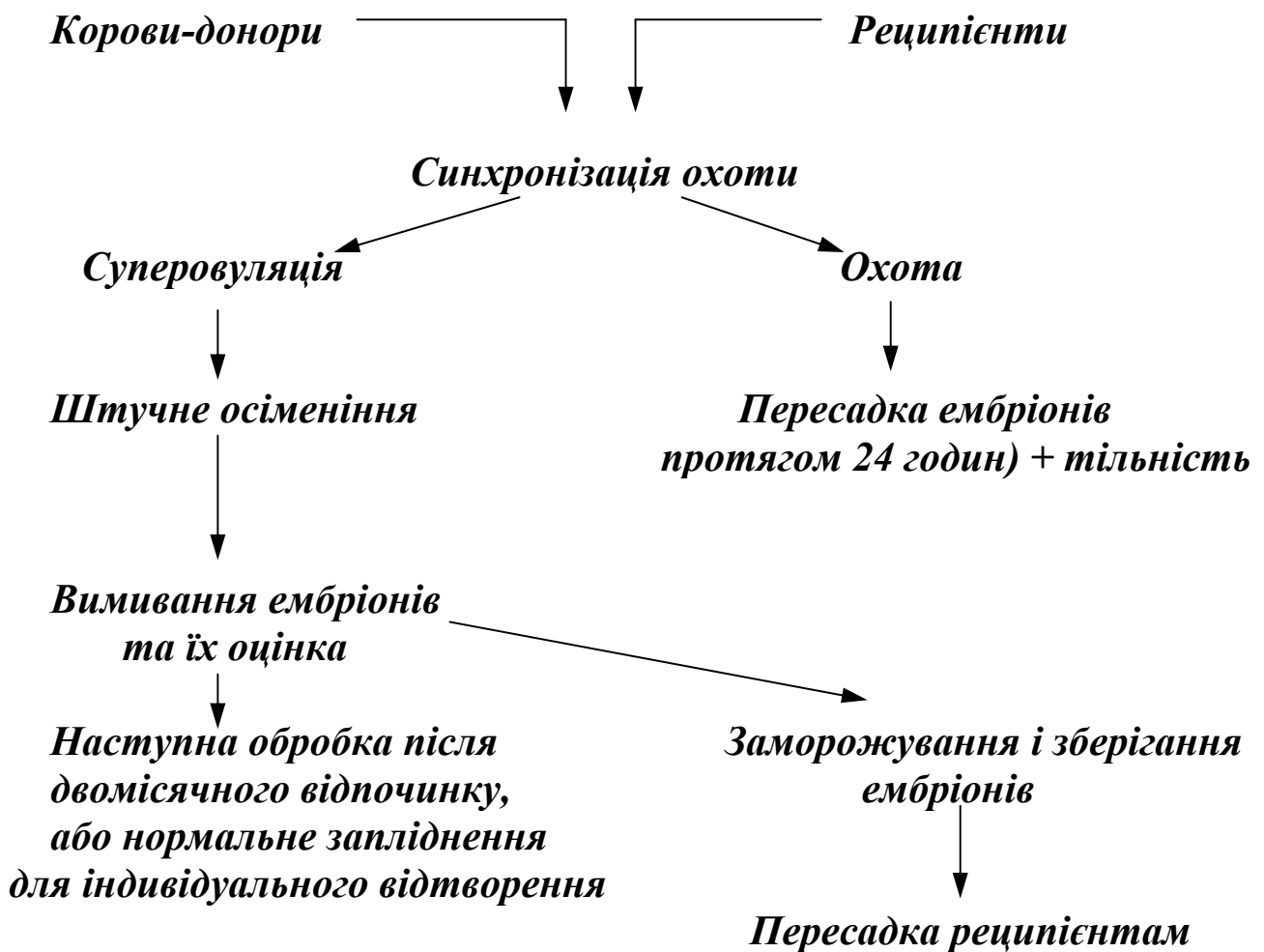
Крім того, ТЕ дозволяє уникнути значних витрат на закупівлю, транспортування і акліматизацію закупленого поголів'я, знизити рівень карантинних ветеринарних вимог за експорту-імпорту (збудники багатьох захворювань не проникають через прозору оболонку ембріонів, тобто не передаються від матері ембріону), обробка ембріонів розчинами антибіотиків і (або) розчином 0,25-процентного трипсину запобігає розповсюдженню інфекції.

### **5.1.2. Критерії відбору корів-донорів та реципієнтів ембріонів**

Основні етапи проведення трансплантації ембріонів з метою одержання найбільшої кількості нащадків від однієї тварини такі: підбір донорів статевих клітин, суперовуляції, виймання і оцінка ембріонів, культивування та зберігання ембріонів, пересадка ембріонів реципієнтам (рис. 49).

У селекційних програмах відбору *корів-донорів* надається величезне значення. У більшості випадків як корів-донорів відбирають матерів потенційних племінних бугаїв. У групу донорів вводять кращих корів племінних стад із відомим походженням. Метод ТЕ базується на використанні корів-донорів із високою

молочною продуктивністю (не менше 7000 кг молока за лактацію). Разом із молочною продуктивністю для відбору донорів залежно від породи встановлюють мінімальні вимоги за іншими селекційними ознаками – вміст жиру і білка в молоці, придатність корів для машинного доїння, конституція і екстер'єр. Переважний вік донора до 7...8 років та 2...4 лактації. У більш старшому віці знижується вихід життєздатних ембріонів. Корів із високим надоєм для вимивання ембріонів доцільно використовувати через 2...3 місяці після отелення та після проходження у корови не менш 2-х естральних циклів.



*Рис. 49. Схема трансплантації ембріонів*

Великі витрати на отримання телят методом ТЕ обумовлюють необхідність відбору таких донорів, від яких можливо регулярно одержувати велику кількість ембріонів. При цьому перевага надається коровам, що зберегли протягом трьох отелень стабільну відтворну здатність.

Більшість фахівців вважає, що основним показником відтворювальної здатності корів є міжотельний період. Якщо виходити із загальноприйнятого положення, що від корови потрібно одержати одне теля на рік, то міжотельний період у середньому не повинен перевищувати 365 днів. Отже, отримання від кожної корови одного теляти за 365 днів є основним показником її відтворювальної здатності. Період між отеленнями має два показники – сервіс-період і період тільності. Сервіс-період точніше і набагато раніше, ніж інтервал між отеленнями, виявляє потенційні можливості відтворювальної функції корів. Він високо корелює з міжотельним періодом (коефіцієнт кореляції – 0,9). Якщо виходити з того, що тривалість тільності у корів у середньому становить 285 днів, отже оптимальний сервіс-період не повинен бути більше 80 днів (краще за все 60 днів). У цей період корова має бути запліднена. Такий сервіс-період дозволяє одержувати від корови по одному теляті на рік. Сервіс-період в основному залежить від інтервалу між отеленням і першим заплідненням корови.

Період від отелення до першого запліднення визначається біологічними і господарськими чинниками. З біологічної точки зору цей період залежить головним чином від інволюції матки і відновлення у корів естрального циклу (тічка і охота починаються у корів через 21...30 днів після отелення). Термін завершення інволюції матки коливається в межах 26...52 дні. В той же час перша овуляція у молочних корів спостерігається значно раніше – з 10-ї доби після отелення. Проте, за ранніх термінів овуляції в 50% випадків вона проходить без помітних симптомів статевої охоти. За хороших умов годівлі гінекологічно здорових корів можна запліднювати в перший місяць після нормального отелення. Проте високопродуктивних корів доцільно запліднення через два місяці через нечіткий прояв першої статевої охоти після отелення.

Для оцінювання відтворювальної здатності корів, відібраних як потенційних донорів, необхідно аналізувати їх оплодотворення від першого осіменіння. За правильної техніки штучного осіменіння і своєчасного визначення статевої охоти заплідненість корів від першого осіменіння має бути в середньому 60%. Індекс осіменіння, тобто кількість запліднень на одне осіменіння, також є важливим показником відтворювальної здатності. Низька заплідненість корів від першого осіменіння вказує на погану відтворювальну здатність. Індекс запліднення характеризується високим ступенем мінливості –



коефіцієнт варіабельності може досягати 70%. Істотний вплив на мінливість індексу запліднення може мати тривалість періоду від отелення до першого запліднення, своєчасне виявлення корів у охоті. Індекс осіменіння корів, виділених в групу потенційних донорів, не повинен перевищувати 1,5 (тобто 2 запліднення на 3 осіменіння).

У корів-донорів при останньому отеленні не повинно бути ускладнень (важке отелення, затримання посліду, післяродові захворювання статевих органів). Корови з аномальним статевим циклом, кістами яєчників, персистентними жовтими тілами до використання як донори непридатні. У зв'язку з високою індивідуальною чутливістю до гонадотропінів за гормональної індукції суперовуляції первинна кількість корів-донорів повинна перевищувати потребу в них на 2...3 рази. Остаточний відбір проводять після встановлення реакції корів на гормональні препарати. У виборі донора беруть участь ветеринарні фахівці. На кожную тварину оформляють ветеринарне свідоцтво з вказівкою клінічного стану здоров'я.

Як *реципієнтів* можна використовувати корів та телиць, але перевага надається телицям. Реципієнтами є менш цінні в племінному відношенні тварини. Вони мають бути клінічно здорові, з нормальною фізіологією статевої системи, без патології родових шляхів, мати міцну конституцію. Корови-реципієнти повинні бути не старші 7...8 років, клінічно здорові без ознак порушення обміну речовин, щорічно мати теля, отелення без ускладнень, добре виражену охоту. Телиці-реципієнти повинні мати нормально розвинені і добре функціонуючі органи відтворення, мінімальний вік телиць – 16...18 міс., жива маса – не менше 350...380 кг. За відбору тварин-реципієнтів методом ректального дослідження оцінюють функціональний стан яєчників (наявність фолікулів, жовтих тілець, розміри яєчників). Тварин з патологією яєчників у групу реципієнтів не вводять. Складаючи план пересадок ембріонів слід враховувати вірогідність вибраковування 20...25% тварин-реципієнтів через непридатність до відтворення.

Звичайно для одного дня роботи підбирають невелику групу корів-донорів (2...4 тварини), що пов'язано з можливістю проведення вимивання і пересадки впродовж одного дня (тобто пересадка свіжоодержаних ембріонів). Крім того, кількість підібраних на один день донорів пов'язана з кількістю підготовлених реципієнтів. Реципієнтів необхідно готувати з розрахунку не менше трьох тварин

на одного донора.

### 5.1.3. Стимулювання суперовуляції

Самки ссавців народжуються з великим (кілька десятків і навіть сотень тисяч) числом статевих клітин. Більшість з них поступово гинуть у результаті атрезії фолікулів. Однак, практично всі фолікули, що ростуть, реагують на гонадотропну стимуляцію, яка створює умови для їх дозрівання. Обробка самок гонадотропінами у фолікулярній фазі статевого циклу або в лютеальній фазі циклу в поєднанні з індукуванням регресії жовтого тіла простагландином викликає численну овуляцію або так звану *суперовуляцію*.

Суперовуляцію у корів-донорів викликають ін'єкцією гонадотропіну в поєднанні з простагландином й іншими біологічно активними речовинами. Час введення гонадотропних гормонів істотно впливає на рівень суперовуляції у корів. Ін'єкцію гормонів розпочинають з 8 по 14 день статевого циклу (залежно від виду препарату гонадотропіну і вибраної схеми). Зазвичай це проводять з 10 по 12 день естрального циклу, тобто в лютеальній фазі циклу (в період, коли найбільш виражена функція жовтого тіла). Введення в цей період екзогенних гонадотропінів викликає посилений ріст фолікулів. Через дві доби вводять простагландин і триразово осіменяють корову-донора з інтервалом у 12 годин. Ембріони вимивають на 7...8 добу після 1-го осіменіння.

У день початку обробки гонадотропіном досліджують стан яєчників ректальним способом, визначають розміри яєчників (наприклад, 2,5×3,0 см лівий яєчник і 1,5×2,0 см правий яєчник), якість жовтого тіла (відмінна, добра, задовільна, незадовільна); до моменту обробки гонадотропіном в яєчниках тварини має бути функціонуюче жовте тіло діаметром близько 1,5 см.

Для гормональної обробки корів використовують в основному два типи гонадотропінів – ліофілізований гонадотропін сироватки жеребних кобил (ГСЖК) і фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), який найчастіше одержують із гіпофізу свиней. ГСЖК одержують із сироватки крові кобил у період від 40-го до 100-го дня жеребності. У цей період у крові кобил присутні високі концентрації гонадотропінів. У перший місяць жеребності виявлено високу гонадотропну активність гіпофізу і недостатню активність жовтого тіла, а трохи пізніше в матці утворюються ендометріальні чаші –

тимчасові ендокринні залози, які секретують і виділяють у кров гонадотропіни, що викликають ріст і розвиток великих фолікулів. Після овуляції на їх місці утворюються жовті тіла, що виділяють додаткові кількості прогестерону.

Співвідношення ФСГ і ЛГ (лютеїнізуючий гормон) в ГСЖК впливає на ефективність суперстимуляції. Наприклад, за співвідношення ФСГ:ЛГ 1,3:1,0 ін'єкція ГСЖК коровам викликає дозрівання приблизно 6 фолікулів і овуляцію 4 яйцеклітин. Застосовується і комплексний препарат ФСГ і ЛГ (співвідношення 5:1), результати такої стимуляції значно ефективніші за рівнем суперовуляції. ГСЖК має тривалий (до 5 діб) період напіврозпаду в організмі тварини, тому перевагою його використання є виконання лише однієї ін'єкції для появи суперовуляції. Це дозволяє знизити витрати праці і зменшити стресову дію на тварин. Активність ГСЖК позначається в інтернаціональних (ІЕ, ІУ) або мишиних (м.е., т.и.) одиницях дії. Одна ІЕ еквівалентна близько 2,33...2,43 м.е. Звичайна доза ГСЖК, що вводиться одноразово внутрішньом'язово, становить 2500...3000 ІЕ. Але недолік застосування ГСЖК пов'язаний з тим, що великі його дози можуть викликати кісти яєчників. Кіста яєчника являє собою порожнину із серозним або слизистим вмістом і утворюється із фолікулів, які не розірвалися в результаті переродження і скупчення в них рідини. Такі кісти називають фолікулярними. Причини виникнення кіст в яєчниках пов'язані з невідповідним годуванням, відсутністю моціону, запальними процесами в матці та ін. Кіста яєчника порушує його функцію і тому виникають перегули. Кісти при лікуванні можна роздавлювати пальцями, масажуючи яєчники через пряму кишку. Проте кісти часто після роздавлювання регенерують і тому їх доводиться роздавлювати кілька разів.

ГСЖК вводять на 8...13 день циклу, найкраще на 10...12 день, тобто в середині циклу, коли найбільш висока активність жовтого тіла яєчника для упередження передчасної овуляції через утворення великої кількості естрогену в дозріваючих фолікулах. Простагландин F<sub>2α</sub> вводять внутрішньом'язово дозою 500 мкг (2 мл препарату Естрофан – лютеолітичний аналог простагландину) за 48 годин після введення ГСЖК. Охота у корів настає за 48 годин після введення Естрофану.

Для викликання суперовуляції у корів застосовують декілька схем гормональної обробки. Найчастіше застосовують таку: з метою

підвищення виходу ембріонів тваринам-донорам на початку прояву охоти внутрішньом'язово ін'єктують вітаміни А і Е. Також, одночасно з кормом, один раз на добу протягом 18...25 днів дають йодний калій дозою 100...200 мг на одну голову. Під час уведення гонадотропіну додатково ін'єктують половину дози вітамінів А і Е (табл. 6).

Таблиця 6

**Схема обробки корів для викликання суперовуляції**

День естрального циклу	Назва препарату	Доза
2	Вітамін А Вітамін Е Йодний калій	150000 м.о. 100 мг 100...200 мг
10...12	ГСЖК Вітамін А Вітамін Е	2500...3000 ІЕ 75000 м.о. 50 мг
12...14	Простагландин клопростенола або ПГФ <sub>2α</sub>	500 мкг 30 мг
14...16	Охота і осіменіння	
21...23	Нехірургічне вимивання ембріонів	

Недоліком застосування ГСЖК є важкість підбору точної дози цього препарату. За введення підвищених доз може відбутися кістозне переродження яєчників. Крім того, введення ГСЖК часто призводить до прояву небажаних імунних реакцій, які супроводжуються утворенням антитіл. У цьому разі повторні обробки ГСЖК безрезультатні протягом 60 днів через тривалу дію ГСЖК. Для нейтралізації надлишків сироваткового гонадотропіну, підвищення заплідненості яйцеклітин і якості ембріонів рекомендують застосовувати антисироватку до ГСЖК. Її вводять внутрішньом'язово через 24 години після початку прояву охоти і після другого осіменіння дозою 1...2 мл залежно від кількості ГСЖК, для забезпечення нейтралізації не менше однієї третини вживаної дози ГСЖК. Більш раннє введення антисироватки призводить до зниження реакції яєчників на ГСЖК у корів-донорів.

За використання ГСЖК і антисироватки стабільні результати одержують при двох повторних обробках тварин. Подальші обробки по цій схемі рівень суперовуляції не знижують, проте зменшують кількість реагуючих на суперстимуляцію тварин (до 50% за третьої

обробки) і вихід ембріонів хорошої якості.

ФСГ одержують із гіпофізу тварин, найчастіше свиней. ФСГ має нетривалий період напіврозпаду (до 6 год.). Тому його вводять в організм протягом 4...5 днів уранці і увечері з інтервалом між ін'єкціями 12 год. Введення препаратів ФСГ разом з простагландином F<sub>2α</sub> має переваги перед ГСЖК. По-перше, він забезпечує більший вихід повноцінних ембріонів. ФСГ також знижує відмінності в результатах реакції яєчників окремих корів, дає стабільніші результати. На відміну від ГСЖК за використання ФСГ методику обробки можна стандартизувати (у разі застосування ГСЖК співвідношення в ньому ФСГ і ЛГ коливається залежно від серії). Крім того, препарати ФСГ, на відміну від ГСЖК, не викликають імунної реакції та вироблення антитіл і не спричиняють кістозних змін в яєчниках. Добре зарекомендували себе препарати «ФСГ-П» («FSH-P», США), «Фолікотропін» (*Sprofa*, Чехія), «ФСГ-супер» (м. Боровськ, Росія).

Застосовують різні схеми введення ФСГ. Найбільшого поширення набули схеми (табл. 7) з щоденним зменшенням кількості введеного препарату (хоча застосовуються схеми і з однаковою кількістю гормону), при загальній дозі від 32 до 50 мг ФСГ. Ін'єкції ФСГ починають на 8...10 день естрального циклу. Кращі результати одержують за введення ФСГ, починаючи з 10 дня циклу.

Таблиця 7

#### Схема введення ФСГ коровам-донорам ембріонів

День естрального циклу	Назва препарату	Доза
8...10	ФСГ-Р	12 мг/15 мг
9...11	ФСГ-Р	10 мг/12 мг
10...12	ФСГ-Р Простагландин F <sub>2α</sub> клопростенола або ПГF <sub>2α</sub>	6 мг/10 мг 500мкг 30 мг
11...13	ФСГ-Р	5 мг
12...14	Охота і осіменіння	
19...21	Нехірургічне вимивання ембріонів	
	<b>Усього ФСГ</b>	32 мг/42 мг

ФСГ вводять внутрішньом'язово в область крижів. Залишок розведеного ФСГ заморожують і зберігають до наступної обробки.

Допускається лише одноразове заморожування. Зберігання розчиненого ФСГ в холодильнику за температури +5°C допускається в межах 12 годин, після чого його активність знижується.

Недоліком ФСГ є необхідність багатократних ін'єкцій. У зв'язку з цим розроблявся спеціальний препарат Пролонгон, який продовжував би дію ФСГ і зробив можливим його одноразову ін'єкцію. Проте, цей препарат поступається за своєю ефективністю багатократному введенню ФСГ і не набув широкого розповсюдження в практиці трансплантації.

#### **5.1.4. Синхронізація охоти у донорів і реципієнтів**

У день прояву охоти у донорів повинні проявляти її і тварини-реципієнти, з розрахунку 3...5 реципієнтів на одного донора. Встановлено, що для досягнення найбільшого рівня приживлення ембріонів після трансплантації реципієнтам у день прояву охоти донорів повинні бути в охоті і відібрані телиці-реципієнти. Відомо, що у реципієнтів, які знаходяться в день осіменіння донора в спонтанній охоті, приживлення ембріонів вище. Таких тварин зазвичай є недостатньо, навіть при невеликих обсягах запланованої ТЕ за один прийом.

Способи синхронізації статевої охоти і овуляції у тварин ґрунтуються на двох підходах. Перший підхід до синхронізації охоти заснований на гальмуванні розвитку фолікулів у період штучного подовження лютеальної фази циклу до такої тривалості, доки не відбудеться регресія жовтого тіла у всіх оброблених тварин. Припинення впливу затримуючого фармакологічного агента супроводжується ростом і розвитком фолікулів у всіх тварин і приводить їх одночасно у фолікулярну фазу циклу з наступним синхронним проявом охоти і овуляції. Більшість способів синхронізації охоти, заснованих на цьому підході, базується на використанні прогестерону або його синтетичних аналогів – прогестагенів. Уведення останніх протягом декількох діб забезпечує прояв статевої охоти одночасно у всіх тварин незалежно від того, в якій фазі циклу вони були на початок обробки.

Другий підхід полягає у видаленні або припиненні функції жовтого тіла. Внаслідок цього всі тварини відповідної групи входять у фолікулярну фазу статевого циклу в один той же час і таким чином у них одночасно настає охота. Для здійснення цього широко

використовується так званий лютеолітичний фактор простагландин  $F_{2\alpha}$  (ПГФ-2 $\alpha$ ) або його синтетичні аналоги (Естрофан, Ензапрост, Ремофан, Еструмат). Готуючись до синхронізації, необхідно розрахувати тривалість обробок так, щоб день першого осіменіння донора збігався з днем охоти у реципієнта.

Розглянемо синхронізацію охоти із застосуванням Естрофану. Естрофан – синтетичний аналог ПГФ $_{2\alpha}$ , лютеолітичний препарат. Він містить 0,25 мкг клопростенолу у вигляді натрієвої солі в 1 мл розчину.

Уведення препарату сприяє розсмоктуванню (інволюції) жовтого тіла і створює таким чином передумови для статевої охоти і овуляції. Термін від введення препарату до появи перших ознак статевої охоти – 48...60 годин. Слід зазначити, що введення ПГФ $_{2\alpha}$  не має лютеолітичного впливу на свіжоутворене жовте тільце.

За невідомого стану статевого циклу корів і телиць 2 мл Естрофану ін'єктують двічі з інтервалом 10 днів (табл. 8). Перша доза вводиться в будь-яку фазу статевого циклу (у корів в період з 40 по 60 день після отелення). Тварини, які перебувають між 5 і 16 днями циклу реагують на першу ін'єкцію Естрофану. На 11 день після першого введення слід ввести другу дозу як тваринам, що прийшли в охоту після першої ін'єкції, так й тим, які не були чутливими.

*Таблиця 8*

**Карта синхронної підготовки донора і реципієнтів**

Дата (наприклад)	Донор	Реципієнти
12.05	Спонтанна охота	Тривітамін – перша ін'єкція Естрофану + Тривітамін
22.05 – 25.05	Обробка ФСГ	
24.05	Ін'єкція Естрофану	Друга ін'єкція Естрофану + Тривітамін
25.05 – 27.05	Контроль за проявом тічки, охоти	Контроль за проявом тічки, охоти
27.05 – 28.05	Штучне осіменіння	
4.06	Вимивання ембріонів	Трансплантація ембріонів

Якщо стан жовтого тіла статевого циклу відомий (між 5 і 16 днем), охоту в реципієнтів можна стимулювати і відповідно синхронізувати одноразовим введенням препарату. Застосування

простагландину телицям-реципієнтам із наявним жовтим тільцем різного функціонального стану дозволяє одержувати високі результати синхронізації охоти при обробці їх з 10 по 13 день статевого циклу. Обробка тварин на 8 і 14 дні статевого циклу дає низькі показники синхронізації охоти у реципієнтів. Найвищі показники прояву охоти у телиць одержують за обробки їх простагландинами з 11 по 12 день статевого циклу.

Великий вплив на результати синхронізації охоти мають прогулянки тварин, додаткове введення вітамінів А і Е, мікроелементів.

### 5.1.5. Методи вилучення ембріонів

Для штучного осіменіння корів-донорів використовують тільки сперму від видатних бугаїв-плідників, оцінених за якістю нащадків, дочки яких на 1,5...2,0% перевищують за продуктивністю середню в популяції. Запліднювальна здатність сперми таких бугаїв має бути не менше 70% за високою точністю її оцінки. Осіменяють корів-донорів подвійною порцією сперми.

День, коли корову-донора штучно осіменяли, – це дата запліднення. У біотехнології його називають день-нуль і від нього починають підрахунок розвитку ембріона *in vivo* до його вимивання. Є три способи *вилучення ембріонів* – після забою корови-донора, хірургічним і нехірургічним шляхом.

Перший спосіб полягає у одержанні яйцеклітин, зигот або зародків із яйцепроводів або рогів матки після забою тварини. Найчастіше цей спосіб застосовується для отримання дозрілих яйцеклітин або зародків на стадії зиготи. Важливим у цьому випадку є точне визначення віку зародка або часу овуляції. Наприклад, у корів через три доби зародки переходять із яйцепроводів у роги матки. Вилучення зародків здійснюють шляхом промивання яйцепроводів або рогів матки поживним середовищем, наприклад, фосфатно-сольовим розчином Дюльбекко, що містить 2% сироватки крові великої рогатої худоби і антибіотики.

Другий спосіб – хірургічне вилучення ембріонів. Найпоширенішими методами є такі:

- 1) лапаротомія по білій лінії черева з використанням загальної анестезії;
- 2) лапаротомія у області голодної ямки з використанням місцевої



анестезії.

Суть першого методу полягає в тому, що корів і телиць попередньо витримують 36...48 годин на голодній дієті. Часткове знерухомлення тварин здійснюють введенням внутрішньом'язово 2 мл Рампуну, потім тварину фіксують і здійснюють загальний наркоз внутрішньовенним введенням 10-процентного розчину Хлоралгідрату з розрахунку 100 мл на 100 кг живої маси. Операційне місце обмивають, видаляють шерсть, шкіру дезінфікують 70-процентним етанолом і потім 10-процентною настоянкою йоду. По білій лінії, безпосередньо біля верхнього краю тазу, роблять надріз завдовжки 15 см, через нього обережно витягують роги матки і яєчники з яйцепроводами, оглядають і підраховують кількість жовтих тілець у яєчниках. У одному з рогів матки роблять прокол у місці біфуркації, через який вставляють катетер. Частіше застосовують матково-трубне вимивання, за якого в ампулярну частину яйцепроводу вставляють тонку голку з еластичним шлангом і шприцом нагнітають рідину, промиваючи таким чином ріг матки у напрямі біфуркації. Ефективність вимивання ембріонів таким методом досягає 87%.

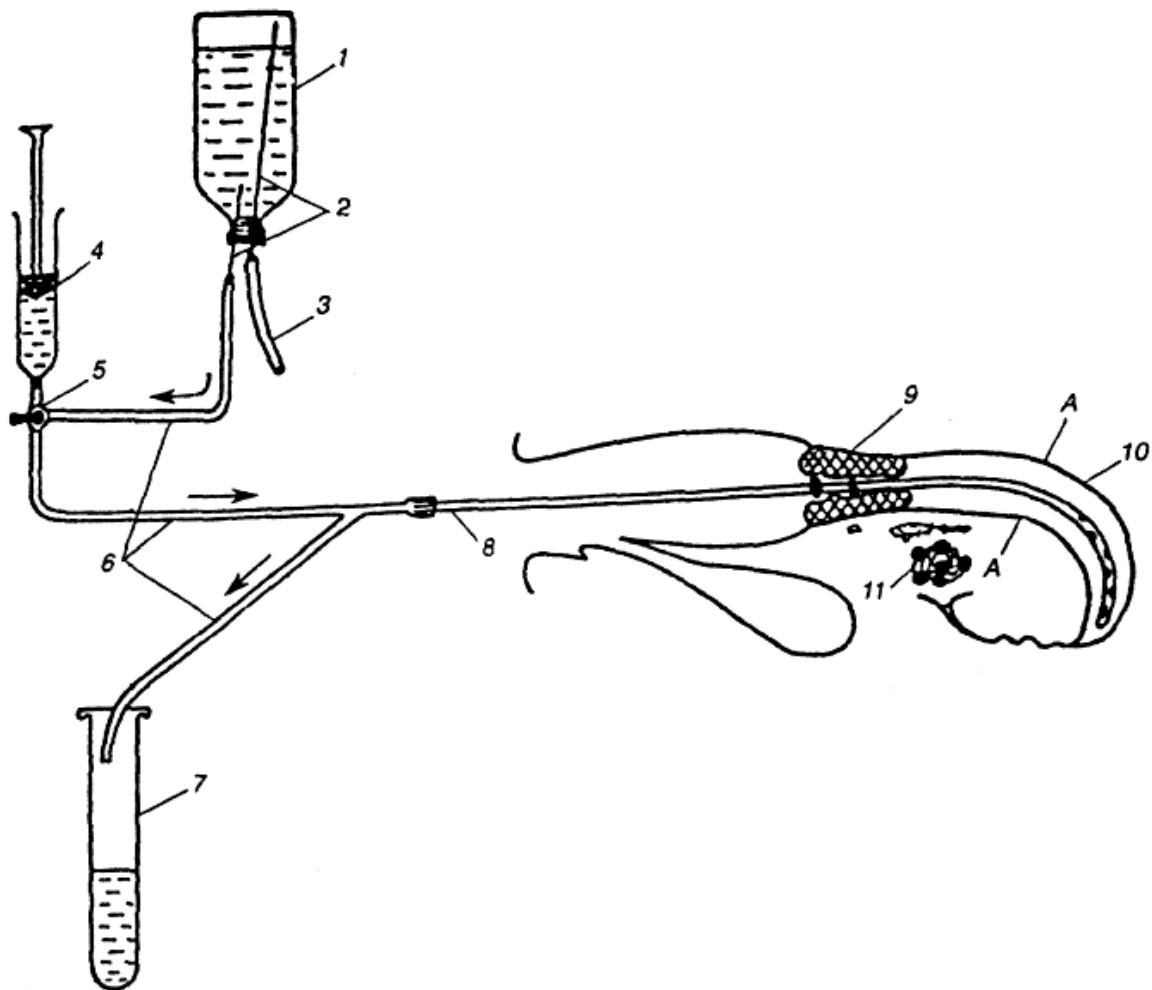
При лапаротомії шляхом розрізу черевної стінки в області голодної ямки справа або зліва операцію виконують на тварині, що стоїть. Роблять скальпелем вертикальний розріз шкіри завдовжки близько 15 см спереду колінного суглоба з подальшим розтинном решти тканин черевної стінки. Підраховують число овуляцій за наявності жовтих тілець яєчника, підтягають ріг матки, роблять прокол стінки рогу матки і проводять вимивання так само, як і через вентральний розріз черевної стінки. Цим способом вдається вилучати більше 60% ембріонів від загальної кількості. Проте, промивання рогу матки, віддаленого від розрізу в області голодної ямки, утруднене через незручність його підтягування і фіксування в просвіті розрізу. У телиць такий метод вимивання ембріонів малопридатний через невеликі розміри рогів матки. У овець і свиней ембріони вимивають лише методом лапаротомії.

Слід зазначити, що хірургічний спосіб вилучення ембріонів є трудомістким і дорогим, особливо у великої рогатої худоби і його не можна використовувати багато разів, адже це, може викликати запалення, зокрема, ендометрію матки, що призводить до безпліддя. В даний час хірургічний спосіб вилучення ембріонів застосовується в окремих випадках, в основному з науковою метою.

Нині для вимивання зародків великої рогатої худоби застосовують нехірургічний спосіб їх виймання. Перевагами цього методу є простота маніпуляцій, можливість повторних вимивань ембріонів, менша вартість робіт. Відтворна здатність донорів, як правило, не порушується. Нехірургічне вимивання проводять найчастіше на 7...8 день після осіменіння. Тварин фіксують, пряму кишку вивільняють від фекалій і оцінюють стан статевих органів. Підраховують кількість жовтих тілець у кожному яєчнику, а також визначають стан матки і розміри її рогів. Зовнішні статеві органи ретельно промивають водою з милом, осушують серветкою, дезинфікують Септонексом або 70-процентним розчином етанолу. Для розслаблення мускулатури прямої кишки і матки, запобігання дефекації і зняття напруги тварині вводять 5...10 мл 2-процентного розчину новокаїну в корінь хвоста (у ямку між крижами і першим хвостовим хребцем) і перевіряють ефективність його дії шляхом підняття і опускання хвоста. Потім, особливо норувистим коровам, катетер у закритому чохлі під ректальним контролем підводять до шийки матки і, фіксуючи її рукою через стінку прямої кишки, обережно проводять через шийку в один із рогів матки (рис. 50).

Перш ніж увести катетер у шийку матки чохол знімають. У міру просування катетера в ріг матки металевий стилет поступово видаляють. Видаливши стилет, у гумову кульку шприцом нагнітають 10...20 мл повітря, залежно від діаметра рогу матки. Ця кулька фіксує наконечник катетера в просвіті рогу матки, не дозволяючи промивному середовищу витікати з рогу, минувши отвір наконечника і канал катетера. Як промивну рідину використовують розчин Дюльбекко з 1...2% фетальної сироватки теляти і антибіотики. Потім у вільний кінець одного із шлангів уставляють голку і сполучають з флаконом із середовищем, а другий шланг опускають у флакон без середовища. Подача в катетер промивної рідини здійснюється самотік після розміщення флакону із середовищем на висоту до 2 м. У процесі промивання проводяться маніпуляції з рогом матки – масаж і підняття верхівки рогу. Вільне надходження промивної рідини з флакона і її відтік регулюється затискачами. Суворо контролюють кількість уведеної і зібраної промивної рідини. На промивання одного рогу витрачають не менше 400 мл і не більше 500 мл середовища. Після закінчення промивання одного рогу видаляють повітря з гумової кульки. Це виконується за допомогою шприца, що вставляється у відповідний отвір. Повітря виходить з гумової кульки

у шприц під час витягування поршня. Потім катетер видаляють, а в інший ріг матки вводять інший стерильний катетер і процедуру повторюють.



**Рис. 50. Схема промивання матки великої рогатої худоби:**

1 – флакон з фізіологічним середовищем, 2 – голки, 3 – повітряний фільтр; 4 – шприц, 5 – двопозиційний краник або клапанний пристрій, 6 – трубки, 7 – судина для збирання змиву, 8 – безманжетний катетер, введений у ріг матки, 9 – шийка матки, 10 – ріг матки, 11 – яєчник (стрілками показано напрямок руху рідини, А – місце стиснення рогу матки)

У цілому, оптимальним варіантом є введення головки жорсткого катетера якомога ближче до верхівки рогу, проте слід пам'ятати, що у міру просування катетера до верхівки рогу зростає вірогідність травмування ним слизової оболонки рогу, про що свідчить наявність крові в промивному середовищі. Пошкодження слизової оболонки не тільки зменшує вірогідність знаходження ембріонів, а й негативно

впливає на життєздатність ембріонів і може викликати запальний процес у тварини.

У овець і свиней нехірургічне вилучення ембріонів неможливе через труднощі проходження катетера через шийку в роги матки. Однак, хірургічна операція для цих видів тварин відносно проста і нетривала. Доступ до репродуктивного тракту здійснюється лапаротомією по білій лінії черева. У свиней 1-, 2- і 4-клітинні ембріони вилучають із яйцепроводів протягом 40 годин після овуляції. При цьому скляну канюлю вставляють до істмуса через маленький отвір у верхівці рогу матки. Через канюлю вводять 20...30 мл промивної рідини і збирають її з ампулярного кінця яйцепроводу в чашку Петрі. Для вилучення ембріонів із матки промивають яйцепровід і верхівку рогу матки. Ріг матки віджимають і канюлю вставляють у ріг матки. Звичайно для вимивання використовують середовище Дюльбекко з лактатом натрію, піруватом натрію і альбуміном сироватки крові великої рогатої худоби. Ембріони свиней можна вилучати до 12-го дня після початку охоти. Ефективність вилучення ембріонів звичайно висока (до 95%). Можна робити 3...4 операції на одній тварині.

За вилучення ембріонів від овець в ампулярний кінець яйцепроводу вводять скляну або поліетиленову канюлю і промивають із рогу матки в яйцепровід. Незалежно від часу вимивання після охоти ефективність вилучення ембріонів становить до 80%.

### 5.1.6. Оцінка якості ембріонів

Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для трансплантації. Тому їх необхідно оцінити за деякими морфологічними ознаками. За життєздатністю ембріони поділяють на п'ять категорій (за даними Шульган І.З. та Шаловила С. Г., 1986):



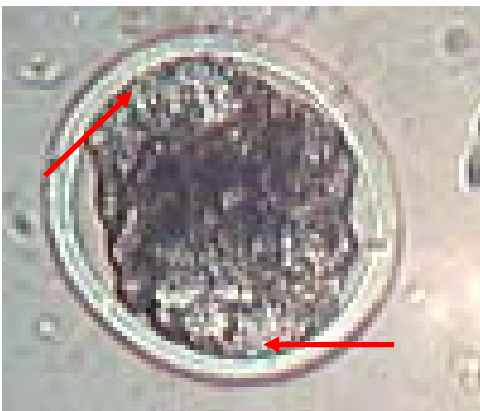
Ембріон великої рогатої худоби відмінної якості на стадії пізньої морули. Сполучення клітин у ембріоні правильне, крайні бластомери однакової величини, клітинні межі чіткі. Збільшення в 100 разів.



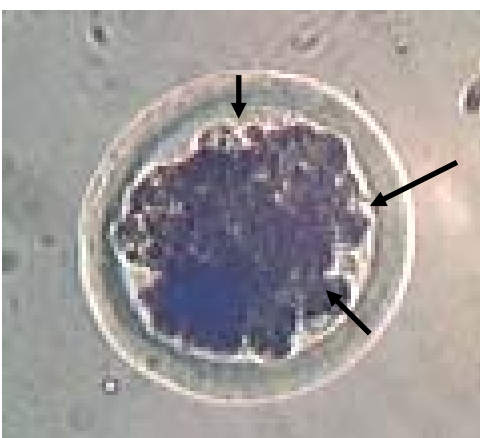
Ембріон великої рогатої худоби відмінної якості на стадії розширеної бластоцисти. Ембріобласт чітко відмежований (стрілки). Збільшення в 100 разів.



Ембріон великої рогатої худоби хорошої якості на стадії ранньої бластоцисти. Відділено близько 10% розрихлених бластомерів (біла стрілка). Позначено початок закладки порожнини бластоцисти (стрілка). Збільшення в 100 разів.



Ембріон великої рогатої худоби задовільної якості на стадії пізньої морули. Позначено розрихлені клітинні комплекси (стрілки). Збільшення в 100 разів.



7-денний ембріон великої рогатої худоби на стадії ранньої морули. Прогресуюча дегенерація – фрагментація та лізис окремих бластомерів (стрілки). Значне відставання у розвитку. Непридатні для пересадки реципієнтам. Збільшення в 100 разів.

**Рис. 51. Ембріони великої рогатої худоби різної якості (надані С.І. Ковтун, 2009)**

I – відмінні, ідеальні, відповідають дню вимивання, однорідні, округлої форми з непошкодженою прозорою оболонкою, чіткими, однаковими за величиною бластомерами;

II – хороші, у яких декілька клітин відокремлені від загальної маси, бластомери неоднакові за величиною, розміщені щільно й несиметрично;

III – задовільні, неоднорідні, в перивітеліновому просторі можуть бути включення (відокремлені клітини), бластомери частково ущільнені;

IV – незадовільні, що мають зону пелюциду не округлої форми, наявність дегенерованих клітин, порушення зв'язку між бластомерами – ущільнення й зморщення бластомерів;

V – дегенеровані, що не відповідають стадії розвитку ембріона. На 7-й день мають 8 бластомерів, спостерігається дефект прозорої оболонки, значне ущільнення бластомерів.

Для пересадки використовують в основному ембріони I–IV категорій (рис. 51).

Життєздатність ембріонів можливо оцінити в період їх культивування у спеціальних середовищах (199, Хема-10, Дюльбекко) за температури +37°C. Також, можна використовувати метод фарбування, що ґрунтується на різному ступені проникнення барвників через прозору оболонку живих чи загиблих ембріонів.

Після вимивання із статевих шляхів самок зародки оцінюють і визначаючи їх якість. Зародки відмінної, хорошої, а у ряді випадків і задовільної якості відбирають для пересадки реципієнтам. Використовують як свіжоодержані, так і заморожено-розморожені зародки.

Відомо, що більшість видів сільськогосподарських тварин володіє достатньо великим запасом генетичної мінливості, який забезпечує специфіку виду і знімає загрозу зникнення виду, як носія певного набору хромосом і локалізованих у них генів. У скотарстві України найбільш значною з точки зору збереження унікального спадкового матеріалу є сіра українська порода великої рогатої худоби, тварини якої володіють комплексом генів високої резистентності, міцної конституції і якісними характеристиками продукції.

Для збереження генофонду сірої української породи великої рогатої худоби поряд з банком кріоконсервованої сперми, основних генофондових стад (племзавод «Поливанівка», дослідне господарство



«Маркеєво») створені стада в господарстві «Фавор» Києво-Печерської Лаври і ТОВ «Голосієво» монастиря «Свято-Покровська Голосіївська пустош». У цих господарствах за участю біотехнологів Інституту розведення і генетики тварин НААН України у 2005 році здійснювалася програма відтворення тварин бажаних генотипів шляхом трансплантації ембріонів. Дослідження були спрямовані на вивчення рівня ембріопродуктивності корів сірої української породи, встановлення на основі морфо- та цитогенетичної оцінки якості вилучених ембріонів. Залежно від реакції на суперовуляцію мали визначитися із рівнем життєздатності зародків і її проявом на рівні тільності реципієнтів і народження телят-трансплантантів. Слід відмітити, що роботи з вивчення ембріопродуктивності корів сірої української породи в Україні проведено вперше.

Установлено, що після гормональної обробки корів сірої української породи всі тварини проявили високий рівень реакції яєчників на суперовуляцію і в середньому забезпечено вилучення 9 ембріонів на одну голову. Така кількість ембріонів за одне вимивання є досить високою і не відрізняється від ембріопродуктивності корів інших порід. Ембріони були придатні для трансплантації за морфологічною оцінкою і забезпечили тільність реципієнтів і народження телят на рівні 80,0%. На рисунку 52 зображені телята-трансплантанти, одержані в результаті виконаної роботи.



*Рис. 52. Телята-трансплантанти сірої української породи*

Розглядаючи розподіл одержаних ембріонів за стадіями розвитку від корів сірої української породи, у яких було виконано вимивання зародків на 7-й день статевого циклу, встановлено, що формування ранніх бластоцист на 38,4% вище, порівняно із ембріонами, що залишилися на стадії пізньої морули.

Установлено, що серед пересаджених реципієнтам пізніх морул тільність і народження телят були у 50,0%, а трансплантовані свіжовилучені ранні бластоцисти проявили вищу на 16,7% життєздатність, яка реалізувалася у отеленні реципієнтів на рівні 66,7% від кількості пересаджених зародків.

### **5.1.7. Способи пересадки ембріонів реципієнтам**

Однією з основних умов високого рівня приживлення ембріонів є синхронізація охоти у донора і реципієнтів. Різниця в часі не повинна перевищувати  $\pm 24$  години, оптимальні результати одержують за різниці не більше 12 годин. Особливо слід зазначити, що синхронізація ембріон-реципієнт має важливіше значення для успішної трансплантації, ніж синхронізація донор-реципієнт. Нині пересадку ембріонів реципієнтам здійснюють хірургічним і нехірургічним методами.

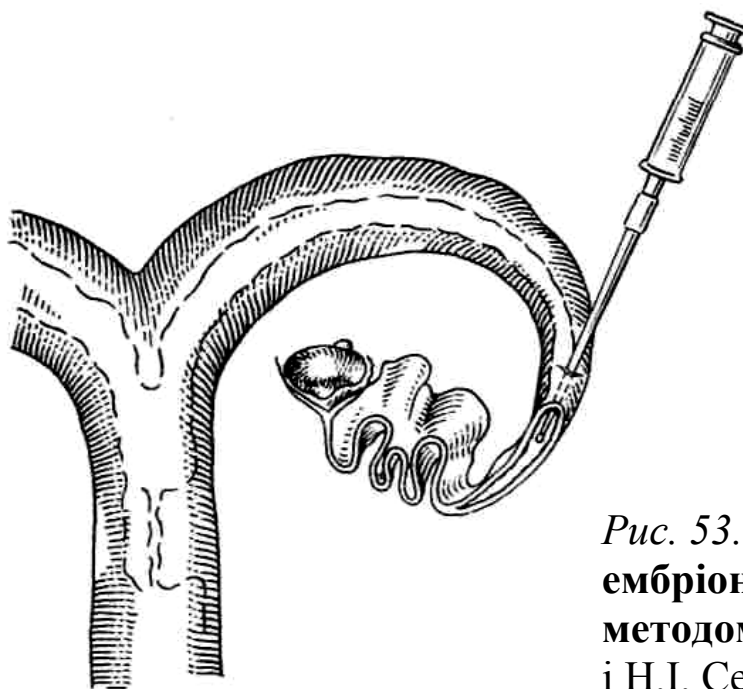
**Хірургічний метод.** Застосують два способи. Перший спосіб – лапаротомія по білій лінії черева з використанням загального наркозу в положенні тварини лежачи на спині на особливому похилому операційному столі. Цей метод можна використовувати тільки для телиць. Здійснюють так як і при вимиванні ембріонів.

Другий спосіб пересадки – менш трудомісткий, здійснюється в положенні стоячи шляхом розрізу черевної стінки у області голодної ямки, із застосуванням місцевої анестезії (5 мл 2-процентного розчину новокаїну і 0,6 мл комбелену); по лінії розрізу пошарово – 140 мл 2-процентного розчину новокаїну. Роги матки підтягують, як і при вимиванні ембріонів, стінку рогу матки проколюють тупою голкою, в цей отвір вводять скляну піпетку із зародком, при цьому кінець піпетки спрямовують у бік верхівки рогу матки якомога ближче до місця його з'єднання з яйцепроводом (рис. 53).

Після пересадки на розріз накладають три шари швів – на очеревину і прямий внутрішній м'яз, на косий зовнішній м'яз і підшкірну клітковину – кетгуттом і на шкіру – лавсановою ниткою або шовком. Через 14 днів зовнішні шкірні шви знімають. При операціях



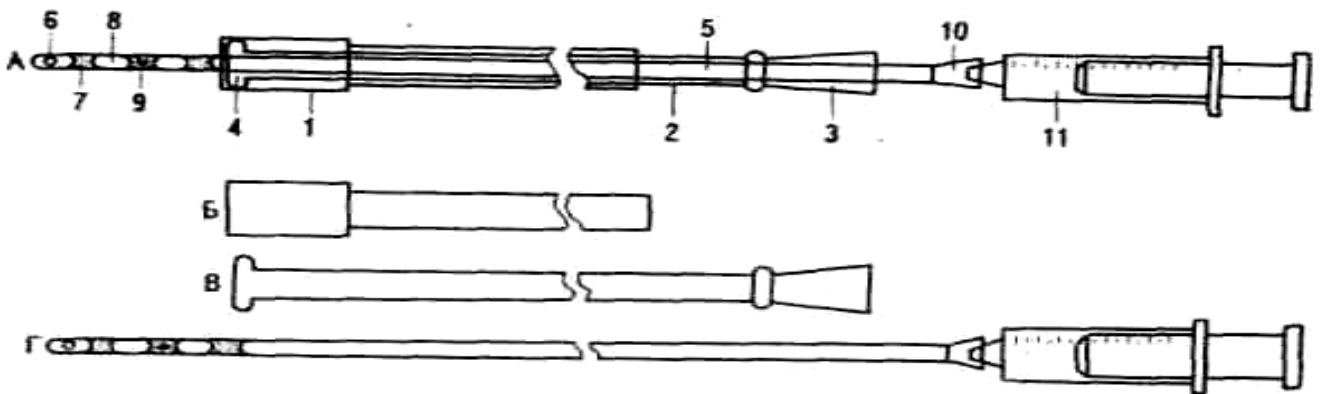
по білій лінії черева використовують тільки кетгут, щоб уникнути повторної фіксації тварини. Ефективність хірургічного методу ТЕ великої рогатої худоби становить 60...70%. Слід зазначити, що хірургічний метод потребує великих витрат засобів, його застосування стримується складністю проведення операції у виробничих умовах через отримання травм унаслідок реакції м'язів і неможливість багаторазового використання реципієнтів. Останнім часом ТЕ ембріонів великої рогатої худоби здійснюється нехірургічним способом, перевага якого полягає не тільки у відносній простоті і більшій економічності, а і в можливості багаторазового використання реципієнтів.



*Рис. 53. Схема пересадки ембріонів хірургічним методом (за Л.К. Ернстом і Н.І. Сергєєвим, 1989)*

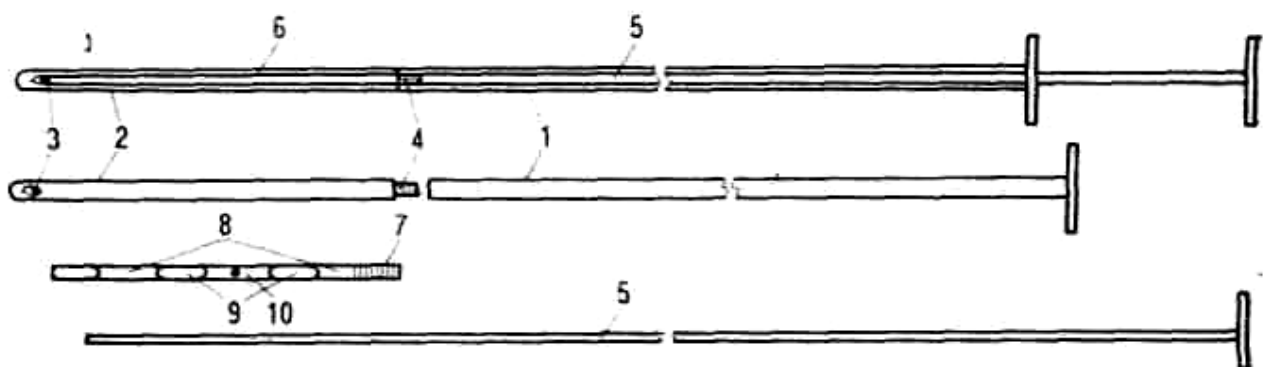
**Нехірургічний метод.** Спочатку реципієнтів піддають ректальному обстеженню – тільки тварини, які мають добре розвинене жовте тіло допускаються до використання. Телиць-реципієнтів фіксують, зовнішні статеві органи обмивають теплою водою з милом, дезинфікують, роблять сакральну анестезію 2-процентним розчином новокаїну (5 мл). Пайєту заповнюють розчином Дюльбекко з антибіотиками і 10...20% фетальної сироватки теляти, який містить ембріони. Розчин із ембріонами відділяють двома мішурами повітря від додаткової кількості розчину біля піжа пайєти і вільного кінця пайєти. Пайєту поміщають у наконечник катетера для ТЕ типу Касу (рис. 54, 55). Катетер розміщують у захисний чохол і за температури +37°C доставляють до місця

пересадки. Підготовлений до пересадки катетер вводять у піхву до шийки матки, проривають захисний чохол і під ректальним контролем проводять катетер через шийку матки в ріг на відстань не менше 5...7 см від тіла матки. Ембріони потрібно пересаджувати якнайдалі в ріг матки, але при цьому не пошкодити слизової оболонки рогу і шийки матки, якщо на катетері після витягування буде кров, ембріон швидше за все не приживеться.



**Рис. 54. Катетер для нехірургічної пересадки ембріонів:**

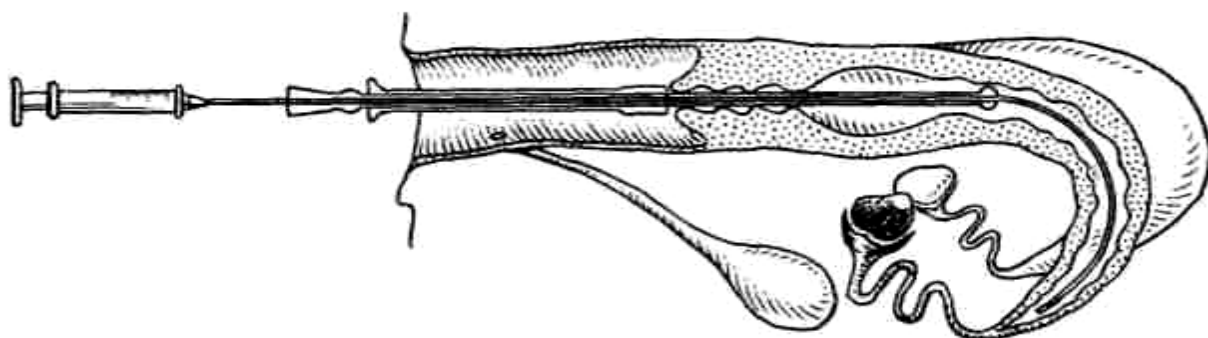
А – катетер у зібраному вигляді; Б – санітарний чохол; В – трубка з неіржавіючої сталі; Г – уретральний катетер із шприцом для виштовхування ембріону; 1 – санітарний чохол, 2 – трубка; 3 – розширений отвір; 4 – дистальний кінець трубки; 5 – катетер; 6 – отвір катетера; 7, 8, 9 – розташування середовища і робочої частини катетера; 10 – перехідник сполучення із шприцом; 11 – пластиковий шприц (за Л.К. Ернстом і Н.І. Сергєєвим, 1989)



**Рис. 55. Металевий катетер для нехірургічної пересадки ембріонів великої рогатої худоби:**

1 – металева трубка; 2, 4 – наконечник катетера, що знімається; 3 – отвір наконечника; 5 – стилет; 6 – пайета у наконечнику; 7 – пробка пайети; 8 – середовище; 9 – повітря; 10 – середовище із ембріоном (за Л.І.Ернстом і Н.І.Сергєєвим, 1989)

Переконавшись у правильності розташування катетера (щоб вихідний отвір у ньому не притискався до стінки рогу), необхідно натиснути на шток катетера, видавлюючи вміст пайєти разом із ембріоном у просвіт рогу матки. Катетер плавно виймають. Як правило, ембріон пересаджують у ріг матки зі сторони яєчника із жовтим тілом, при білатеральній пересадці аналогічним чином вводять інший катетер (рис. 56). Катетер можна використовувати повторно після його промивання і дезинфекції. Пересадка двох ембріонів збільшує частоту тільності.



**Рис. 56. Схема розташування катетера в розі матки за нехірургічної пересадки (за Л.І.Ернстом і Н.І.Сергеєвим, 1989)**

**Контроль приходу реципієнтів у охоту після пересадки.** На 60...90 день тварин досліджують на наявність тільності ректальною пальпацією або методом визначення рівня прогестерону в крові чи молоці через 14...18 діб після пересадки (менш поширений метод). У тільних реципієнтів контролюють випадки і частоту абортів. Остаточні показники пересадки враховують за наслідками отелення.

**Вплив безпосередньої пересадки кріоконсервованих ембріонів на тільність телиць-реципієнтів.** Слід зазначити, що під час трансплантації кріоконсервованих ембріонів також здійснюють оцінку їх якості за морфологічними показниками. Однак, останнім часом використовують метод прямої пересадки заморожено-розморожених ембріонів великої рогатої худоби, коли трансплантацію зародків реципієнтам здійснюють відразу після розморожування без вилучення із пайєти і відмивання від кріопротектора. У цьому разі як кріопротектор найчастіше використовують 1,5 М розчин етиленгліколю. Недоліком методу прямої пересадки є ризик використання для трансплантації недостатньо оцінених ембріонів, але перевагою є зменшення

кількості операцій.

Використовуючи метод прямої пересадки ембріонів великої рогатої худоби голштинської породи німецької селекції було проведено дослідження з вивчення рівня приживлення залежно від стадії розвитку (пізні морули, ранні бластоцисти). Через відсутність морфологічної оцінки зародків після розморожування, за використання цього способу пересадки, важливим є вивчення впливу стадії розвитку ембріонів з метою підвищення успішної тільності реципієнтів.

Було використано телиць-реципієнтів із синхронізованим статевим циклом, яким проведена нехірургічна трансплантація на 7-й день від виявленої охоти. Аналіз експериментальних даних свідчить, що метод прямої пересадки є досить ефективним під час одержання телят-трансплантантів і дозволяє отримати тільних реципієнтів на рівні 56% (14 із 25). Рівень тільності відповідає вітчизняним і світовим показникам під час пересадки кріоконсервованих ембріонів великої рогатої худоби.

Враховуючи високу вартість імпортованих ембріонів, слід віддавати перевагу одержанню вищого відсотка приживлення їх після нехірургічної трансплантації. Під час перевірки рівня тільності кріоконсервованих зародків, які перебували в замороженому стані від одного місяця до одного року, встановлено, що на приживлення ембріонів після нехірургічної пересадки не впливає тривалість їх зберігання у скрапленому азоті. Так, тільність після пересадки ембріонів, що зберігалися у скрапленому азоті один місяць, була 36,4%, а після розморожування зародків через 7...12 місяців – 72,7%, приживлення ембріонів після чотирьох років зберігання становило 61,5% і 50,0% – після десяти років. Таким чином, збільшення часу перебування ембріонів у скрапленому азоті не виявляє суттєвого впливу на наступну життєздатність зародків. Здебільшого цей показник залежить від якості ембріонів перед заморожуванням.

Аналіз результатів літературних даних та власних досліджень свідчить, що розроблені сучасні методичні підходи до заморожування ембріонів забезпечують їх збереженість досить тривалий час і відновлення життєздатності після розморожування на достатньо високому рівні. Враховуючи, що часто під час трансплантації свіжоодержаних ембріонів відсоток тільності реципієнтів є на рівні 40,4%, кріоконсервованих – не перебільшує 45%, одержаний нами відсоток тільності реципієнтів (61,5% і 50,0%) після прямої пересадки

кріоконсервованих ембріонів з чітким відбором телиць та синхронізацією їх статевих циклів, перевагу у використанні має саме цей спосіб трансплантації зародків.

Дослідженнями впливу стадії розвитку ембріонів на ефективність їх приживлення після трансплантації реципієнтам встановлено, що після трансплантації ранніх бластоцист тільність і народження телят були на рівні 72,7% (8 із 11), а пересажені пізні морули імплантувалися на рівні 35,7% (5 із 14).

Отже, для підвищення ефективності нехірургічної трансплантації ембріонів великої рогатої худоби слід використовувати зародки, заморожені для прямої пересадки, з урахуванням стадії розвитку ембріонів і здійсненням відповідної підготовки реципієнтів, це дасть можливість підвищити рівень імплантації та народження телят-трансплантантів до 70%. Використання детального аналізу стадій розвитку ембріонів великої рогатої худоби, що заморожуються в рідкому азоті і призначені для імпорту або збереження генофонду, дозволить достовірно прогнозувати їх приживлення після нехірургічної трансплантації.

Це особливо важливо у зв'язку з високою вартістю ембріонів, що володіють цінним генетичним потенціалом. Безсумнівно, плануючи завезення кріоконсервованих ембріонів імпоротної селекції, доцільно враховувати рекомендації ембріолога з відбору кожного зародка після визначення селекційного походження ембріонів.

Тільки на основі детального вивчення основ ембріологічної генетики, генетики розвитку, якими повинен володіти біотехнолог, буде забезпечено високий рівень отримання телят-трансплантантів.

## 5.2. Зберігання ембріонів

**Кріоконсервування ембріонів.** Перші досліди із заморожування ембріонів провели у 1978 р. С.М. Уілраден, К. Полдж і Л.Е. Роусон. Згодом С.П. Лейбо (1984) удосконалив застосовану ними методику, проте для перенесення цих розробок на сільськогосподарські тварини потрібно було ще 20 років досліджень.

Нині ембріони заморожують методом програмного одноступінчастого заморожування, або ж одномоментним методом (вітрифікація).

Низькотемпературна консервація ембріонів сільсько-

господарських тварин для наступної їх трансплантації має велике практичне значення. Воно дає можливість тривалий час зберігати цінний генетичний матеріал, відпадає необхідність в утриманні великих стад реципієнтів, значно спрощує експорт і імпорт ембріонів. Стає можливим зберігання генофонду рідкісних і зникаючих порід тварин.

Передумовою кріобіологічної технології ембріонів є принцип зберігання ізольованих клітин у суспензіях, наприклад, спермійв, еритроцитів, лімфоцитів і різних ліній культивованих клітин. Проте різним типам і колоніям клітин властивий свій режим охолодження та відтаювання, і вони можуть бути змінені відповідно до специфіки клітини.

Найважливіший фактор у процесі заморожування ембріонів – швидкість охолодження, яка для багатьох клітин становить  $1^{\circ}\text{C}$  за одну хвилину. Однак, оптимальна швидкість охолодження, що забезпечує максимальний рівень виживання для різних типів клітин, значно варіює для ембріонів різних видів тварин.

Великий вплив на життєздатність клітин виявляє і швидкість відтаювання, що залежить від швидкості охолодження. При швидкому охолодженні рівень виживання вищий за умовою швидкого відтаювання, повільне охолодження потребує повільного відтаювання.

Оптимальною стадією для заморожування ембріонів великої рогатої худоби є рання бластоциста, ембріонів овець і кіз – пізня морула чи рання бластоциста, ембріонів свиней – бластоциста. Краще переносять заморожування свіжі ембріони.

Але за заморожування ембріонів нижче  $0^{\circ}\text{C}$  в них можуть виникати такі пошкодження:

- створюються кришталіки криги;
- зникає вода;
- збільшується концентрація розчинених речовин у клітині (тобто осмотичний шок).

За дуже повільного заморожування кришталі криги не утворюються, але спостерігається зневоджування клітини, швидке заморожування викликає утворення кристалів. Для вирішення цієї проблеми використовують кріопротектори, що поділяються на дві групи:

- внутрішні – це ті, що вводять усередину клітини для запобігання створенню криги. Як кріопротектор використовують

диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь, етанол та ін.;

- зовнішні кріопротектори нездатні потрапляти всередину ембріона, але вони запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє всередину клітини, а внутрішній кріопротектор виходить назовні повільно, що викликає набухання і пошкодження ембріона. Як зовнішні кріопротектори використовують полівінілпірралідон (ПВП), а в основному розчин сахарози.

Слід підкреслити, що процес заморожування ембріонів є набагато складнішим від заморожування сперми, оскільки ембріони є багатоклітинними утвореннями. Тому дуже важлива роль відводиться підготовці ембріонів до заморожування, їх захисту від температурних та осмотичних пошкоджень.

У процесі заморожування ембріонів спочатку знижується температура в навколклітинному середовищі, тут поступово збільшується кількість криги, в той час як в решті розчину зростає концентрація солей. Таким чином виникає різниця осмотичного тиску між позаклітинною та внутрішньоклітинною фазами, яка може бути зрівноважена шляхом віддачі клітинами води у позаклітинне середовище.

Для уникнення кристалізації внутрішньоклітинної води до складу середовища додають кріопротектори диметилсульфоксид (ДМСО) чи гліцерин, а щоб не допустити осмотичних зрушень – штучно стимулюють кристалізацію на певній стадії. Проте саме введення до складу середовища з ембріонами кріопротектора, як і його видалення, може викликати осмотичні зрушення. Тому це насичення (*еквілібрацію*) роблять поступово, поміщаючи ембріони на годинникових скельцях у чашках Петрі спочатку на 5...10 хв. у 0,25 М розчин ДМСО, тоді – в 0,5 М, 1,0 М і, нарешті, в 1,5 М розчин. У останньому розчині ембріони витримують 15...20 хв. Якщо кріопротектором є гліцерин, то спочатку ембріони поміщають на 10 хв. у 3,3-процентний його розчин, тоді на 14 хв. у 6,6%-процентний і, нарешті, на 30 хв. у 10-процентний розчин. Після розморожування ембріонів їх також відмивають від кріопротектора, переносячи поступово з розчинів з більшою концентрацією кріопротектора у менш концентровані розчини.

За наявності ембріонів відмінної якості можна використовувати спрощений спосіб насичення кріопротектором, за якого ембріони

відразу переносять у 1,0 М або 1,4 М розчин гліцерину і витримують до 30 хвилин.

Закінчивши насичення ембріонів кріопротектором, їх розфасовують по 1...4 шт. у пробірки, ампули чи пайєти для заморожування, яке проводять одно- чи двоетапним методом, повільно чи швидко. У пайєти ембріони поміщають у такій послідовності: середовище–повітря–середовище з ембріоном–повітря–середовище. Кожен стовпчик повинен займати в пайєті до 1...2 см довжини. Один край пайєти закривають зволоженим корком (рис. 57).

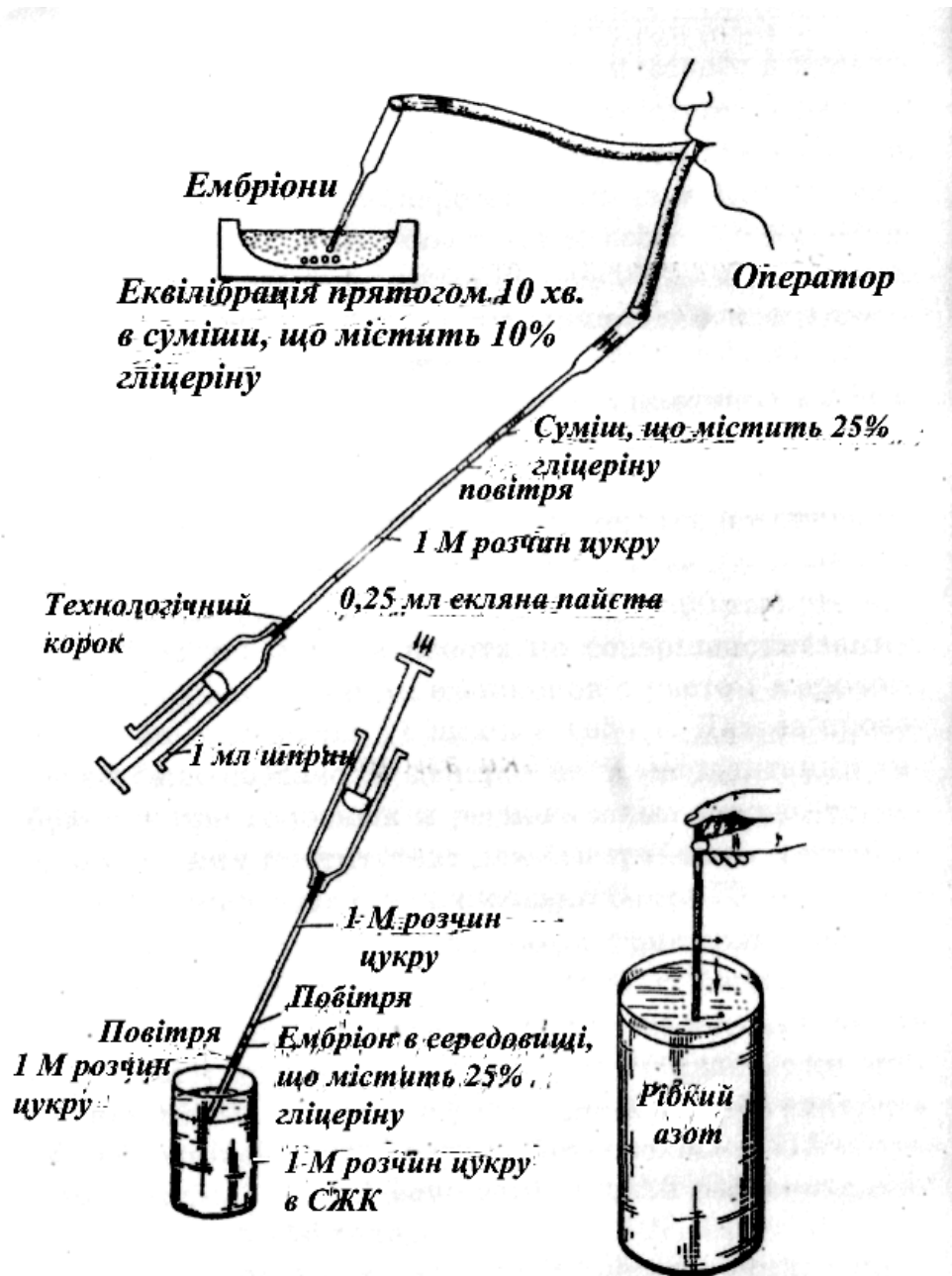


Рис. 57. Схема послідовності операцій заморожування ембріонів



Для зниження перепаду температур і уникнення осмотичних змін за температури 4...5°C до початку кригоутворення стимулюють кристалізацію, додаючи до розчину шматочок криги, кристалик йодистого срібла чи просто переохолоджений предмет (проколюють фольгу пінцетом з намерзлою на кінці краплею середовища і швидко торкаються ним поверхні рідини).

**Повільне заморожування і повільне розморожування ембріонів** можна проводити за декількома методиками, що передбачають такі дії:

- 1) охолодження ембріонів від +20°C до -7°C зі швидкістю 1°C/хв.;
- 2) викликання кристалізації (торкаються пінцетом, переохолодженим у рідкому азоті, до поверхні контейнера, пробірки чи ампули з ембріонами);
- 3) подальше охолодження зі швидкістю 0,3°C/хв. до мінус 36°C;
- 4) подальше охолодження зі швидкістю 0,1°C/хв. до мінус 60°C;
- 5) перенесення у скраплений азот для швидкого охолодження.

Розморожують ембріони у спиртовій бані – скляній циліндричній колбі за температури -50°C, куди поміщають пробірки чи ампули з ембріонами і розморожують за кімнатної температури зі швидкістю 4°C/хв. до 10°C, після чого переносять на 5 хв. у водяну баню за температури 20°C. Нарешті, переносять ембріони у середовище для видалення кріопротектора.

**Швидке заморожування та розморожування ембріонів** (уперше застосував А. Массіп у 1987 р.). Охолоджують ембріони у мініпайєтах за температури від 20°C до мінус 7°C зі швидкістю 1°C/хв., викликають кристалізацію, тоді охолоджують зі швидкістю 0,3°C/хв. лише до температури -30°C, після чого переносять у скраплений азот. Розморожують ембріони у водяній бані за температури 37°C протягом 30 сек. зі швидкістю 3,0°C/хв.

НДІ тваринництва Лісостепу і Полісся запропонував технологію заморожування ембріонів за якої свіжовимиті ембріони переносять на 10 хв. у 0,5 М розчин ДМСО на середовищі ФБС, тоді на 20 хв. у таке ж середовище з 1,3 М ДМСС, після чого по 3...4 зародки переносять в уленгутівську пробірку з 0,5 мл 1М ДМСО на ФБС, герметизують пробірку і поміщають у програмний апарат для охолодження і заморожування.

Заморожування ведуть за такою програмою: від 22...25°C до -6°C зі швидкістю 1°C/хв. штучно збуджують кристалізацію середовища і заморожують від -6°C до -40°C зі швидкістю 0,3°C/хв.,

від  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $-60^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$ , після чого переносять пробірки з охолодженими до температури  $-60^{\circ}\text{C}$  ембріонами у скраплений азот.

Останнім часом запропоновані технології заморожування ембріонів у соломинках, які містять одночасно два середовища – для заморожування (рідина Дюльбекко з 10-процентним гліцерином і поміщеним у ній ембріоном) і середовище для розморожування (рідина Дюльбекко з 20% фетальної сироватки і 0,5 М розчином сахарози). Після розморожування соломинку струшують (для змішування середовищ), витримують 10...20 хв. за кімнатною температурою і пересаджують ембріон реципієнту.

Чутливість ембріонів до охолодження залежить від виду тварини. Ембріони свиней особливо чутливі до охолодження. Поки що не вдалося зберегти життєздатність ембріонів свиней на ранніх стадіях розвитку після охолодження їх нижче  $10...15^{\circ}\text{C}$  (С. Полдж, 1982). Ембріони великої рогатої худоби на ранніх стадіях розвитку також – дуже чутливі за охолодження до  $0^{\circ}\text{C}$ . Однак, на більш пізніх стадіях розвитку, таких як морула або бластоциста, вони добре витримують охолодження. Ембріони овець переносять охолодження до  $0^{\circ}\text{C}$  на будь-яких стадіях розвитку, від одно-, двоклітинної стадії до бластоцисти.

Успішне заморожування і відтаювання ембріонів овець уперше було проведено С. Вілладсеном й ін. (1974). Ембріони повільно охолоджували (від  $0,3$  до  $2,0^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$ ) і повільно розморозжували (від  $4$  до  $25^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$ ). Як кріопротектор застосовували ДМСО. Пізніше встановлено, що за використання 1,5 М ДМСО у фосфатному буфері заморожування зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$  до  $-120^{\circ}\text{C}$  супроводжувалося виживанням ембріонів тільки в тому разі, якщо застосовувалося швидке відтаювання ( $360^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$ ). Однак, при заморожуванні зі швидкістю  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$  було збережено виживаність ембріонів як за швидкого, так і при повільного відтаювання ( $10$  або  $4^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$ ). За подальшого зменшення швидкості заморожування до  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$  в інтервалі температур між  $-30$  і  $-60^{\circ}\text{C}$  повільне відтаювання було обов'язковим.

Перше лоша було отримано після пересадження 11 заморожено-розморожених ембріонів, використаних на 6-й день після овуляції. Повідомлялося про одержання двох лошат після хірургічного пересадження чотирьох шестиденних заморожених ембріонів трьом реципієнтам.

Таким чином, встановлено, що ембріони великої рогатої худоби в перші дні розвитку особливо чутливі до охолодження, але коли вони досягають стадії бластоцисти, то стійкі до охолодження в більш широкому діапазоні стадій розвитку. У свиней на жодній стадії розвитку ембріони не виживають після охолодження їх до температури нижче 10...15°C. Досягнуто успішне заморожування до 196°C і відтаювання ембріонів великої рогатої худоби, овець і коней на стадіях морули і бластоцисти з одержанням живого потомства у всіх трьох видів тварин. На практиці цей прийом використовують лише за розведення великої рогатої худоби.

**Вітрифікація.** Значним спрощенням процедури кріоконсервування ембріонів ссавців є метод вітрифікації, що легкий у застосуванні, швидко використовується, не потребує контролю зміни температур. Головною властивістю вітрифікаційної суміші є висока концентрація проникаючих (внутрішніх) криопротекторів, що за низької температури стають желеподібними і в результаті застигають у склоподібній формі.

При цьому не утворюються кристали криги, які є однією із головних проблем руйнування клітин у процесі кріоконсервації. Хоча одержані поза організмом ембріони великої рогатої худоби мають підвищену чутливість до заморожування-відтаювання, вітрифікація може забезпечити кращу виживаність, ніж програмне заморожування. Недоліком цього методу є токсичність криопротекторів, що входять до вітрифікаційного розчину, внаслідок їх високих концентрацій під час еквілібрації, яка необхідна для проникнення криопротектора в клітини і запобігання формування внутрішньоклітинної криги. Порівнюючи токсичність різних внутрішніх криопротекторів за дії на морули мишей, доведено, що етиленгліколь є найменш токсичним (98% виживаності *in vitro*), більша токсичність спостерігалася для гліцерину – 88%, для ДМСО – 68%, для пропіленгліколю – 16%.

Для проникаючих агентів важливою характеристикою є їх здатність до швидкого проникнення агента, що може забезпечити менш тривалу еквілібрацію, дифузія води із клітини пройде швидко і, таким чином, зменшиться ризик осмотичних пошкоджень і токсичного впливу на клітини. Серед розглянутих криопротекторів кращим за проникністю є етиленгліколь.

До вітрифікаційних розчинів додають і непроникаючі (зовнішні) агенти, які мають значний осмотичний ефекти. Серед них найчастіше використовується сахароза.

### 5.3. Отримання ембріонів *in vitro*

Необхідність запліднення *in vitro* виникає, коли є потреба одержати ембріони на ранніх стадіях розвитку, а також отримати велику кількість ооцитів від вимушено забитих високопродуктивних корів. Запліднення *in vitro* також має вирішальне значення в досліджах з генної інженерії, де зиготи необхідні на стадії двох пронуклеусів.

Перші телята, одержані після пересадження дуже ранніх ембріонів (2...4-клітинних), не мали економічного ефекту. У 1988–1989 рр. у лабораторії М. Прокоф'єва під керівництвом Л.К. Ернста одержали телят від пересадження запліднених поза організмом ембріонів на більш пізніх стадіях розвитку. Нині відпрацьована методика і технологія запліднення яйцеклітин *in vitro*, що дає можливість проводити всі етапи отримання ембріонів (дозрівання, запліднення і ранній розвиток) без використання тимчасових реципієнтів та одержувати високий вихід повноцінних ембріонів. Технологія передбачає збір яєчників від вибракуваних корів при забої, їх перевезення в лабораторію, відбирання ооцитів, дозрівання, запліднення, забезпечення раннього розвитку в спеціальних культурних середовищах, заморожування і створення банків цінних генотипів.

Розроблена технологія одержання телят шляхом запліднення *in vitro* вже має широке практичне застосування. Так, у Великобританії лише на одній фірмі «Енімал Байотехнолоджі Кембрідж лімітід» цим способом отримують 30...40 тис. ембріонів великої рогатої худоби на рік і реалізують їх за ціною, у 10 разів меншою порівняно з ембріонами, одержаними шляхом нехірургічного їх вилучення у корів-донорів.

Запліднення *in vitro* дозрілих у культуральному середовищі ооцитів, вилучених з яєчників забитих тварин, є ефективним способом одержання ембріонів великої рогатої худоби. Удосконалювання методів культивування ооцитів і ранніх ембріонів, запліднення *in vitro* дозволили досягти прогресу в виведенні телят з ембріонів, одержаних *in vitro*. Отримані поза організмом бластоцисти великої рогатої худоби можна кріоконсервувати. Пересадження таких ембріонів після розморожування дозволяє одержати нащадків.

Прикладне значення методів дозрівання і запліднення ооцитів *in vitro* полягає в одержанні додаткової кількості дешевих ембріонів, насамперед, в одноплідних тварин. Ці методи дозволяють:

- по-перше, отримувати ембріони від високоцінних донорів, що не реагують або слабо реагують на гормональну обробку;
- по-друге, використовувати генетичний потенціал видатних за племінними і продуктивними якостями тварин після їх вибракування за віком або з інших причин;
- по-третє, збільшити поголів'я нащадків, наприклад, шляхом підсадження отриманих поза організмом морул і бластоцист низькопродуктивним реципієнтам, зокрема, для виробництва дешевої яловичини.

Останнім часом розроблений метод щотижневого (двічі на тиждень протягом не менше 5 місяців) виймання незрілих ооцитів з яєчників генетично цінних живих корів шляхом трансвагінальної пункції антральних фолікулів під контролем ультразвуку (*OPU – ovum pick-up*) без попередньої гормональної обробки донорів (у середньому до 13 якісних ооцитів на тиждень від тварини). Ця методика в сполученні з методами дозрівання і запліднення ооцитів *in vitro*, культивування ембріонів *in vitro* до стадії морули-бластоцисти, дозволяє протягом 6 місяців одержати в 4 рази більше придатних для нехірургічної трансплантації морул-бластоцист від одного донора порівняно із стандартною методикою одержання морул-бластоцист *in vivo* на 6...8-й день після штучного запліднення гормонально-оброблених корів-донорів, і не позначається негативно на відтворних якостях донорів ооцитів, у тому числі на стані яєчника і піхви, здатності тварин до виношування плоду.

Ооцити і отримані *in vitro* зиготи великої рогатої худоби можна кріоконсервувати, що дозволяє здійснювати наступні маніпуляції з клітинами в найбільш зручній для проведення експериментів час, а також створити кріобанк ооцитів різних порід худоби, що, поряд із спермобанком і ембріобанком, буде істотним внеском у збереження рідких і зникаючих порід худоби.

Дослідження дозрівання і запліднення ооцитів сільсько-господарських тварин поза організмом можуть бути основою для розробки і впровадження методів клітинної і генетичної інженерії у тваринництві. Так, недавніми дослідженнями було показано, що ембріони великої рогатої худоби, отримані *in vitro*, можна використовувати для клонування шляхом пересадження ядер ембріонів в ооцити, що дозріли *in vitro*.

Розробка системи запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку ембріонів ссавців поза організмом тварини (*in vitro*) має

величезне значення у вирішенні ряду наукових завдань і практичних питань, спрямованих на підвищення ефективності розведення тварин.

Система запліднення *in vitro* може бути використана, насамперед, як цінний аналітичний інструмент для вивчення біохімічних і фізіологічних факторів, що включаються в процес запліднення, з'єднання чоловічої і жіночої гамет. Тільки з освоєнням техніки запліднення поза організмом з'явилася реальна можливість для широкого розповсюдження досліджень з генної і клітинної інженерії й особливо сільськогосподарських тварин. З цією метою необхідні ембріони на ранніх стадіях розвитку, які можна вилучити тільки з хірургічним методом з яйцепроводів, що є трудомістким процесом і не дає достатнього числа зародків для проведення роботи. До того ж, методи гормональної регуляції відтворної функції в сільськогосподарських тварин, що існують, не дозволяють досягти високої точності контролю часу овуляції і внаслідок цього одержати достатнє число ембріонів на бажаній стадії розвитку. Методи клітинної і генної інженерії тварин передбачають також проведення тривалих маніпуляцій з гаметами і ембріонами поза організмом. Усі ці проблеми значною мірою можуть бути вирішені з використанням системи запліднення яйцеклітин ссавців поза організмом.

Запліднення яйцеклітин ссавців *in vitro* відбувається за таких основних етапів: дозрівання ооцитів, капацитація сперматозоїдів, запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку ембріонів.

**Дозрівання ооцитів *in vitro*.** Велика кількість статевих клітин у яєчниках ссавців, зокрема у великої рогатої худоби, овець і свиней з високим генетичним потенціалом, має відтворну здатність цих тварин прискорювати генетичний прогрес, порівняно з використанням можливостей нормальної овуляції. У цих видів тварин, як й інших ссавців, число ооцитів, які овулюють спонтанно під час охоти, становить тільки незначну частину від тисяч ооцитів, що знаходяться в яєчнику при народженні тварини. Інші ооцити регенерують усередині яєчника або, як кажуть, піддаються *атрезії*. Тому виникло питання, чи не можливо вилучити ооцити з яєчників шляхом відповідної обробки і провести їх подальше запліднення поза організмом тварини. У даний час не розроблено методів використання всього запасу ооцитів у яєчниках тварин, але значне число ооцитів може бути отримане з порожнини фолікулів для подальшого їх дозрівання і запліднення поза організмом.

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

Однією з причин може бути те, що за дозрівання ооциту *in vitro* у цитоплазмі не виробляється в достатній мері фактор, що контролює формування і розвиток чоловічого пронуклеуса. Вважають, що для появи в цитоплазмі ооциту фактора, що викликає дозрівання чоловічого пронуклеуса, необхідно забезпечити індуктивний вплив нормального оточення ооциту в фолікулі протягом не менше 6 год. після початку мейотичного дозрівання.

Це було підтверджено в дослідах по заплідненню *in vitro* ооцитів свиней, витягнутих з фолікулів на різних стадіях мейозу. Установлено, що стероїдні гормони не потрібні для запуску мейозу в ссавців, але необхідні для повного фізіологічного дозрівання ооциту.

У зв'язку з тим, що стероїдні гормони й інші фактори, які вироблюються фолікулярними клітками, впливають на дозрівання ооцитів, було зроблено припущення, що культивування ооцитів з фолікулярними клітинами може підвищити їх здатність до нормального запліднення і наступного ембріонального розвитку. Багато явищ усередині фолікула, включаючи біосинтез стероїдів і синтез білків, регулюються гонадотропними гормонами. Тому, за культивування ооцитів усередині фолікулів або з фолікулярними клітинами, гонадотропіни повинні бути обов'язковою складовою частиною середовища.

Необхідність прямого контакту між соматичними (фолікулярними) клітинами і статевими клітинами обумовлена рядом причин. Фолікулярні клітини відіграють важливу роль у живленні ооциту. Вони забезпечують енергетичний субстрат ооциту, беруть участь у перенесенні деяких попередників амінокислот, нуклеотидів і фосфоліпідів в ооцит, генерують інструктивні сигнали, що впливають на ядро і прямий синтез визначених структурних білків. Інструктивні сигнали, що необхідні для дозрівання ооцитів, найбільш важливі в перші 6...8 год. після ініціації.

Незважаючи на низький вихід ооцитів, за кожного витягу, можливість багаторазового використання тварини, з урахуванням інформації про походження отриманих ооцитів, відкриває нові перспективи застосування методу запліднення *in vitro* у практичних цілях.

**Капацитація сперматозоїдів.** Важливим етапом у розробці методу запліднення в ссавців було відкриття явища капацитації сперміїв. У 1951 р. М.К. Чанг і одночасно з ним Г.Р. Аустин установили, що запліднення в ссавців настає тільки в тому випадку, якщо спермії протягом декількох годин до овуляції знаходяться в яйцепроводі тварини. Ґрунтуючись на спостереженнях щодо вивчення проникнення сперміїв у яйцеклітини пацюка в різні терміни після парування, Аустин увів термін *капацитація*. Він означає, що в сперміях повинні відбутися деякі фізіологічні зміни до того, як він набуде здатності до запліднення.

Капацитація включає початкову зміну мембрани спермія, що дозволяє йому пройти другу фазу (акросомну реакцію). В даний час першу фазу позначають як власне капацитацію, а другу – як акросомну реакцію.

Розроблено кілька методів капацитації еякульованих сперміїв домашніх тварин. Для видалення білків з поверхні сперміїв, які, очевидно, гальмують їх капацитацію, було використано середовище з високою йонною силою.

Найбільш ефективним способом видалення сім'яної плазми бугаїв і розріджувача в дослідженні запліднення *in vitro* є центрифугування, режими якого можуть бути різними. Для звільнення від плазми і розріджувача, також, застосовують метод *swim-up*, його суть у спливанні сперміїв з активним поступальним рухом із дна пробірки в поверхневий шар чистого середовища, що дозволяє не лише здійснити капацитацію, а і відбирати найбільш життєздатні гамети. Іншим ефективним методом відбору сперміїв бугаїв з високою рухливістю для запліднення *in vitro* є їх розподіл у градієнтах перколу.

Іонофор А23187 є ефективним індуктором капацитації і акросомної реакції сперміїв ссавців. У концентрації 0,1 мкМ і більше він різко підсилює проникність мембран сперміїв для йонів кальцію, що супроводжується швидкою втратою рухливості сперміїв. Однак, внесення в середовище БСА (сироватковий альбумін бугаїв) незабаром після обробки чоловічих гамет іонофором сприяє збереженню їх рухливості, імовірно, внаслідок припинення надходження великої кількості йонів кальцію в цитоплазму спермія і видалення його надлишків. У плазматичній мембрані при цьому залишається достатня кількість іонофору для надходження прийнятних доз йонів кальцію в цитоплазму спермія і, отже, для



індукції кальцій-залежної акросомної реакції сперміїв.

Ефективним способом прискорення капацитації сперміїв бугаїв є їх обробка розчином з високою іонною силою (380...390 мОсм/кг), що характеризується підвищеною концентрацією хлориду натрію. Після обробки сперміїв середовищем з високою йонною силою, їх відмивають від цього середовища центрифугуванням й інкубують протягом певного часу в ізотонічному середовищі для докапацитації.

Капацитацію сперміїв бугаїв можливо індукувати за допомогою фолікулярної рідини корови; теплова обробка фолікулярною рідиною за температури 56°C дозволяє запобігти згортанню білків і уникнути злипання чоловічих гамет.

Відомо, що рідина яйцепроводів корів і теличок, що в стані охоти, викликає капацитацію сперміїв бугаїв. Запліднення *in vitro* дозрілих поза організмом ооцитів корів сперміями бугая, преінкубованими в середовищі з 25% еструсною рідиною яйцепроводів теличок, призвело до *пенетрації* (проникнення сперміїв у яйцеклітину) 70% ооцитів, у той час як у контролі (преінкубація сперміїв у середовищі без рідини яйцепроводів) – було отримано пенетрацію лише 1% ооцитів.

На ефективність капацитації сперматозоїдів і запліднення яйцеклітин *in vitro* впливає також рН середовища. У свиней і овець зареєстрований найвищий відсоток пенетрації за капацитації сперміїв кнурів у середовищі з рН 7,8 перед додаванням до середовища запліднення з рН 7,4. Для великої рогатої худоби – навпаки, рН середовища 7,4 є оптимальним для капацитації сперміїв, а рН 7,8 – для запліднення ооцитів.

Важливим фактором, що впливає на запліднення *in vitro* дозрілих поза організмом яйцеклітин корів, є температура спільної інкубації чоловічих і жіночих гамет. Зазначимо, що ефективність запліднення залежить від температури дозрівання ооцитів – частіше запліднювалися ооцити, які дозріли *in vitro* за температури 39°C, ніж ооцити, що дозріли за більш низької температури.

Однак, найбільшого визнання дістав спосіб капацитації сперміїв з використанням гепарину. Пайети з замороженою спермою бугая відтають у водяній бані за температури 39°C протягом 30...40 сек. Після 15 хв. інкубації з гепарином (200 мкг/мол) суспензію розріджують до концентрації 50 мільйонів сперматозоїдів у мол.

Використовуючи прийом багаторазової зміни середовища, можна в кілька разів збільшити ефективність використання однієї

порції еякуляту, що особливо важливо при застосуванні сперми від високоцінних бугаїв-запліднювачів.

**Запліднення *in vitro*.** Запліднення яйцеклітин у ссавців здійснюється в яйцепроводах. Це ускладнює доступ дослідника до вивчення умов середовища, у якому відбувається процес запліднення. Тому система запліднення *in vitro* була б цінним аналітичним інструментом для вивчення біохімічних і фізіологічних факторів, що включаються в процес успішного з'єднання гамет. Більш того, передбачалося, що ця система знайде застосування в технології розведення тварин.

За проведення дослідів щодо запліднення *in vitro* велике значення має концентрація спермій під час його виконання. Так, при заплідненні *in vitro* дозрілих поза організмом ооцитів корів суспензіями спермій з різною концентрацією чоловічих гамет ( $0,125 \dots 4,0 \times 10^6$  Сп/мол) найбільша кількість пенетрованих ооцитів спостерігалася за концентрації  $1,0 \times 10^6$  Сп/мол.

Запліднюваність *in vitro* яйцеклітин тварин залежить також від тривалості спільної інкубації зі сперміями. За спільною інкубацією чоловічих і жіночих гамет великої рогатої худоби протягом 6, 12, 24 або 48 годин найвищий відсоток дроблення був отриманий після 24-годинного запліднення.

Значний інтерес викликають дослідження щодо пошуку нових технологій одержання ембріонів *in vitro*.

Пенетрація яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них спермій за допомогою заточеної мікропіпетки. Як показали експерименти на кролях, такі яйцеклітини можуть нормально розвиватися *in vitro* до стадії бластоцисти, а пересаджування їх реципієнтам призводить до народження нащадків. Основною проблемою при цьому є загибель багатьох яйцеклітин через ушкодження в процесі мікроін'єкції. Однак, цей спосіб запліднення жіночих гамет, за якого капациація і акросомна реакція спермій не є необхідними, має ту перевагу, що дозволяє використовувати для запліднення не тільки нормальні, а й нерухомі, мертві, дефектні спермії або їх голівки. Було здійснено успішну спробу запліднення *in vitro* ооцитів корів шляхом ін'єкції в їх цитоплазму спермій (по одному в кожену яйцеклітину), що вважалися біологічно мертвими через втрату рухової активності після заморожування-відтаювання. При трансплантації морул і бластоцист, отриманих *in vitro* із запліднених цим методом яйцеклітин, було отримано телят. Крім

того, ін'єкція сперміїв у ооплазму (метод *ICSI*) може підвищити ефективність використання способу розподілу чоловічих гамет на X- і Y-спермії за допомогою проточної цитометрії, результатом якої є невисока концентрація і знижена життєздатність відібраних у такий спосіб сперміїв.

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

Проколювання прозорої оболонки ооцитів миші, що овульовали, дозволяє перебороти *in vitro* нездатність сперміїв мишей деяких генотипів до запліднення.

Метод часткового розсічення прозорої оболонки (ЧРО) ооцитів може бути використано для подолання незапліднюваності яйцеклітин.

За розсічення мікроголкою невеликої ділянки прозорої оболонки зрілих ооцитів людини одноденного віку, що не запліднилися *in vitro* перший раз, майже половина яйцеклітин (45%) формували чоловічий і жіночий пронуклеуси після повторного запліднення, але при цьому 23% зигот були поліспермними. Кількість яйцеклітин, що розвивалися партеногенетичним шляхом, була незначною – 3,4%.

ЧРО значно підвищує запліднюваність яйцеклітин спермою зі зниженою концентрацією життєздатних чоловічих гамет, а також зі зниженою рухливістю і виживаністю сперміїв.

Перш ніж приступити до мікро маніпуляцій, яйцеклітини поміщають у гіпертонічний розчин сахарози, що викликає стискання ооплазми, і завдяки розширенню перивителинового простору сприяє здійсненню маніпуляцій без пошкодження плазматичної мембрани клітин. Для успішного виконання цієї роботи важливо встановити мінімальну концентрацію сахарози й оптимальну тривалість обробки, тому що надмірність цих факторів призводить до зміни мембранної проникності й ушкодження оолеми.

Крім розширення перивителинового простору важлива роль сахарози полягає також у тому, що, як встановлено на яйцеклітинах

людини, розчин сахарози інгібує множинну penetрацію ооцитів сперміями після просвердлювання або часткового розсічення прозорої оболонки.

**Велика рогата худоба.** Застосовують таку схему запліднення *in vitro* і культивування ранніх ембріонів великої рогатої худоби. Запліднення *in vitro* проводять у краплі модифікованого середовища Тірода. Після дозрівання *in vitro* ооцити частково очищують від навколишніх кумулюсних клітин і переносять по п'ять ооцитів у кожну мікрокраплину. Для досягнення у краплинах концентрації сперміїв 1,0...1,5 млн/мол, їх суспензію обсягом 2...5 мкл додають до середовища з ооцитами. За 44...48 год. після запліднення визначають наявність дроблення ооцитів. У подальшому ембріони поміщають на моношар епітеліальних клітин для наступного розвитку протягом 5 днів.

**Вівці.** Запліднення овець досліджували двома шляхами: *in vitro* і введенням фолікулярних ооцитів у яйцепровід заплідненої вівці. Як і у великої рогатої худоби, число запліднених яйцеклітин було більшим тоді, коли фолікулярні ооцити, що овулювали, поміщали в яйцепровід разом зі сперміями. За використання системи запліднення *in vitro* таких клітин було менш.

**Свині.** До теперішнього часу невідомі будь-які дані про запліднення *in vitro* ооцитів свиней. Разом із тим, деякі дослідники спостерігали проникнення сперміїв в ооцити свиней після дозрівання їх *in vitro* і пересадження заплідненій естральній свиноматці, але жоден ооцит не продовжував розвиток і в багатьох із них спостерігалася поліспермія.

Інші автори повідомили про нормальне запліднення і розвиток в аналогічній системі ооцитів, отриманих з яєчників свиней. Можливо тільки після повного дозрівання ооциту в організмі тварини відбувається блокування поліспермії, нормальне запліднення і подальший розвиток ембріонів цього виду.

Більш успішних результатів досягнуто за культивування *in vitro* ранніх ембріонів свиней. Так, після 48 год. культивування 1...4-клітинних ембріонів свиней і наступного їх хірургічного пересадження було досягнуто вагітності в двох з 13 тварин. Після культивування 8-клітинних ембріонів протягом 48 год. до стадії бластоцисти з наступним пересадженням 19 свиноматкам-реципієнтам, 10 тварин були супоросними під час забою через 21 день, але тільки 51 з 229 ембріонів були представлені живими

плодами.

**Культивування ембріонів *in vitro*.** Для культивування зародків великої рогатої худоби застосовують різні середовища: *Ham F-10*, 199, Тірода й ін., до складу яких повинні входити енергетичні компоненти – піруват натрію, лактат натрію і глюкоза. Обмін речовин в ембріонах на різних стадіях розвитку має свої особливості. Так, для ембріонів корів на ранніх стадіях дроблення як енергетичний субстрат краще використовувати піровиноградну кислоту. Після блок-стадії більш придатним для метаболізму субстратом є глюкоза – її засвоєння і переробка на стадії бластоцисти різко підвищується порівняно з піруватом натрію.

У середовища для культивування ембріонів додають 10...20% фетальної сироватки теляти. Середовища мають бути збалансовані за концентрацією водневих йонів (рН 7,2...7,4) і осмолярністю (280...285 мОсм/кг). Зміна осмолярності в результаті випарування води протягом інкубації призводить до порушення запліднення яйцеклітин і розвитку зародків, тому ооцити і ембріони культивують у зволоженій атмосфері повітря в чашках Петрі в краплях середовища під вазеліновою олією або в закритих культуральних судинах. Вазелінова олія, що використовується для запобігання зміни осмолярності середовища, повинна бути попередньо зрівноважена середовищем культивування, тому що в протилежному разі, в ній можуть розчинятися деякі компоненти середовища. Газова суміш, що найчастіше використовується для культивування ембріонів, складається з 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> і 90% N<sub>2</sub>. Зародки культивують у середовищі за температури 39°C в умовах максимальної вологості.

Однак, численні експерименти показали, що культивування ембріонів великої рогатої худоби в культуральних середовищах, як правило, призводить до зупинки дроблення ембріонів на 8...16-клітинній стадії їх розвитку. Спроби вдосконалювання середовищ і методики культивування ранніх ембріонів, починаючи з одноклітинної стадії, не призвели до вирішення цієї проблеми – лише поодинокі ембріони розвивалися до морули і бластоцисти, тобто стадій, за досягнення яких ембріони можуть бути пересажені реципієнтам нехірургічним методом. Другим критичним етапом у розвитку ембріонів великої рогатої худоби є перехід від морули до бластоцисти.

Подолання блокування дроблення можливе шляхом пересадження ембріонів у яйцепровід проміжного реципієнта. Як

проміжних реципієнтів, що забезпечують розвиток ранніх ембріонів великої рогатої худоби *in vivo* до морули-бластоцисти, використовують кролиць. До недоліків цього способу, що обмежують його масове застосування, відноситься не лише використання в дослідах живих реципієнтів і необхідність проведення хірургічної трансплантації, а й можливі втрати ембріонів за їх вилучення з реципієнтів.

Імовірно, ефективним способом розвитку ембріонів сільськогоспо-дарських тварин може стати їх культивування в ізольованих яйцепроводах. Наприклад, культивування запліднених яйцеклітин свиней в умовах органної культури в ізольованих яйцепроводах мишей, витягнутих після індукції в них овуляції і спарювання із самцями, призвело до розвитку 78% зародків свиней і 23,8% і 24,0% зародків великої рогатої худоби до стадії морули-бластоцисти. Вважають, що гормональна обробка самок мишей сприяла утворенню клітинами яйцепроводу мишей певних факторів росту, що сприяють розвитку ембріонів. Серед цих речовин є інсулінподібні фактори росту, що виявлені в яйцепроводах миші. У яйцепроводах корів під час проходження ембріонів знайдено пептид, подібний епідермальному факторові росту.

Культивування ембріонів *in vitro* у культуральному середовищі є найбільш простим і дешевим способом їх розвитку до морули-бластоцисти. Подолання блокування дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* потребує наявності в середовищі культивування біологічно активного компонента, який вироблюється деякими клітинними системами.

Установлено, що система моношару ендометріальних фібробластів добре підходить для культивування розділених ембріонів великої рогатої худоби. Про сприятливий вплив трофобластичних пухирців 13,5-денних ембріонів великої рогатої худоби на розвиток інтактних і розділених на половинки 8...16-клітинних ембріонів великої рогатої худоби повідомили Р. Роурі й ін. Додавання до середовища культивування маточних факторів – фібронектину і гепарину – сприяло розвитку 36% ембріонів великої рогатої худоби до 16-клітинної і більш пізніх стадій розвитку. На можливість використання амніотичної порожнини ембріона курчати для розвитку ембріонів великої рогатої худоби до стадії морули-бластоцисти вказують Блейквуд й ін. До числа найбільш ефективних клітинних систем, які використовують для культивування ембріонів

великої рогатої худоби, відносяться моношар епітеліальних клітин яйцепроводу і моношар клітин гранулези корів.

Культивування запліднених яйцеклітин корів може здійснюватися також без прямого контакту з моношаром епітеліальних кліток яйцепроводів корів. Наприклад, при відділенні зародків мікропорової мембраною або в середовищі, в якому попередньо культивували епітеліальні клітки яйцепроводу, а також, як показали недавні дослідження, у синтетичній рідині яйцепроводів.

Здатність моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів до підтримки розвитку ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* до стадії бластоцисти пов'язана із секрецією клітин моношару в середовище культивування білків з різною молекулярною вагою. Встановлено, що низькомолекулярний білок, який секретується моношаром епітеліальних клітин яйцепроводів корів ( $< 10$  кда), як і фетальна сироватка теляти, впливає на перші розподіли дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* до 8-клітинної стадії, а білок (білки) з більш високою молекулярною вагою ( $> 10$  кда) сприяє розвитку ембріонів від 8-клітинної стадії до стадії бластоцисти.

Установлено позитивний вплив різних факторів росту на розвиток ембріонів поза організмом. Фактори росту продукуються як самим ембріоном (аутокринні), так і, наприклад, епітелієм яйцепроводів і матки (паракринні). Так, додавання в середовище культивування ембріонів інсулінподібного фактора росту (ІФР) або епідермального фактора росту (ЕФР) сприяє розвитку ембріонів великої рогатої худоби до стадії бластоцисти. ІФР та інсулін сприяють дробленню і компактизації ембріонів, формуванню бластоцисти, стимулюють синтез білка в трофоектодерме (ТЕ) і внутрішньоклітинній масі (ВКМ), тим часом як ЕФР, ефективний у період розвитку від морули до бластоцисти, стимулює синтез білка в ТЕ; тромбоцитарний фактор росту сприяє розвитку ембріонів великої рогатої худоби в середовищі без сироватки до і після 8-клітинної стадії. Фактор росту, що трансформує (ТФР), і основний фактор росту фібробластів сприяють формуванню бластоцисти; крім того, ТФР стимулює поглинання ембріоном амінокислот і сприяє експансії бластоцілі.

## 5.4. Методи регулювання статі тварин, визначення статі ранніх ембріонів

Отримання тварин визначеної статі є не тільки біологічною, а й практичною проблемою. Це особливо важливо для молочної худоби, в якій головна господарсько-корисна ознака – молочна продуктивність – належить до тих, що обмежені статтю. Тому виникає завдання щодо регулювання співвідношення статі, що необхідно для ефективного розведення тварин.

Статеві відмінності стосуються багатьох ознак, але в основі детермінації і диференціації статі у ссавців лежить хромосомна теорія спадковості.

*Детермінація і диференціація статі.* У соматичних клітинах телиці або корови є 58 аутосом і дві Х-хромосоми, а в соматичних клітинах бугая – 58 аутосом, одна Х-хромосома і одна Y-хромосома. Іншими словами, корови мають статеві хромосоми ХХ, бугаї – ХУ. Решта хромосом – аутосоми – у тварин різної статі однакові. Статеві хромосоми відрізняються від аутосом формою, розмірами і структурою. Їх легко ідентифікувати і відокремити від аутосом. У ссавців спадкоємство статі відбувається за типом моногібридного аналізуючого схрещування. Поведінка статевих хромосом під час мейозу є механізмом, що саморегулюється. В процесі тривалої еволюції на основі цього механізму із покоління в покоління у популяціях тварин підтримується співвідношення гамет з Х- і Y-хромосомою 1:1, а отже, і співвідношення статі 1:1.

Які статеві хромосоми перейдуть із гамет до зиготи, ознаки такої статі і будуть властиві тварині. Статеві відмінності в каріотипі можуть бути виражені дуже просто: на додаток до основного набору генів, однакового у самців і самок, самці ссавців відрізняються однією унікальною хромосомою Y, властивою лише їм. Проте наявність тільки цієї унікальної хромосоми із 60 хромосом великої рогатої худоби призводить до яскраво вираженого статевого диморфізму, тобто прояву в індивідуумів різної статі, що відносяться до одного виду, добре видимих відмінностей за рядом ознак. Це призводить до суперечності механізму визначення статі: прояв яскраво вираженого статевого диморфізму за незначних генетичних відмінностей між статями.

Є багато ознак, за якими розрізняються тварини різної статі. У ссавців, у тому числі й у великої рогатої худоби, в основному



виділяють первинні і вторинні ознаки.

До первинних статевих ознак відносять ті морфологічні і фізіологічні ознаки, що забезпечують утворення гамет та їх злиття в процесі запліднення. До них можна віднести гонадою і статеві шляхи самок і самців. За створення первинних статевих ознак відповідальні лише статеві хромосоми. Під детермінацією, або власне визначенням статі, зазвичай розуміють генетичний контроль статі гонади. Іншими словами, статеві відмінності в каріотипі суттєві або значимі лише в первинному або гонадному визначенні статі.

У ссавців гонади закладаються в онтогенезі однаковими у індивідів різної статі. За відсутності в ядрі клітини Y-хромосоми недиференційовані гонади ембріона розвиваються в яєчники. Якщо в наборі хромосом раннього ембріона є Y-хромосома, напрям статевого розвитку змінюється, і гонади, що раніше були недиференційовані, розвиваються в сім'яники. Як установлено, гени, що містяться в Y-хромосомі, необхідні для сперматогенезу.

Доведено, що стать детермінують не статеві хромосоми як структурні спадкові одиниці, а локуси і локалізовані в них гени. Так, функція детермінації сім'яників приписується локусу в короткому плечі Y-хромосоми, в якому знаходиться H-Y-ген. Як тільки диференціювання гонад у ембріона визначене, функція цього андроспецифічного гена і його продукту – H-Y-антигени практично виконана і ген переходить в інактивний стан. Після цього головну роль відіграють вторинні статеві ознаки, що безпосередньо не беруть участі в процесах гаметогенеза і запліднення, але пов'язані із статевим розмноженням і забезпечують відтворення потомства. У самок ссавців серед вторинних статевих ознак особливо виділяється молочна залоза.

Проте у вторинній або екстрагенній детермінації статі провідну роль відіграє чоловічий стероїдний гормон тестостерон. Він відповідальний за розвиток сім'явивідної протоки з вольфового каналця і зовнішніх статевих органів. Надалі під впливом тестостерону розвивається система зовнішніх статевих органів самця.

Доказом того, що розвиток вторинних статевих ознак контролюється статевими гормонами, є зміна ознак після кастрації.

Класичні дослідження, проведені на початку 20-х років академіком М.М. Завадовським, переконливо продемонстрували, що індиферентний стан ссавців ближче до жіночої статі, ніж до чоловічої.

У розвитку жіночих статевих протоків гормони не беруть участі. Цей механізм – залежність розвитку чоловічих і незалежність розвитку жіночих протоків від гормонів – забезпечує нормальний ембріональний розвиток ссавців, у яких жіночі гормони легко проникають через плаценту або виробляються в ній. Вплив естрогену на статеву диференціацію привів би до блокування розвитку статевих ознак самців в утробі матери.

Таким чином, розвиток характерних для самців статевих ознак пов'язаний з послідовною дією двох факторів: генетичного, або гонадного, і гормонального, або екстрагонадного.

Перші ознаки диференціації статі у ссавців виявляються в ембріогенезі дуже рано. Такою ознакою є статевий хроматин, або тільце Барра. Статевий хроматин можна виявити в інтерфазних ядрах клітини, в яких тільце Барра міститься у вигляді забарвленого дископодібного тільця. Тільце Барра, як правило (60...70%), є в ядрі клітин особин жіночої статі. Воно відсутнє або міститься лише в небагатьох ядрах (5...10%) у особин чоловічої статі. Внаслідок цього тільце Барра дістало ще назву – жіночий статевий хроматин.

У більшості випадків виявлення в ядрі інтерфазної клітини тільця Барра вважається початком статевої диференціації. Так, у миші в соматичних клітинах інактивація Х-хромосом починається з 3-ї доби, в тканинах ембріона – на 6-ту добу ембріонального розвитку. У свині статевий хроматин можна виявити у ембріона на стадії 20...45 клітин.

Слід зазначити, що у всіх видів ссавців утворення статевого хроматину суттєво випереджає диференціювання гонад. Тому статевий хроматин може бути раннім маркером статі, хоча він не має відношення до детермінації і диференціації статі.

Іншою ознакою статі, що рано виявляється в ембріогенезі, є Н-У-антиген. Було встановлено унікальну еволюційну консервативність цього мембранного гена, що привело до розуміння його головної ролі в детермінації статі – у особин гетерогаметної статі диференціація гонад відбувається під впливом Н-У-антигена, причому диференціація сім'яника в ембріогенезі виникає раніше, ніж диференціація яєчника. Тому антиген Н-У, скеровуючи морфогенез сім'яників, визначає первинну, або гонадну, стать ссавця. Якщо видалити Н-У-антиген, гонадні клітини ХУ приступають до морфогенезу яєчників.

Експериментальні дані, отримані на лабораторних тваринах,

були підтверджені й у дослідах на великій рогатій худобі. Так, недиференційована ембріональна гонада великої рогатої худоби з каріотипом XX, поміщена в поживне середовище клітин Дауді, що містить до 5% білків у формі H-Y-антигена, диференціювалася в сім'яник, причому в більш ранні терміни, ніж за нормального ембріогенезу.

Зручною моделлю, на якій можна вивчати детермінацію і диференціацію статі, є фримартини великої рогатої худоби. Якщо від корів одержують різностатевих двійнят, то в середньому 90% телиць залишаються стерильними, а бугайці народжуються нормальними. Теличка з різностатевих двійнят фенотипічно не відрізняється від нормальних телиць, та безпліддя виникає через те, що її гонади являють собою овотестис, тобто статева залоза складається з більшої частки сім'яникової тканини і меншої частки оваріальної.

Первинна причина цієї стерильності була з'ясована ще в 1916 р. *F. Lillie*. При подвійній тільності спостерігалось зростання зародкових оболонок на ранній стадії ембріонального розвитку і внаслідок цього – синхоріальний судинний анастомоз, що приводить до загального кровообігу. Фенотипово геніталії фримартинів нормальні, але замість похідних мюллерової протоки (матка і фаллопієві труби), які або рудиментарні, або відсутні зовсім, часто помітні похідні Вольфового протоку (епідидиміс, сім'япровід).

Нині з'ясовано, що в гонадах фримартини виявляється H-Y-антиген, що пояснюється переміщенням по загальному кровоносному руслу H-Y-антигена від бугайця-близнюка. H-Y-антиген зв'язується з рецепторами клітин яєчника і в період ембріогенезу спрямовує його диференціацію у бік створення сіменника.

Із сказаного не слід робити висновок, що стать є моногенною ознакою і визначається лише одним геном. Стать – це складна ознака, обумовлена полігенною спадковістю. У детермінації статі, гонади, гаметогенезу і запліднення беруть участь багато генів, що взаємодіють між собою, визначаючи послідовність активності. Статеві хромосоми ссавців в процесі тривалої еволюції відіграють особливу роль у формуванні статі, забезпечуючи альтернативне спадкоємство її при полігенному визначенні його ознак. У статевих хромосомах сконцентровані гени, що детермінують і диференціюють стать. До них, насамперед, відноситься ген регулятор H-Y у Y-хромосомі, що і виконує головну роль в детермінації чоловічої статі.

### 5.4.1. Методи попереднього відбору гамет за статтю

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

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

**Центрифугування і седиментація.** Перша спроба регулювання статі за допомогою центрифугування була зроблена ще у 1925 році, але експеримент не дав позитивних результатів. У 1976 році було проведено центрифугування сперми кроля з використанням градієнта гущини у глюкозо-жовточно-цитратному середовищі із додаванням 12% лактози. Час центрифугування складав 15 хвилин, при 1000 об/хв. за температури 20°C. У результаті осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції було отримано 58,6% самців, а з нижньої – 40,1%. Повторне центрифугування сперми не привело до розширення зрушення щодо статі у нащадків.

Виходячи з припущення, що спермії з X-хромосомою через свою більшу масу, будуть швидше осаджуватися, ніж спермії з Y-хромосомою, було використано метод седиментації. Осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції привело до народження високої долі самців (27:7), а з нижньої фракції – самок (27:11). Однак, спермії бугая цим методом поділити не вдалося.

Проводилася седиментація сперми бугая за допомогою градієнта щільності у середовищі, що складалося зі знежиреного молока і яєчного жовтка. Процес розділення спермій закінчувався через 1...3 години. Запліднення спермою з нижніх фракцій викликало

народження 70% телиць, а з верхньої фракції – 63,9%. Однак, середовище з знежиреного молока і яєчного жовтка не вдалося чітко стандартизувати, тому метод виявився ненадійним і не знайшов використання на практиці.

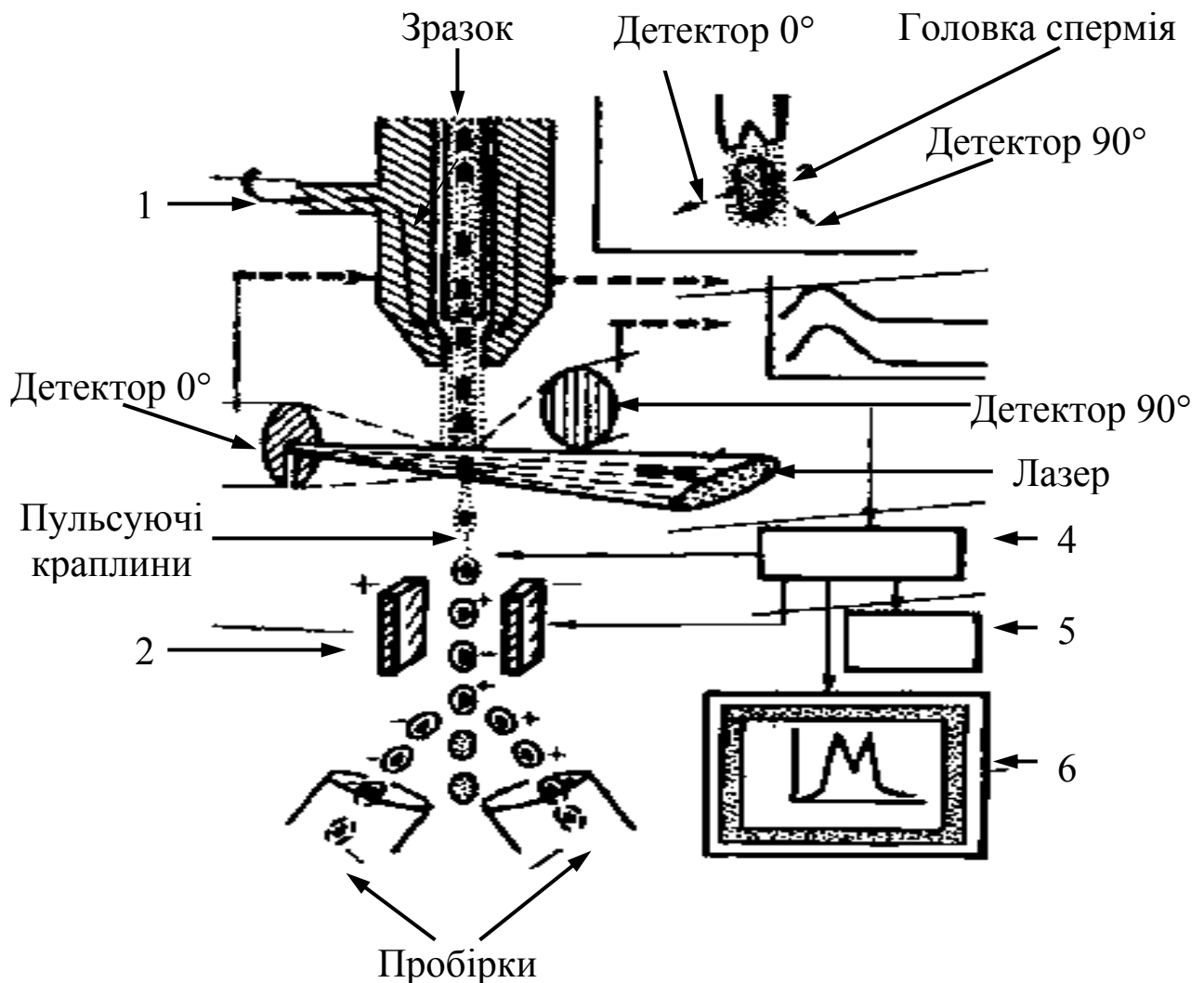
Суперечливість результатів експериментів щодо регулювання співвідношення статі у нащадків, заснованих на розділенні сперміїв за їх масою, пояснюється тим, що маса сперміїв характеризується значною варіабельністю і не має достатньо вірогідного зв'язку з X- і Y-хромосомами. Здебільшого спермії з Y-хромосомою були легші, ніж спермії з X-хромосомою всього на 2...4%.

**Метод фільтрації.** В основу методу покладена різна рухливість сперміїв з різними статевими хромосомами. Так, більш легкі спермії з Y-хромосомою володіють більшою рухливістю і швидше проходять через в'язкий шар сироваткового альбуміну бугая (БСА). Була використана вертикальна колонка з трьома шарами, причому концентрація альбуміну збільшувалася зверху вниз. За допомогою забарвлення сперміїв акрихіном було встановлено, що нижня фракція містить до 85% сперміїв із статевої Y-хромосомою. Біологічної перевірки методу на самках зроблено не було. Подальші перевірки цього методу мали суперечливі результати. Використання зазначеного методу в 1975 році дало можливість отримати 58,6% бугаїв з 158 телят, що народилися від штучно запліднених сперміями з Y-хромосомами корів.

**Електрофорез.** Уперше припущення щодо різної поведінки сперміїв у магнітному полі зробив біолог М.К Кольцов у 1930 році. Було встановлено, що спермії кролів з X-хромосомами в процесі електрофорезу спрямовуються до аноду, спермії з Y-хромосомою – до катоду. У 60-х роках ця гіпотеза була підтверджена отриманням надлишку самок у нащадків кролів після штучного осіменіння анодними сперміями і самців після штучного осіменіння катодними сперміями. Однак, розділення сперми бугаїв на фракції за допомогою електрофорезу не дало позитивного результату і різниця між нащадками різних статей, отриманих за запліднення корів різними фракціями сперми, виявилася статистично невірогідною.

**Використання лазера.** Встановлено, що спермії з X-хромосомами містять більше ДНК, ніж спермії з Y-хромосомами, ця різниця для сперми кнурів становить 3,4%, бугаїв – 3,8%, баранів – 4,2%, а позитивні або негативні заряди клітин залежать від кількості ДНК. При використанні лазера спермії спочатку проходили

флуоресцентну обробку, після чого їх пропускали через лазерний промінь і під впливом негативно і позитивно заряджених пластин вони відхилялися у відповідний бік. Успішно проведено досліди з розподілу сперміїв кроля з X- і Y-хромосомами (рис. 58).



**Рис. 58. Лазерний сортер для розподілу суспензій сперміїв на X- та Y-хромосоми:**

1 – термостабілізуюча рідина; 2 – пластини, що відхиляються; флюоресцентні сигнали; 4 – комп'ютер; 5 – дискета; 6 – дисплей (за Ф.І. Осташко, 1995)

Однак, слід зазначити, що описані методи розподілу сперміїв ще недосконалі і їх неможливо рекомендувати для поширеного використання на практиці.

## 5.4.2. Методи визначення каріотипу і відбору ембріонів за статтю

З розвитком методів трансплантації і клонування ембріонів усе більшого значення набуває попередній відбір ембріонів за статтю і особливостям каріотипу. Впровадження методу визначення статі ембріонів перед їх трансплантацією дозволить цілеспрямовано одержувати бугаїв-трансплантантів для племпідприємств, успішно вирішувати ряд інших практичних питань у тваринництві. Наприклад, для розширеного відтворення стада у товарних господарствах, що спеціалізуються на виробництві молока, бажано одержувати теличок, а в товарних господарствах, що спеціалізуються на виробництві яловичини, – бугайців. Упровадження методів ідентифікації статі в доімплантаційних ембріонів дозволить уникнути одержання безплідних теличок-фримартинів за трансплантації реципієнтові двох ембріонів.

З цією метою використовують методи визначення каріотипу зародка (наявність Х- і Y-хромосом) або імуногенетичне визначення наявності спеціальних Н–Y-антигенів, що містяться в зародках чоловічої статі.

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

**Цитогенетичний метод** визначення статі пізніх (9...14-денних) і ранніх ембріонів великої рогатої худоби заснований на ідентифікації чоловічих і жіночих метафазних статевих хромосом після культивування ембріонів у середовищі з митостатиком.

Методи оцінки пізніх ембріонів, однак, не знайшли значного розповсюдження через суттєве зниження їх приживаності порівняно з ембріонами більш ранніх стадій розвитку (6,5...8-денні). Цитогенетичний метод оцінки ранніх ембріонів, на відміну від інших методів аналізу, дозволяє не тільки визначити їх стать, а й ідентифікувати ряд хромосомних порушень, що, як відомо, є однієї з причин загибелі ембріонів, і, таким чином, вирішити питання про доцільність пересадження частини ембріона, що залишилася. Можливість установлення хромосомних аберацій дозволяє застосовувати метод при з'ясуванні причин аномального розвитку зародків, вивченні впливу на якість ембріонів препаратів, що використовуються для індукції суперовуляції, та в інших

дослідженнях. Так, дослідження В. Кінга та інших учених, які проведені на 7-денних ембріонах великої рогатої худоби, показали, що морфологічно неякісні ембріони часто мали різні хромосомні порушення, такі як анеуплоїдія, тетраплоїдія і найбільш часто трапляється міксоплоїдія, що в першу чергу було пов'язано з препаратами, за допомогою яких викликала суперовуляція. Спосіб викликання суперовуляції в корів за допомогою ФСГ кращий ніж обробка тварин ГСЖК – найбільша кількість ембріонів з геномними аномаліями була знайдена у тварин, яким ін'єктували ГСЖК.

Разом із тим, низька мітотична активність пізніх морул і ранніх бластоцист, порівняно з ембріонами більш пізніх стадій розвитку, ускладнює їх каріологічний аналіз, тому використання для аналізу 8...10 клітин ембріона часто не дозволяє ідентифікувати стать. Можливість використання цього методу аналізу стосовно пізніх морул і ранніх бластоцист розширилася з удосконалюванням способів розподілу ембріонів на половинки і трансплантації половинок реципієнтам, що дозволяє одержати результати, які можна порівнювати з результатами пересадження цілих ембріонів. У цьому випадку одну половинку можна використовувати для аналізу, а іншу (кращу) кріоконсервувати або короткочасно зберігати в поживному середовищі за високої (+38,0°C) або зниженої (+5,0°C) температури. Після завершення хромосомного аналізу половинку, що залишилася, можна трансплантувати реципієнту і одержати нащадків з відомою статтю.

Однак, використання однієї половинки для аналізу і вилучення її з програми відтворення обмежує застосування цього методу в селекційній роботі. Проте, значимість такого способу оцінки ембріонів значно зростає з удосконалюванням методу одержання препаратів хромосом і розробкою способів множинного клонування ембріонів.

Дослідженнями доведено можливість одержання метафазних хромосом, що дозволяють визначити стать і хромосомні порушення в ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro*. Показано, що додавання гепарину в середовище культивування отриманих *in vitro* бластоцист великої рогатої худоби сприяє значному підвищенню мітотичного індексу, що дає змогу збільшити кількість ембріонів з ідентифікованою статтю. Інкубація бластоцист великої рогатої худоби, отриманих *in vitro*, у середовищі із солкоцерилом дозволяє подовжити X-хромосому, що сприяє визначенню статі ембріонів.



Молекулярно-цитогенетична діагностика є сучасним напрямом у цитогенетиці, мета якої – розробка і вживання нових високоефективних методів аналізу хромосом. Поява молекулярно-цитогенетичних методів відкрила у вивченні хромосом людини і тварин новий вимір – субмікроскопічний рівень. Метод *FISH*-аналізу (*Fluorescence in situ hybridization*) дозволяє об'єктивно виявляти індивідуальні хромосоми і їхні окремі ділянки на метафазних пластинках на основі особливостей їхньої молекулярно-генетичної будови. Об'єктом дослідження в даному разі є особливості нуклеотидного складу конкретної хромосоми або її окремої ділянки.

Класичний метод *FISH*-аналізу заснований на гібридизації відомої за нуклеотидним складом ДНК-проби з ділянкою тестованої хромосоми і з подальшим виявленням результату гібридизації за міткою – флуоресцентним сигналом в очікуваному місці. Метод *FISH*-аналізу перетворився на необхідну аналітичну процедуру в ході цитогенетичного дослідження і став потрібним сьогодні в пре- і постнатальній діагностиці, в моніторингу зигот після штучного запліднення, в процедурі генетичної діагностики (ПГД) передімплантації під час селекції ембріонів з нормальним каріотипом за статтю і так далі. Основні переваги *FISH*-аналізу:

- висока роздільна здатність (на препаратах можна виявляти ті хромосомні порушення, що не візуалізуються в звичайному світловому мікроскопі);
- точність діагностики (розмір проб може варіювати від 90...100 тис. до декількох мільйонів пар нуклеотидів, так що як мішень можуть бути не лише окремі гени або хромосомні ділянки, а й ціла хромосома).
- *FISH*-аналіз дозволяє виявити, наприклад, декілька аномальних клітин серед тисяч з нормальним генотипом.

Зазвичай на третю добу життя в лабораторних умовах від декількох ембріонів – 7...10 мікроманіпулятором беруть один з 6...8 бластомерів. Негайно, протягом декількох годин, проводять *FISH*-діагностику хромосоми або діагностику ДНК однієї клітини за допомогою модифікацій ПЛР-методу. Дуже важливо зазначити, що біопсія ембріону проводиться на тому етапі розвитку, коли всі його клітини – бластомери – не диференційовані, тотипотентні і тому можливе безпечне заміщення видаленої клітини за подальшого дроблення клітин, що залишилися.

**Імунологічні методи.** Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією НҮ-антигену за допомогою антитіл до Н-Ү. Виявлення зв'язування антитіл до Н-Ү-антигену з чоловічими ембріонами здійснюється двома методами. Характерною рисою першого, більш простого методу, є культивування клітин ембріонів у середовищі з комплементом, що приводить до лізису клітин ембріонів чоловічої статі. Більш практичним є другий метод, що не ушкоджує ембріони, сутність якого полягає в одержанні і використанні вторинних флуоресцентних антитіл до Н-Ү-антигену. Ефективність цього методу стосовно ембріонів великої рогатої худоби становить 85...87% .

Перспективним підходом до ранньої діагностики статі ембріонів великої рогатої худоби є створення специфічного для ДНК Y-хромосоми молекулярного зонда. Для його одержання виділену з лімфоцитів бугая ДНК розщеплюють за допомогою рестриктаз. На наступному етапі отримані фрагменти ДНК вводять до складу самореplikуючих елементів – плазмід. Для цього очищені молекули плазмідної ДНК розрізають за допомогою тієї ж рестриктази і гібридизують із фрагментом ДНК бугая, що приводить до з'єднання комплементарних липких кінців ДНК бугая і плазмід. Гібридні молекули, що утворилися під дією ферменту лігази і складаються з хромосомної і плазмідної ДНК, вводять в оброблені спеціальним чином бактеріальні клітини з метою їх розмноження – клонування. Потім гібридні молекули ДНК виділяють з бактерій і розрізають знов за допомогою тієї ж рестриктази, виділяючи таким чином клоновані фрагменти хромосомної ДНК – основу зонда. З метою з'ясування наявності комплементарних послідовностей нуклеотидів, виділені з декількох клітин ембріонів великої рогатої худоби ДНК гібридизують з радіоактивно міченим клонованим ДНК-зондом, після чого методом радіоавтографії виявляють ділянки хромосом, що зв'язують зонд. Можливості використання цього методу розширилися після розробки способів мічення зондів флуоресцентними барвниками, наприклад, біотипом. Дослідження препаратів ембріональних клітин під мікроскопом дозволяє відрізнити чоловічі клітини, ядра яких набувають бурого або чорного забарвлення, від жіночих – ядра не фарбуються.

У даний час спосіб визначення статі доімплантаційних ембріонів при наявності або відсутності Y-хромосоми за допомогою специфічного для ДНК Y-хромосоми зонда є найточнішим. Його

ефективність для ембріонів великої рогатої худоби – 100%, однак цей метод потребує великих затрат часу. Аналіз відомої послідовності ДНК Y-хромосоми дозволяє виявити також деякі хромосомні порушення, наприклад, наявність у клітинах ембріона двох Y-хромосом.

Викликає інтерес визначення статі ембріонів великої рогатої худоби шляхом культивування *in vitro* 2...5 клітин компактизованих ембріонів. Цей метод заснований на тому, що за розміщення в спеціальне середовище клітини ембріонів чоловічої статі, на відміну від ембріонів жіночої статі, добре розмножуються, що дозволяє вже через 3 години після початку аналізу зробити висновок про стать ембріона. Ефективність цього методу – 90...95%.

Нещодавно було розроблено новий ефективний спосіб відбору ембріонів великої рогатої худоби за статтю перед їх трансплантацією із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що забезпечує ампліфікацію специфічних повторюваних послідовностей ДНК Y-хромосоми (потім ДНК піддають електрофорезу в 2-процентному агарозному гелі, яких зафарбовують бромистим етидієм і досліджують під ультрафіолетовим світлом). ПЛР дозволяє за єдиним бластомером, взятим шляхом біопсії, встановити стать доімплантаційного ембріона з дуже високою точністю (95,4%) за відносно короткий час. Ця методика може бути застосована для досить великої кількості ембріонів; біопсія клітини за допомогою мікроманіпуляторів не впливає на здатність ембріонів до розвитку *in vitro* і ступінь їх приживлюваності порівняно з контрольними ембріонами.

Розглядаючи питання одержання генетичних клонів або регулювання статі, слід пам'ятати про можливі наслідки такої роботи. Знижується спадкова мінливість, що є основою прогресивної еволюції, втрачається індивідуальна пристосованість організму до умов середовища. За даними А.К. Голубєва (1990), в процесі еволюції ускладнилася організація тварин і їх виживання все більшою мірою визначалося підвищенням індивідуальної мінливості, тому в природних умовах стало не вигідно виробляти велику кількість копій одного організму. Це також підтверджується тим, що мономорфність окремих видів і популяцій за локусами груп крові, білків призводить до їх вимирання або втрати пристосованості. Нині екологи вважають, що спеціалізація – ворог пристосованості. Тому, використовуючи методи генної інженерії, треба пам'ятати про необхідність

збереження генетичної рівноваги у популяції та її генотипного складу і враховувати, що в еволюції генетичних систем постійно відбувається рекомбінація, що призводить до двох протилежних ефектів. Вона зменшує безпосередню пристосованість популяції, порушуючи коадаптовані поєднання генів. Але, постійно генеруючи нові генотипи, рекомбінація створює свого роду мобілізаційний резерв мінливості й збільшує тим самим можливість адаптації в умовах зміни середовища. Це є протиріччям між сучасним та майбутнім, між вимогами максимізації безпосередньої пристосованості й збереження генетичної пластичності вже є рухомою силою еволюції генетичної системи.

### ***Контрольні запитання***

1. Які вимоги висувають до корів-донорів ембріонів?
2. Які типи гонадотропінів використовують для гормональної обробки корів?
3. Які існують способи синхронізації статевої охоти і овуляції у тварин?
4. В яких випадках використовують хірургічний метод вилучення ембріонів?
5. За якими морфологічними ознаками оцінюється придатність вимитих ембріонів для трансплантації?
6. Які проблеми виникають під час кріоконсервації ембріонів? Яким чином їх вирішують?
7. Які способи запліднення яйцеклітин *in vitro* використовують в наш час?
8. Які ознаки диференціації статі у ссавців виявляються в ембріогенезі?
9. На чому засновані методи попереднього відбору гамет за статтю?
10. Які Ви знаєте імунологічні методи визначення статі ембріонів? На чому вони засновані?

## РОЗДІЛ 6

### КЛОНУВАННЯ ЕМБРІОНІВ ТВАРИН

Бурхливий розвиток біологічної науки за останні десятиріччя привів до створення декількох сучасних напрямів експериментальної біології, що поставили для вивчення принципово нові питання живої матерії, які вже найближчим часом можуть суттєво змінити деякі технології виробництва сільськогосподарської продукції, медичних і фармацевтичних препаратів. Одним з таких напрямів, що спирається на новітні досягнення ембріології, цитології, біологічного приладобудування та біотехнологічної промисловості, є клонування ссавців. Суть клонування полягає у принципово новому методі відтворення тварин, коли ембріон утворюється не шляхом запліднення жіночої статевої клітини чоловічою, а в результаті пересадки ядра з диплоїдним набором хромосом у яйцеклітину, з якої вилучено власний генетичний матеріал.

Отриманий таким чином зародок може дати початок розвитку новому організму, коли його буде трансплантовано до відповідно підготовленого реципієнта. Такий спосіб утворення організмів принципово відрізняється від усіх існуючих у природі, оскільки формування генотипу тварин відбувається не шляхом спонтанного комбінування генів гаплоїдних жіночої і чоловічої статевих клітин під час запліднення, а шляхом активізації вже сформованого набору хромосом диплоїдної клітини. Це дозволяє створювати великі групи (клони) генетично ідентичних особин, коли донором генетичного матеріалу є популяція ембріональних клітин з одного зародка, або навіть одержувати генетичні копії існуючих тварин, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму.

Є дві великі сфери застосування клонування в житті сучасного суспільства: наукова – вивчення фундаментальних принципів функціонування живої матерії, і виробнича – копіювання і тиражування ссавців з унікальними властивостями. Щодо першої, то метод реконструювання ембріона шляхом пересадки ядер є могутнім методичним засобом вивчення таких базових властивостей тваринного світу на клітинному і субклітинному рівні, як роль позаядерної спадковості в формуванні фенотипових ознак, взаємодія

ядра і цитоплазми, диференціація генома протягом онтогенезу, в тому числі терміни та механізми активізації або інактивзації окремих генів та їх комбінацій, можливість втручатися в процес диференціації й інші. Вирішення багатьох актуальних біологічних проблем, таких як вплив різноманітних факторів зовнішнього середовища на організм тварини, реалізація генотипу в залежності від умов навколишнього середовища та ін. буде набагато ефективнішим при використанні клонів тварин.

Щодо другої сфери – застосування клонування у виробничих процесах, то перелік галузей, де цей метод може бути використано, обумовлюється кінцевим продуктом даної біотехнології, а саме нащадками, що є точними генетичними копіями донорського матеріалу, або великою кількістю генетично ідентичних особин. Як метод генетичного копіювання, клонування буде незамінним для відтворення існуючих у природі або створених людиною тварин з унікальними властивостями. Найяскравішим прикладом останнього може стати клонування трансгенних тварин. Як відомо, вартість штучної генної трансформації організму ссавця з метою надання йому принципово нових ознак нині висока, а ефективність такої процедури ще вкрай незадовільна. До того ж, ймовірність отримання ссавця, організм якого продукував би необхідний людині продукт, також залишається поки що дуже низькою. Тому, кожна тварина, виведена методами генної інженерії і здатна бути біореактором певних препаратів медичного чи фармацевтичного призначення, стане вкрай цінною. Щоб напрацювати необхідну для суспільства кількість такого препарату (інсуліну, інтерферону й ін.), потрібно або створювати певну кількість таких трансгенних особин, або відтворити (тобто скопіювати) вже створений один організм. Таким чином, саме комбінування трансгенезу і клонування дозволить розробити новітню, екологічно абсолютно чисту біотехнологію виробництва біологічно активних речовин (ліків, стимуляторів й ін.), якість яких буде максимально наближена до продуктів, що виробляє організм самої людини, і значно перевищує речовини, що синтезують рекомбінантні мікроорганізми. Така біотехнологія зробить справжню революцію в фармацевтиці та медицині наступного століття.

## 6.1. Історія клонування

Всі клітини організму тварин несуть однакошу генетичну інформацію. Однак у процесі морфогенезу соматичні клітини диференціюються, внаслідок чого частина геному репресується. Чим вищий рівень спеціалізації клітин, тим менша їх тотипотентність. Ця закономірність була встановлена в експериментах з пересадження ядер.

Уперше трансплантацію ядер соматичних клітин зародків до енуклеїованих клітин жаби здійснили американські дослідники Р. Бриггс і Т. Кінг у 1952 році (рис. 59). Учені, користуючись мікропіпеткою, видаляли ядра з яйцеклітин шпорцевої жаби, а замість них пересажували ядра клітин ембріонів, що перебувають на різних стадіях розвитку. Проведені дослідження показали, що ядра ранніх ембріонів у стадії пізньої бластули й навіть ранньої гастрული володіють тотипотентністю й забезпечують нормальний розвиток ембріонів. Якщо брати ядра із клітин зародка на ранній стадії його розвитку – бластули, то майже у 80% випадків зародок нормально розвивається далі і перетворюється на справжнього пуголовка. Якщо ж розвиток зародка, донора ядра, переходить на наступну стадію – гастрული, то лише менш ніж у 20% випадків оперовані яйцеклітини розвивалися нормально. При пересадженні ядер з більш диференційованих клітин (мезодерми й середньої кишки) пізньої гастрული в ембріонів спостерігалось недорозвинення і навіть відсутність нервової системи. Після пересадження ядра із клітин більш пізнього розвитку яйцеклітини взагалі не розвивалися.

Більш ґрунтовні дослідження, що охоплюють не тільки амфібій, а й риб, а також дрозофіл, у 1962 р. були розпочато англійським біологом Дж. Гордоном. Він першим у дослідах з південноафриканськими жабами (*Xenopus laevis*) як донора ядер використав не зародкові клітини, а клітини епітелію кишечника плаваючого пуголовка, що вже цілком спеціалізувалися. Ядра яйцеклітин реципієнтів він не видаляв хірургічним шляхом, а руйнував ультрафіолетовими променями. Здебільшого реконструйовані яйцеклітини не розвивалися, але приблизно десята частина з них утворювала ембріони. 6,5% із цих ембріонів досягали стадії бластули, 2,5% – стадії пуголовка і тільки 1% розвився в статевозрілих особин. Однак, поява декількох дорослих особин у таких умовах могла бути пов'язана з тим, що серед клітин епітелію

кишечника пуголовка, що розвивається, досить тривалий час присутні первинні статеві клітини, ядра яких могли бути використані для пересадження. У наступних роботах як сам автор, так і багато інших дослідників не змогли підтвердити дані цих перших дослідів.

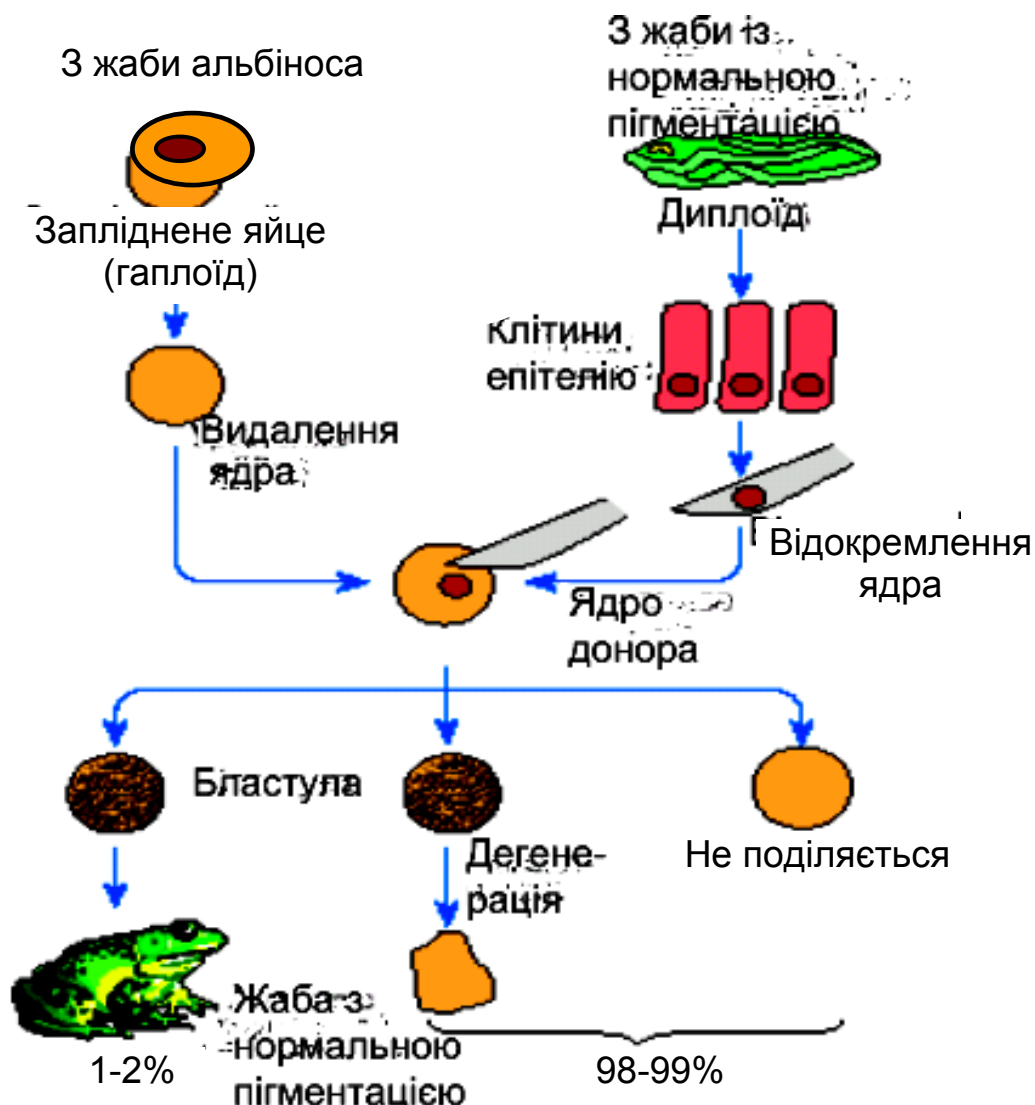


Рис. 59. Схема отримання клонованої жаби

У подальшому Дж. Гордон разом з Пещення (1970) почали культивувати *in vitro* клітини нирок, легень та шкіри дорослих тварин і використовувати вже ці клітини як донори ядер. Майже 25% первинно реконструйованих яйцеклітин розвивалися до стадії бластули. При серійних пересадженнях вони розвивалися до стадії плаваючого пуголовка. У такий спосіб було показано, що клітини трьох різних тканин дорослого хребетного (*X. laevis*) містять ядра, які можуть забезпечити розвиток принаймні до стадії пуголовка.

У свою чергу М. Дж. Берардіно і Н. Хофнер (1983)



використовували для трансплантації ядра клітин крові, що не поділяються та цілком диференційовані – еритроцити жаби *Rana ripiens*. Після серійного пересадження таких ядер 10% реконструйованих яйцеклітин досягали стадії плаваючого пуголовка. Ці експерименти показали, що деякі ядра соматичних клітин здатні зберігати тотипотентність.

У 1985 р. була описана технологія клонування кісткових риб, що розроблена радянськими вченими Л.А. Слепцовой, Н.В. Дабагян і К.Г. Газарян. Зародки на стадії бластули відокремлювали від жовтка. Ядра клітин зародків вприскували в цитоплазму незапліднених ікринок, які починали дробитися й розвивалися в личинки. Ці експерименти показали, що втрата ядром тотипотентності в процесі онтогенезу пов'язана не з втратою генів, а їхньою репресією. За культивування соматичних клітин *in vitro* частота тотипотентності ядер збільшується.

Пересадження ядер у ссавців почалися пізніше, у 80-х роках. Це було пов'язано з технічними труднощами, тому що зигота ссавців має невеликі розміри. Наприклад, діаметр зиготи миші приблизно 60 мкм, а діаметр заплідненої яйцеклітини жаби – 1200 мкм, тобто у 20 разів більше. Зигота корові трохи більша за зиготу миші, діаметр її становить 160 мкм, але пронуклеуси приховані яєчним жовтком, тому перед мікроманіпуляціями необхідна спеціальна обробка зигот.

Незважаючи на названі труднощі, перші повідомлення про одержання клонів мишей, ідентичних донору, з'явилися вже у 1981 році. Як донори були використані ембріональні клітини однієї з ліній мишей, узяті на стадії бластоцисти. Вірогідність отриманих даних спочатку була поставлена під сумнів тому, що відтворити результати проведених експериментів у інших лабораторіях не вдавалося, однак через два роки Дж. Мак Грат і Д. Солтер також досягли успіху. Американські дослідники С. Стік і Дж. Робл, використовуючи методику Мак Грата й Д. Солтера, у 1988 р. отримали шість живих кролів, пересадивши ядра 8-клітинних ембріонів однієї породи в позбавлені ядра яйцеклітини кролів іншої породи. Фенотип народжених повністю відповідав фенотипу донора. У цих експериментах тільки 6 з 164 реконструйованих яйцеклітин (3,7%) розвилися в нормальних тварин.

Перші успішні експерименти з клонування сільсько-господарських тварин були проведені С. Уїлладсеном (*S. Willadsen*) у 1986 р. Він зливав без'ядерні яйцеклітини із бластомерами,

виділеними з 8- і 16-клітинного ембріона вівці.

Дж. Робл і його співробітники у 1987 р. провели роботи з пересадження ядер великої рогатої худоби. Вони пересаджували до зигот каріопласти – чоловічий і жіночий пронуклеуси разом з цитоплазмою, що їх оточує, а також ядра 2-, 4- або 8-клітинних ембріонів корови. Реконструйовані зародки в цій роботі розвивалися тільки в тих випадках, коли до зигот пересаджували пронуклеуси: 17% таких зародків досягли стадії морули або бластоцисти. Два зародки були пересаджені іншому реципієнтові – у матку корови, і розвиток їх завершився народженням живих телят. Якщо як донорів використовували ядра 2-, 4- або 8-клітинних зародків, то реконструйовані яйцеклітини не розвивалися навіть до стадії морули.

Пізніше були й більш успішні роботи. Зокрема С. Уїлладсен (1989) повідомив, що йому вдалося отримати чотирьох генетично ідентичних бичків голштинської породи пересадженням до реципієнтних яйцеклітин ядер бластомерів одного 32-клітинного зародка.

К. Бондіолі й співавтори (1990), використовуючи як донорів ядер 16-64-клітинні зародки корів, трансплантували 463 реконструйованих зародки в матку синхронізованих реципієнтів, було отримано 92 живих теляти. Сім з них були генетично ідентичні, являючи собою клон, отриманий у результаті пересадження ядер клітин одного донорського ембріона.

Експериментів з клонування свиней небагато. Успішні дослідження провели Р. Пратер зі співробітниками в 1989 р. Незначна кількість даних пов'язана з певними труднощами роботи із цим об'єктом.

У 1993...1995 роках група дослідників під керівництвом Я. Уїлмута (*Ian Wilmut*) з Рослинського інституту отримала клон овець – 5 ідентичних тварин, донорами ядер яких була культура ембріональних клітин.

Я. Уїлмут зі співавторами опублікував на початку 1997 року повідомлення, що в результаті використання донорського ядра клітини молочної залози вівці було отримано клоновану тварину – вівцю за кличкою Доллі.

Аналогічні експерименти здійснювали пізніше Т. Домінко (*Tanja Dominko*) і співробітники лабораторії Вісконсинського університету, які забезпечили клонування ембріонів із клітин шкіри вух дорослої рогатої худоби. Ембріони, генетично ідентичні корові,

що пожертвувала клітини вуха, були пересаджені в матки корів-реципієнтів. Спостерігалася поступова загибель ембріонів, тому життєздатних телят не отримали. Причини поки що не встановлено.

У серпні 1997 року з'явилося повідомлення про те, що Алан Троунсон (Австралія) розробив технологію, яка дозволяє сформувати ембріон з 16, 32 або 64 клітин, а потім кожна з них може використовуватися для формування 16, 32 або 64 ідентичних ембріонів. Колектив дослідників на чолі з Аланом Троунсоном створив 470 генетично ідентичних ембріонів рогатої худоби від єдиної бластоцисти. Така технологія забезпечує безмежне джерело генетичного матеріалу для клонування.

## 6.2. Види клонування

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

Клонування ембріонів шляхом пересадження ядра має три основних етапи: отримання клітин-реципієнтів, виділення інтактного ядра донора, пересадження ядра в енукейовану яйцеклітину. На відміну від амфібій пересадження ядра в ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібно четвертий етап – активація ооциту і злиття мембран яйця й ооциту. Під дією електричного імпульсу відбувається активація ооциту і злиття мембран між ядром клітини донора і енукейованим ооцитом-реципієнтом. Технологія пересадження ядер клітини сприяла успішному одержанню клонованих живих кроликів, мишей, овець, кіз, великої рогатої худоби і свиней.

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. Як клітин-реципієнтів використовують або зрілі ооцити на стадії метафази II, тобто яйцеклітини, або зиготи. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*.

Вибір клітин-реципієнтів є досить суттєвим моментом клонування, тож слід враховувати фізіологічні процеси, що відбуваються під час клітинного циклу. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. Крім того, через непрозорість цитоплазми зигот великої рогатої худоби виникає необхідність центрифугувати зародки, а це зменшує їх життєздатність. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

Технологія отримання клітин-реципієнтів полягає в тому, що після розрізу скляною голкою прозорої оболонки дозрілих до метафази II незапліднених яйцеклітин у частині полярного тільця, ооцити приєднували до розчину *PBS*, що містить 5 мкг/мл цитохалазину В. Приблизно за годину з експозиції в середовищі з цитохалазином В полярне тільце з прилеглою ділянкою ооплазми видаляли всмоктуванням за допомогою піпетки для мікроманіпуляцій. Ефективним способом *елімінації* (вилучення) ядерних структур дозрілих *in vitro* ооцитів корів може стати також хімічна енуклеація.

Перші досліди з мікроманіпуляцій показали, що безпосереднє введення піпетки з пронуклеусом або ядром бластомера, що міститься в ній, в ооплазму зиготи або яйцеклітини ссавців викликає незворотні ушкодження плазматичної мембрани реконструйованої зиготи та її загибель через великі розміри ін'єкційної піпетки.

Для полегшення введення бластомерів у перивителиновий простір ооцитів жіночі гамети дозволяється попередньо поміщати до гіпертонічного середовища. Пересадження ізольованих поодиноких бластомерів 8-, 16- і 32-клітинних ембріонів кроля в енуклеювані ооцити, поміщені за 2...3 хвилини перед мікроманіпуляціями в 0,5 М розчину сахарози в розчині *PBS*, і наступне електрозлиття привели до розвитку 22,18 і 15% реконструйованих яйцеклітин відповідно до стадії морули-бластоцисти.

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

використовується за роботи з рослинними і соматичними клітинами, однак, у дослідженнях на ембріонах звичайно не застосовується через варіабельність активності, сильно вираженої токсичної дії на клітини, складність його видалення з плазматичної мембрани, що викликає лізис клітин і перешкоджає розвитку ембріонів. Більш вдалим у цьому відношенні є вірус Сендай. Але і він має ряд недоліків, що обмежують його застосування за роботи з ембріонами. До них відносяться ризик збереження вірулентності вірусних часток, варіабельність властивостей різних партій, низька, на відміну від його використання за злиття каріопластів яйцеклітин і бластомерів ранніх ембріонів, ефективність для клітин більш пізніх ембріонів. Крім того, бластомери ембріона отримані злиттям каріопласта з яйцеклітиною, вже не можуть бути використані як донори ядер, оскільки повторне застосування цього фузогена неможливе внаслідок втрати клітинних рецепторів, що відповідають за зв'язування з вірусом. Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можливо здійснюючі серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко замінюємі залежно від бажання експериментатора параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

Частота злиття ізольованих бластомерів великої рогатої худоби з енукейованими ооцитами корів залежить від стадії розвитку ембріона. Показник злиття був вірогідно вищим у тому разі, коли для пересадження ядер використовували 16- і 32-клітинні ембріони порівняно з ембріонами на стадії 2-х і 4-х клітин (28,9; 25,0; 4,6 і 9,7%, відповідно). Установлено, що на ефективність злиття клітинних систем і розвиток ембріонів великої рогатої худоби до морули-бластоцисти впливає вік яйцеклітини-реципієнта – частота формування реконструйованих бластоцист була значно вищою за злиття бластомерів 5,5-денних морул з енукейованими ооцитами, що культивувалися *in vitro* протягом 36 годин, ніж протягом 28, 32 і 40 годин. Продемонстровано можливість використання як джерела ядер 16...48-клітинних морул великої рогатої худоби, отриманих *in vivo* і далі кріоконсервованих, а також морул, отриманих *in vitro*. Частота злиття, дроблення і формування бластоцист для свіжих ембріонів, отриманих *in vivo*, заморожено-відтаяних ембріонів, отриманих *in vivo*, і ембріонів, отриманих *in vitro*, становила 80,0; 75,4 і 30,2%; 74,0; 64,9 і 7,1%; 84,5; 70,7 і 22,6%, відповідно.

Додатковим джерелом ядер можуть стати ембріональні

стовбурні клітини (ЕС-клітини). Вирішення цієї проблеми дозволить, як очікується, одержувати велику кількість ідентичних нащадків.

ЕС-клітини мають нормальний каріотип, лінії цих клітин можна зберігати в недиференційованому стані в культурі від 3-х місяців до року, заморожувати і відтаювати кілька разів без істотного зниження їх здатності до розвитку. Іншою перевагою ЕС-клітини є те, що вони можуть бути отримані від ліній тварин, що несуть рецесивні летальні мутації або від партеногенетичних ембріонів. ЕС-клітини не диференційовані і після утворення химерних ембріонів з них і звичайних морул або бластоцист можуть брати участь у формуванні різних органів, у тому числі клітин зародкової лінії. Оскільки ЕС-клітини можна генетично трансформувати, з їх допомогою можливе створення трансгенних тварин. ЕС-клітини можуть, імовірно, формувати повноцінний ембріон. Нещодавно проведені на мишах експерименти підтвердили це припущення, показавши принципову можливість злиття ЕС-клітин з енуклеюваними ооцитами і одержання реконструйованих ембріонів.

Пересадження ядер ембріональних стовбурних клітин, отриманих від ВКМ (внутрішньоклітинна маса) бластоцист і морул великої рогатої худоби, шляхом електрозлиття ЕС-клітини (діаметр стовбурних клітин дорівнює 15...22 мкм) з енуклеюваними ооцитами корів, що дозріли *in vitro*, дозволило одержати клони ембріонів на стадії бластоцисти, пересадження яких реципієнтам призвело до одержання трьох 38...45-денних плодів. Не було встановлено змін морфологічних характеристик ЕС-клітини протягом понад 12-місячного культивування клітин *in vitro*; показана здатність ліній ЕС-клітини до спонтанного диференціювання в ембріоїдні тіла і ендодермоподібні клітини.

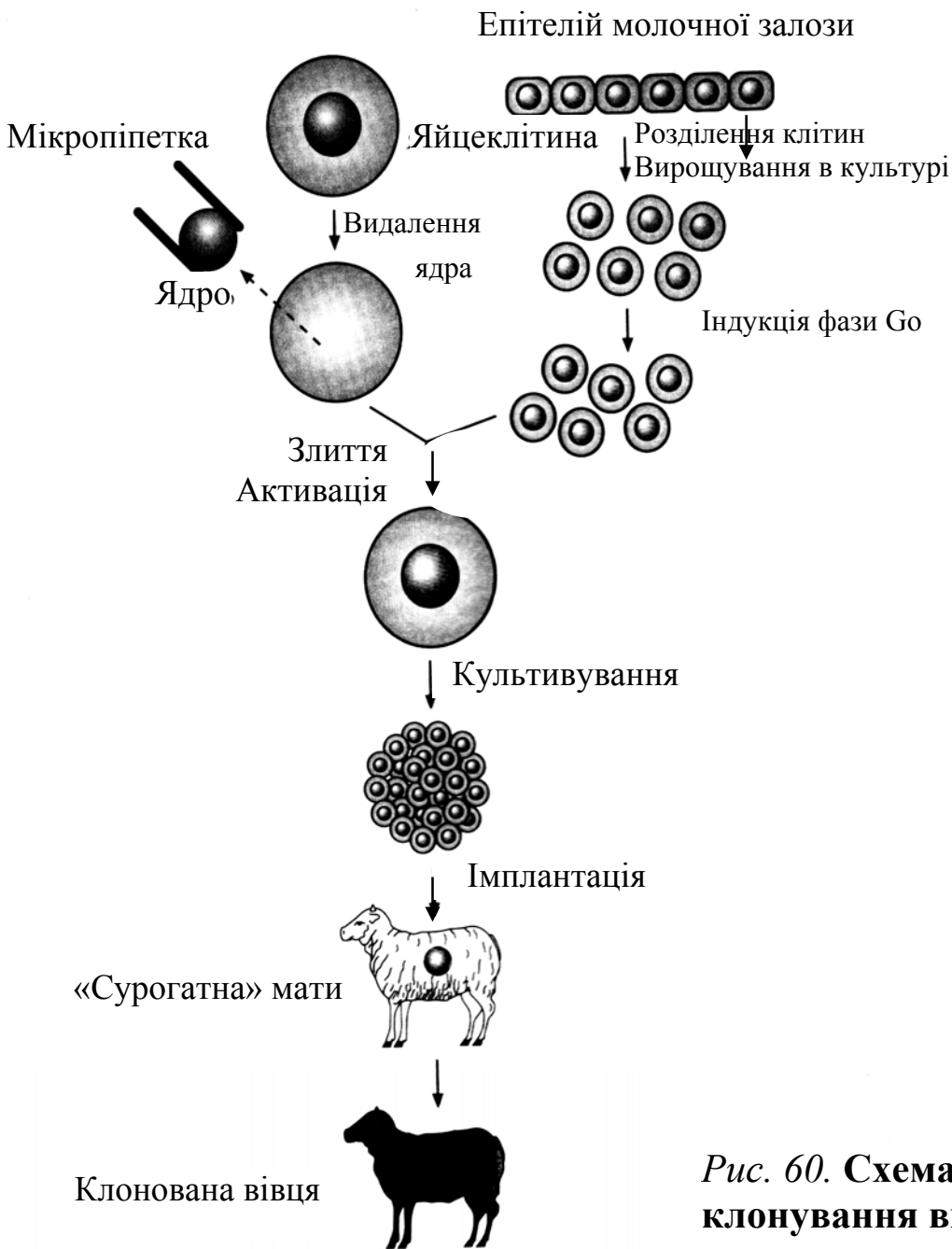
Великий інтерес викликають повідомлення К. Кемпбелла зі співавторами про одержання 5-ти живих ягнят шляхом злиття поодиноких клітин ембріонального диска (ЕД-клітини) 9-денних ембріонів овець з енуклеюваними дозрілими до метафази II ооцитами, при цьому клітинні лінії ЕД-клітин залишалися тотипотентними, принаймні, протягом 3 пасажів.

Принципово вищим ступенем клонування є так зване **соматичне клонування**, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму. Якщо в перших двох типах клонування можливо отримати копії ембріона і невідомо, які властивості матимуть тварини з цих зародків, то в останньому – копіюється

існуючий дорослий організм. Отримання генетичних копій тварин відкриває неймовірні перспективи як для науки, так і для виробництва, але її реалізація соматичного клонування набагато складніша. Це викликано ступенем диференціації генетичного матеріалу клітин, що є донорами ядер для пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріону (2...4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо. Ядра 8-...32-клітинних зародків уже диференційовані, але ступінь їх спеціалізації ще не високий, і вони здатні активізуватися в цитоплазмі енуклеюваної яйцеклітини, а створений ядерно-цитоплазматичний гібрид спроможний розвинути в повноцінний зародок. Більш високий ступінь диференціації ембріональних стовбурних клітин, які отримують з внутрішньоклітинної маси бластоцисти, робить завдання реконструювання ембріону з їх ядер ще важчою. Набагато складніше завдання активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому разі, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто певною мірою схожа на ембріональну клітину.

У лютому 1997 року з'явилося повідомлення, що в лабораторії Яна Уілмута в Рослинському інституті (Единбург, Шотландія) розробили ефективний метод клонування ссавців і на основі його використання вивели ягня Доллі. Насамперед, необхідно було виділити оцити (яйцеклітини). Їх витягли з овець породи шотландська чорноморда, помістили у штучне поживне середовище із додаванням ембріональної телячої сироватки за температури 37°C і провели операцію енуклеації (видалення власного ядра). Після цього виникнула потреба забезпечення яйцеклітини генетичною інформацією від організму, який належало клонувати. Для цієї мети використали різні клітини донора, але найбільш зручними виявилися диплоїдні клітини молочної залози дорослої вагітної вівці. Ці клітини виводили зі стадії росту клітинного циклу, розбавляючи сироватку, і через п'ять днів з'єднували з енуклеюваним оцитом. Останній потім активували до розвитку за допомогою електричного удару. Зародок, що розвивається, культивували протягом 6-ти днів у штучному хімічному середовищі або яйцепроводі вівці, перетягнутому лігатурою ближче до рога матки. На стадії морули або бластоцисти ембріони (від одного до трьох) трансплантували в матку прийомної

матері, де вони могли розвиватися до народження (рис. 60).



*Рис. 60. Схема соматичного клонування вівці Доллі*

З 236 дослідів успіх мав лише один, внаслідок чого і народилося ягня Доллі, яке містить генетичний матеріал дорослої вівці, що вмерла три роки тому. Точними молекулярно-генетичними дослідженнями було доведено, що Доллі є клонованою твариною.

Особливий інтерес викликають досліді групи вчених з університету в Гонолулу на чолі з Ріузо Янагімачі. Авторам удалося вдосконалити метод Уілмута, вони відмовилися від електричної стимуляції злиття донорської соматичної клітини з яйцеклітиною й



винайшли таку мікропіпетку, за допомогою якої можливо було безболісно витягувати ядро із соматичної клітини й трансплантувати його в яйцеклітину, що позбавлена власного ядра. Крім того, автори використали як донорські ядра відносно менш диференційованих клітин, що оточують ооцит. Нарешті, вдалося синхронізувати процеси, що протікають у яйцеклітині й ядрі, що трансплантується в неї. Це дозволило забезпечити природні ядерно-цитоплазматичні взаємини між ядром і цитоплазмою, оскільки ядро, що трансплантується і диференційоване в певному напрямку, та цитоплазма яйцеклітини до того працювали ніби в різних режимах.

Автори використали для трансплантації ядра клітин, що оточують ооцит (клітин так названого *cumulus oophorus*), клітин Сертолі з сім'яників і клітин, виділених з мозку – нейронів. Ядра, виділені із соматичних клітин, ін'єстували в енуклеюване яйце за допомогою мікропіпетки. Яйце активували до розвитку, помістивши в спеціальний розчин (так званий *HEPES-CZB*), вільний від кальцію, із додаванням стронцію і цитохалазину. Стронцій активував яйце, а кальцій придушував утворення полярних тілець.

Ембріони культивували до стадії 2...8 клітин, морули або бластули й потім трансплантували в матку прийомної матері, де значна їх кількість імплантувалася і деякі (15...16%) продовжували розвиток. Відсоток виходу народжених мишенят (їх витягували за допомогою розтину кесарева на 18,5...19-й дні вагітності) був, однак, низький – у різних серіях експериментів від 2,0 до 2,8%. Молекулярні дослідження довели належність ядер народжених мишенят до клітин донора соматичних клітин. Таким чином, принаймні в деяких випадках було доведено здатність ядер соматичних клітин забезпечувати нормальний розвиток ссавців. Отже, одержання клону принципово можливе. Однак, це ще не означає одержання точної копії клонованої тварини. Насправді одержати абсолютно точну копію даної конкретної тварини (а саме така кінцева мета ставиться в експериментах по клонуванню) набагато складніше, ніж це здається за поверхневого знайомства із проблемою.

І справа зовсім не в технічній розробці методів клонування, а в тому, що структурно-функціональні зміни ядер у процесі індивідуального розвитку тварин досить глибокі: одні гени активно працюють, інші інактивуються й «мовчать», при цьому сам зародок являє собою своєрідну мозаїку статей розподілу таких функціонально різних генів. І чим організм більше спеціалізований, чим вищий

підйом еволюційних сходів, на яких він стоїть, тим ці зміни глибші й сутужніше оборотні. У деяких організмів, наприклад, у відомого кишкового паразита аскариди, генетичний матеріал у майбутніх зародкових клітинах, залишається незмінним під час розвитку, а в інших, соматичних клітинах викидаються цілі великі фрагменти ДНК – носія спадкоємної інформації. У червоних кров'яних клітинах (еритроцитах) птахів ядра зморщуються в маленьку грудочку й не працюють, а з еритроцитів ссавців, що стоять еволюційно вище за птицю, ядра взагалі відсутні.

Відомо, що в соматичних клітинах у ході їхнього розвитку хромосоми послідовно коротшають на своїх кінцях, у зародкових клітинах спеціальний фермент – теломераза добудовує, відновлює їх, тобто отримані дані знов-таки свідчать про істотні розходження між зародковими і соматичними клітинами. І отже, постає питання, чи здатні ядра соматичних клітин повністю й еквівалентно замінити ядра зародкових клітин у їхній функції забезпечення нормального розвитку зародка.

У жаби, як істоти гірше розвиненої, ніж ссавці, ядерні зміни менше виражені. І при цьому відсоток успіху за клонування, як уже відзначали, невисокий (1...2%), а крім того, навіть ті жаби, які досягають у дослідах з клонування дорослого стану, – не без дефектів, отже, про точне копіювання донора, на жаль, важко говорити навіть у цьому найпростішому випадку. Але ссавці значно складніші, ніж жаби за власною організацією й ступенем диференціації клітин. Природно, у них відсоток успіху буде, принаймні, не вище (про що й свідчать результати дослідів Р. Янагімачі). Виникає проблема – як повернути ядра соматичних клітин, що змінилися, до вихідного стану, щоб вони могли забезпечити нормальний розвиток тієї яйцеклітини, у яку їх трансплантували. Успіх буде залежати від того, чи вдалося знайти таку соматичну клітину (із числа так званих *камбіальних*, від лат. *sambium* обмін; клітини, що подвоюються), ядро якої ще не втратило свого потенціалу, і так, щоб ще й не ушкодити це ядро в процесі складних хірургічних маніпуляцій. Крім того, умови розвитку в матці різних прийомних матерів будуть розрізнятися, а існує таке поняття, як норма реакції, тобто певні межі коливань прояву даного гена у фенотівій ознаці. Це значить, що в різних умовах розвитку зародка однакові гени будуть виявляти свою дію по-різному. Але ж таких генів тисячі. Отже, імовірність повної подібності клонованих тварин

буде не дуже велика.

Таким чином, у наш час можливо розглядати як науковий напрямок з певними досягненнями тільки клонування ембріональне. І хоча з загальнобіологічної точки зору соматичне і ембріональне клонування суттєво відрізняються, з погляду на використання цього методу в народному господарстві, зокрема в тваринництві чи фармацевтичній промисловості, різниця між ними може бути невеликою. Це можливо за рахунок використання біотехнології, в якій комбінуються клонування як метод розмноження організмів і кріоконсервація як метод введення останніх в анабіоз. Запропонована біотехнологія дозволяє і у разі використання ембріонального клонування передбачати ознаки нащадків за рахунок того, що поки більшість ембріонів клону зберігається в замороженому вигляді – у скрапленому азоті, 1...2 з них пересаджуються реципієнтам і перевіряються за якістю нащадків. Для повторного розмноження і отримання чисельних нащадків використовуються тільки ембріони тих клонів, що мають необхідні господарсько-корисні ознаки. За кількісними та якісними показниками ембріональне клонування наближається до соматичного саме при повторному (багаторазовому) розмноженні зародків, коли клоновані ембріони попереднього покоління є донорами ядер для наступного циклу реконструкції. У цьому разі кількість зародків зростає в геометричній прогресії, а ефективність реалізації біотехнології отримання нащадків з прогнозованими ознаками наближається до значень, що задовольняють практиків.

Незважаючи на те, що величезні потенційні можливості методу клонування привернули увагу багатьох провідних учених сучасності, що в розвинутих країнах виділяються великі кошти на дослідження в біотехнології тварин як у межах бюджетних асигнувань на науку, так і приватним капіталом, успіхи залишаються поки що незначними. Їх можна оцінити як такі, що показали принципову можливість клонування вищих тварин, але до розробки технологічного процесу, що давав би стабільні та задовільні за економічними показниками результати, ще далеко (табл. 9).

Статистика свідчить, що вихід потомства від кількості проведених ядерних пересадок вкрай низький і для головних видів сільськогосподарських тварин становить: у свиней – 1%, у великої рогатої худоби коливається від 1% до 4%, у овець – 4%.

**Методи ембріонального клонування  
та їх використання у репродуктивній біотехнології**

№	Об'єкт і метод досліджень	Технологія досліджень	Характер досліджень	Використані біологічні об'єкти	Практичне використання або можливе застосування досліджень
1	2	3	4	5	6
1.	Дво-, чотири-, восьмиклітинні ембріони. Мікрomanipуляції.	Мікрохірургічний поділ. Культивування у проміжному реципієнті. Трансплантація.	Фундаментальні	Кролі, вівці, велика рогата худоба	Одержання пари ідентичних двійнят або декількох близнюків.
2.	Ембріони стадії морула та бластоциста. Мікрomanipуляції.	Мікрохірургічний поділ, безпосередня пересадка реципієнту або проміжне культивування поза організмом на фідерному клітинному моношарі з повторним мікрохірургічним поділом. Трансплантація.	Науково-практичні	Миші, кролі, вівці, кози, велика рогата худоба	Одержання ембріонів другої генерації. Отримання клону з двох – чотирьох особів цінних у племінному відношенні тварин. Виявлення статі ембріона. Визначення можливих спадкових захворювань нащадків.
3.	Ембріони стадії рання чи компактна морула та бластоциста. Мікрomanipуляції	Мікрохірургічний поділ. Агрегація цілих чи розподілених морул або мікроін'єкція половинок морул у бластоцисту. Трансплантація.	Фундаментальні	Миші, кролі, вівці, кози, велика рогата худоба	Одержання тварин-химер (індивідуумів з чотирма і більше батьками). Використання їх для ембріо-генетичних експериментів як ідеальних моделей.

Продовження таблиці 9

1	2	3	4	5	6
4.	Яйцеклітини запліднені поза організмом	Суперовуляція. Збір яйцеклітин із забійного матеріалу або ендоскопічна аспірація методом ОРУ. Запліднення поза організмом. Культивування. Трансплантація.	Науково-практичні	Кролі, вівці, свині, велика рогата худоба, екзотичні тварини, людина	Одержання великої кількості ембріонів з однаковим генотипом. Підвищення інтенсивності селекції. Зберігання зникаючих видів. Один із шляхів вирішення безпліддя у жінок.
5.	Внутрішня клітинна маса раннього ембріона – ембріобласт. Енуклейована яйцеклітина. Химерне клонування.	Створення ембріональних стовбурових клітинних ліній (ESC). Пересадка ядра з ESC в енуклейовану яйцеклітину. Електрозлиття. Культивування. Трансплантація.	Фундаментальні	Миші, щурі, кролі, норки, вівці, свині, велика рогата худоба	Одержання необмеженої кількості ембріонів з генетично ідентичними ознаками. Нащадки не отримані.
6.	Бластомер ембріона (морули). Ядро ембріональної клітини. Енуклейована яйцеклітина. Клонування ембріонів.	Енуклеація. Пересадка бластомера в енуклейовану яйцеклітину. Злиття двох компонентів вірусом Сендай або електрошоком. Культивування. Трансплантація.	Фундаментальні та науково-практичні	Миші, кролі, вівці, свині, велика рогата худоба	Одержання цитоплазматичних гібридів з ідентичним генетичним матеріалом. Нестатеве розмноження.
7.	Соматична клітина. Енуклейована яйцеклітина. Клонування ембріонів.	Пересадка ядра соматичної клітини в енуклейовану яйцеклітину. Злиття двох цитопластів. Культивування. Трансплантація.	Фундаментальні	Миші, щурі, вівці	Необмежене одержання генетично ідентичних нащадків. Суперприскорення (мультиплікація) генетичного прогресу через примноження генетично переважаючих індивідуумів

Низький рівень успіху, навіть у разі найпростішого методу – ембріонального клонування, зумовлений впливом на життєздатність реконструйованих ембріонів великої кількості факторів і невивченістю багатьох біологічних процесів, під час яких проводяться маніпуляції. Певною мірою, успіх кожного дослідження є результатом майстерності та інтуїції колективу експериментаторів. Тому глибоке вивчення механізмів перетворень, що відбуваються у статевих і ембріональних клітинах у процесі клонування, вдосконалення методик, що застосовуються на різних етапах клонування, має вирішальне значення для подальшого розвитку цього напрямку біотехнології.

### **6.3. Методи одержання монозиготних близнюків**

Як зазначалося, темпи селекційного прогресу сільськогосподарських тварин значною мірою гальмують низькі темпи розмноження. Тому одержання від однієї особини великої кількості нащадків сприяє завданням селекціонерів щодо створення високопродуктивних стад тварин. Але запроваджуючи трансплантацію ембріонів, слід пам'ятати, що при цьому отримують не ідентичних донору тварин. Це пов'язано з рекомбінаційною мінливістю, що виникає в процесі перекомбінації спадкового матеріалу батьків. Тому створені у період відбору й підбору унікальні генотипи в наступних поколіннях можуть не відтворюватися. На це вказували класики зоотехнії, які рекомендували використовувати тварин у тих же типах парування, що раніше дали цінне потомство. На жаль, нині приймають «апріорі» високі продуктивні властивості нащадків, одержаних за трансплантації, але недостатньо вивчають повторюваність оцінок високопродуктивних донорів та їх потомство. Тому назріло питання виведення генетично подібних тварин, тобто особин з ідентичним генотипом. Як відомо, до них належать однайцеві двійнята, що є цінними об'єктами для генетичних досліджень. Усі онтогенетичні зміни, що відбуваються з ними, та реалізований рівень продуктивності залежатимуть лише від умов середовища. Вважають, що дані, отримані від однієї пари близнят, такі ж як і від 50 тварин.

Виведення однайцевих близнюків має велике значення для тваринництва. З одного боку, збільшується вихід телят від одного

донора, а з іншого боку – з'являються генетично ідентичні двійні. Одержання їх у великій кількості могло б полегшити оцінку бугаїв за якістю нащадків, зменшити вартість спермопродукції, прискорити й здешевити тестування препаратів і спростити дослідження в галузі годівлі тварин. Генетично ідентичні копії ембріонів і телят можливо успішно застосовувати в дослідженнях з вивчення взаємодії генотип-середовище, зокрема, у таких дослідженнях, як вивчення впливу зовнішнього середовища на розвиток половинок одного ембріона після їх пересадження одному або різним реципієнтам, впливу годівлі і утримання тварин-близнюків на формування їх фенотипів та ін. У селекції також є інтерес до використання монозиготних близнюків для оцінки м'ясних якостей шляхом забою одного близнюка і перенесення отриманих даних на інший. Після розподілу ембріона одну половинку можна кріоконсервувати, а іншу – пересадити реципієнтові. За позитивних результатів оцінки отриманого потомства половинку, що залишилася, можливо буде використовувати в селекційному процесі.

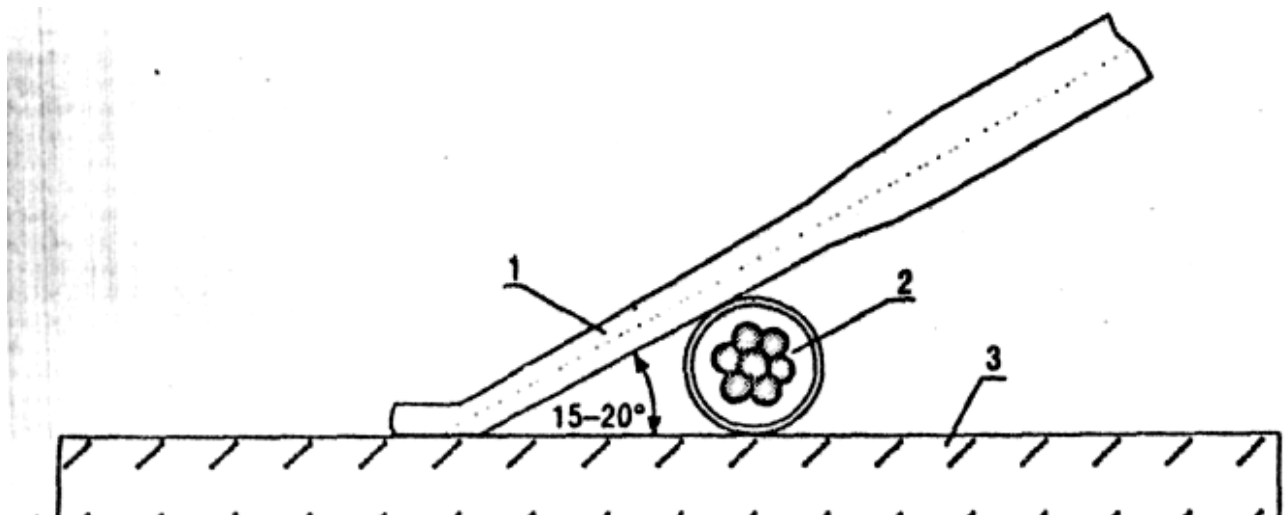
Але частота народження близнят досить низька. Наприклад, корови народжують близнят один раз на 500...2000 отелень. Тому розраховувати на ініціацію спонтанного отримання двійнят або трійнят досить складно, а селекція на багатоплідність неефективна через низьку успадковуваність ознаки. Враховуючи ці обставини, спробували розподілити ранні ембріони на окремі бластомери і пересадити їх реципієнтам. Частина з них можна зберігати в умовах глибокого заморожування. Це дає можливість накопичувати частини ембріонів, які у подальшому, за результатами продуктивності їх генетичних аналогів, що трансплантувалися реципієнтам, відбирають та здійснюють клонування найбільш цінних особин. Таким же чином можна зберігати генофонд деяких порід та видів тварин.

Можливість зазначених маніпуляцій доведено експериментами. Так, у 1979 р. в Гессенському університеті було пересаджено окремі половинки 5...6-денних ембріонів 39 вівцям і одержано 9 ягнят. Потім одержали однояйцевих двійнят з 4- та 8-клітинних ембріонів овець, доведено можливість зберігання половинок у замороженому стані й виведення монозиготних двійнят різного віку.

У практиці використовують два способи розподілення ембріонів – перев'язуванням і розрізуванням. У першому разі зародки відбирають за допомогою мікроманіпулятора, не порушуючи прозорої оболонки, потім перев'язують їх синтетичною ниткою

діаметром 15 мкм посередині. Розподілені половини окремо дробляться, утворюючи зародки. Ембріони також розрізають ножем навпіл або на більшу кількість частин.

Розподілення зародків проводиться на предметному склі в краплі середовища Дюльбекко скляною мікроголкою діаметром 10...15 мкм. Голку невеликими поступальними рухами опускають під кутом 15...20° до площини предметного скла по лінії передбачуваного розрізу на ембріон, який є в зоні *пелюциди* (прозора оболонка, що вкриває ооцит, на поверхні якої розташовані рецептори для розпізнавання сперміями; після запліднення сприяє процесу прикріплення у статевих шляхах самки), до повного розподілу його на дві частини. Мікроголка виконує при цьому дві функції: розподілення ембріона на частини і його фіксацію, що усуває необхідність застосування мікроприсоски (рис. 61).



**Рис. 61. Схематичне зображення розподілу ембріона на частини за допомогою скляної мікроголочки:**

1 – робоча частина мікроголочки; 2 – ембріон; 3 – предметне скло

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

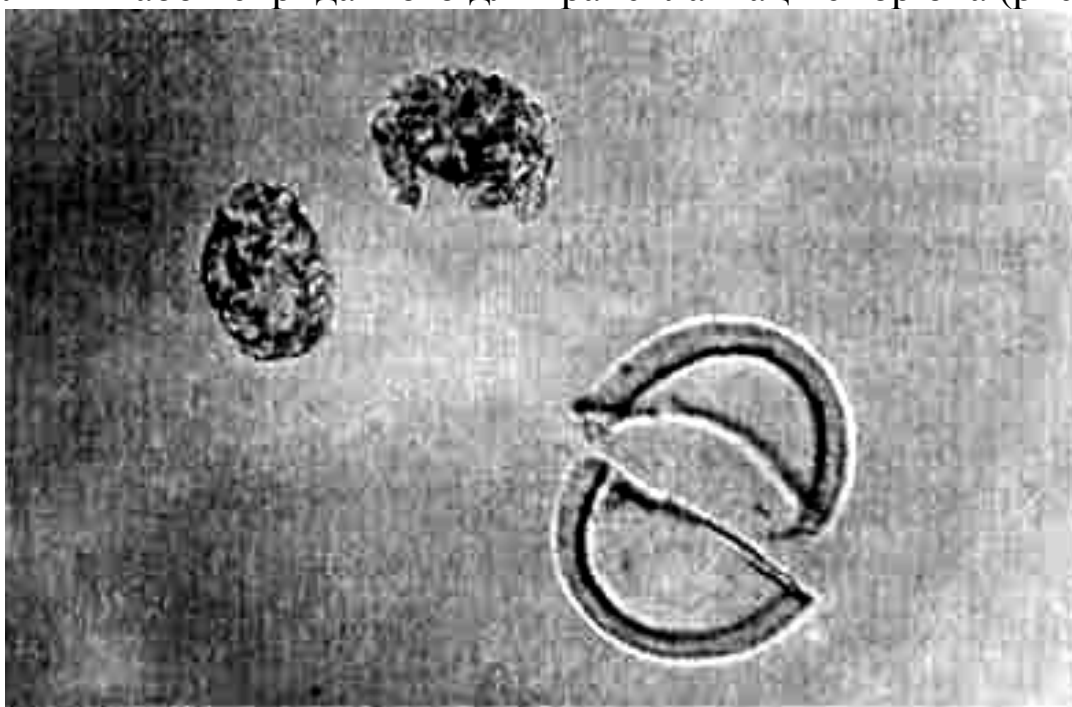
Після розподілу ембріона на дві частини, одержані половинки переносять до термостату і культивують протягом 3-х годин. Якщо за цей час половинки зародків компактизувалися, їх пересаджують реципієнтам без попереднього поміщення в зону пелюциди.



Нещодавно розроблено новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що розширюється, (поблизу внутрішньоклітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася. Таким методом уже отримано дві пари монозиготних телят-близнюків. Даний спосіб, на відміну від звичайного, призводить до дуже малих клітинних витрат за розподілу.

Метод роботи з ембріонами на ранніх стадіях у практиці широко використаний не був, оскільки потребує хірургічного вилучення і трансплантації одержаних бластомерів.

Нині мікрохірургічними методами почали розділювати зародки великої рогатої худоби на стадіях морули або бластоцисти. З таких половинок зародків уже одержані телята (США, Англія, Франція, Німеччина). При цьому використовують нехірургічні методи. Так, відібрану із зони пелюцида половинку бластоцисти повертають у власну оболонку, а іншу розміщують у прозору оболонку яйцеклітини або непридатного для трансплантації ембріона (рис. 62).



*Рис. 62. Половинки пізньої морули  
(за Зубцем М.В., Буркатом В.П., 1997)*

Дослідженнями встановлено, що для розподілу ембріонів найбільш придатні пізні морули і ранні, або розширені бластоцисти. Ембріони даних стадій розвитку вимивають з рогів матки на 6...8-й

день після запліднення донорів.

На 6-й день більшість ембріонів перебуває в стадії морули, а на 7-й день переважна їх кількість представлена бластоцистами. У той же час дослідження показали, що вимиті на 6-й або 7-й день ембріони перебувають на різних стадіях розвитку. Це пояснюється тим, що препарати, які викликають суперовуляцію, індукують неодноточасний вихід яйцеклітин, і тому багаторазове запліднення донорів, що спрямоване на одержання великої кількості ембріонів, призводить до появи нормально розвинених ембріонів на стадіях морули і бластоцист.

Бластоциста є пристосованою стадією розвитку, необхідною для імплантації, і властива ембріогенезу ссавців. Бластоциста складається з двох клітинних популяцій, одна з яких трофктодерма (ТЕ) або трофобласт, необхідна для імплантації, а друга – внутрішня клітинна маса (ВКМ) або ембріобласт – необхідна для розвитку зародка та індукції у ТЕ процесів, без яких неможлива повноцінна імплантація і плацентациї. У формуванні зародкових оболонок крім ТЕ беруть участь і похідні ВКМ.

Морула ссавців – кулясте скупчення бластомерів, позбавлене порожнини, а бластоциста – пухирець, що складається зі стінки (ТЕ), порожнини з рідиною (бластоціль) і скупчення клітин (ВКМ) на одному з полюсів внутрішньої поверхні ТЕ. Процес утворення порожнини, тобто формування бластоцисти, називається *кавітацією*.

ВКМ і ТЕ ранніх бластоцист розрізняються за рядом властивостей. Так, ізольовані ВКМ не здатні продукувати рідину бластоцїлі, а клітини ТЕ можуть це робити. Клітини ВКМ легко агрегують між собою, а фрагменти ТЕ позбавлені цієї здатності. Якщо трансплантувати ізольовані фрагменти ВКМ і ТЕ в матку самки-реципієнта, то ТЕ індукують *децидуальну реакцію* (зміни, що відбуваються напередодні імплантації в матці, а також зародковий сигнал, який подовжує життя жовтого тіла) і починають імплантуватися. Ізольовані ВКМ, потрапивши до матки, гинуть, не індукуючи в ній децидуальної реакції.

Отриманий з рогів матки матеріал оцінюють під мікроскопом за 80...100-кратного збільшення. На підставі морфологічної оцінки відбирають незапліднені яйцеклітини і ембріони: нормально розвинені, з частковими порушеннями і дегенеровані. За якістю морули і бластоцисти оцінюються як відмінні, хороші, задовільні, умовно придатні і непридатні. Оцінюючі якість ембріонів враховують

стадію розвитку зародків, відповідність стадії розвитку віку ембріона, стан бластомерів, прозорої оболонки та ін. Для мікрохірургічних робіт відбирають ембріони відмінної і хорошої якості, класифіковані як: пізні морули; ранні, що розширюються і пізні (розширені) бластоцисти. Такі ембріони мають ознаки (Інструкція з трансплантації ембріонів великої рогатої худоби, 1987):

- пізня морула відмінної якості – компактна структура, що складається з 32...64 щільно з'єднаних між собою клітин із розходженнями за величиною між бластомерами не більше 2:1. Характерні округлої форми, не зруйновані, без ознак лізису бластомери з зернистою цитоплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою; відносно широкий перивителиновий простір не містить ізольованих бластомерів, гранул і включень. Діаметр прозорої оболонки – 140...170 мкм;
- пізня морула хорошої якості – допускається наявність гранул і включень у перивителлиновому просторі, поодиноких стиснутих бластомерів;
- пізні морули, що характеризуються значними порушеннями: дроблення частини бластомерів, великі розходження між бластомерами, стискування бластомерів, їхнє руйнування, порушення зв'язків між бластомерами, невідповідність стадії розвитку віку ембріонів, ушкодження прозорої оболонки й ін., – непридатні для мікроманіпуляцій;
- ранні бластоцисти відмінної якості складаються із > 64...130 рівномірно подрібнених клітин без ознак лізису, мають округлу форму, більш вузький, ніж у пізньої морули, перивителиновий простір, що не містить гранул, включень, поодиноких клітин, не ушкоджену прозору оболонку, що має таку ж товщину, яка властива прекомпактизованим ембріонам, помітний бластоціль, диференційовані клітини трофктодерми (ТЕ) і внутрішньої клітинної маси (ВКМ). Діаметр прозорої оболонки – 140...170 мкм;
- ранні бластоцисти хорошої якості можуть мати тонку прозору оболонку, нечітко виражений бластоціль, у перивителиновому просторі бувають гранули і включення, клітини трофктодерми можуть бути трохи стиснуті;
- бластоцисти, що розширюються, відмінної і хорошої якості також складаються із > 64...130 клітин, мають товсту прозору оболонку, діаметр якої 140...200 мкм. Перивителиновий простір

- відсутній – витиснуто клітками трофктодерми, бластоціль великий, внутрішня клітинна маса локалізована на одному з полюсів ембріона, клітини ВМК і трофктодерми добре помітні – останні мають більш витягнуту форму;
- розширені (пізні) бластоцисти відмінної і хорошої якості складаються із > 130...200 клітин, прозора оболонка ембріонів розтягнута, тонка, порожнина збільшена, клітини ВМК і ТЕ добре виражені. Діаметр прозорої оболонки 180...220 мкм;
  - бластоцисти, що характеризуються відсутністю вираженого бластоцілю, диференціюванням клітин ТЕ і ВМК, зруйнованими зв'язками між клітинами, руйнуванням клітин, тріщинами в прозорій оболонці, вибраковують через їхню непридатність для мікрохірургічних робіт.

Морфологічна оцінка ембріонів великої рогатої худоби в даний час є основним методом оцінки якості ембріонів перед їхньою трансплантацією. Цей спосіб не позбавлений суб'єктивності, у деяких випадках буває складно відрізнити, наприклад, пізню морулу від яйцеклітини та ін. Тому було розроблено інші методи оцінки повноцінності ембріонів. До них відносяться культивування зародків і зафарбовування клітин вітальними барвниками.

Культивування ембріонів *in vitro* дозволяє визначити здатність зародків до подальшого розвитку. Однак культивування ембріонів протягом тривалого часу в будь-яких середовищах знижує їх життєздатність.

Методи вітального зафарбовування засновані на здатності барвників проникати через плазматичну мембрану живих або загиблих клітин. Основна вимога, що висувається до барвників – їх нетоксичність.

За розробки оптимальних умов одержання монозиготних близнюків велика увага приділялася тривалості культивування *in vitro* після поділу і трансплантації половинок ембріонів, а також їхньому збереженню в замороженому стані.

За попарних пересаджень половинок обидві половинки одного ембріона пересаджували реципієнтові в один ріг матки, що знаходиться на боці яєчника з жовтим тілом.

Дослідження показали відсутність достовірних розходжень у приживаності половинок відмінної і хорошої якості (якість половинок і їх приживаність не залежали від типу використаних мікрохірургічних інструментів), приживаність половинок задовільної

якості різко знижувалася.

Однак, стадія розвитку ембріонів істотно впливала на результати пересадження половинок – приживаність поодиноких половинок бластоцист була істотно вище, ніж за поодиноких половинок морул. Попарне пересадження половинок морул і бластоцист сприяло зростанню частоти приживаності половинок.

Визначаючи якість половинок, слід враховувати розміри половинок, ступінь їхньої компактності і формування бластоцилю:

1. До відмінних половинок відносять рівні за розмірами частини ( $1/2 + 1/2$ ) і половинки, що мають великі розміри ( $2/3, 3/4$ ), що зовсім округлилися протягом 30-хвилинного культивування. За 3 години культивування такі половинки мали виражений бластоциль.
2. У хороших половинок також є бластоциль, але вони незначно відрізняються своїми розмірами ( $<1/2$ ) і мають ще не зовсім округлу форму.
3. Задовільні половинки значно відрізняються за своїми розмірами ( $1/3, 1/4$ ), характеризуються слабовираженою компактністю і відсутністю бластоцилю.
4. Дегенеровані половинки не компактні, мають багато зруйнованих клітин, на вигляд пухкі через руйнування міжклітинних зв'язків між бластомерами.

Отримані дані свідчать, що порівняно з пересадженням цілих ембріонів, трансплантація свіжоотриманих половинок сприяє збільшенню кількості народжених телят на 40...60%. Методи розподілу, що використані, є простими, деякі з них не потребують дорогого обладнання (мікроманіпуляторів, мікрокузні) і тому можуть бути впроваджені на будь-яких пунктах трансплантації ембріонів як складовий елемент технології одержання і трансплантації ембріонів.

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

Після оцінки стану четвертинки ембріонів, визнаних придатними для подальшого розвитку, пересаджують до порожніх зон пелюциди. Для цього прозору оболонку фіксують мікроприсоскою із зовнішнім діаметром 100...150 мкм і внутрішнім – 30...40 мкм. Пересадження частин ембріонів всередину зони пелюциди проводять за допомогою ін'єкційної мікропіпетки через розріз, зроблений у зоні раніше. У дослідах використовують мікропіпетки із зовнішнім діаметром 65...75 мкм як із рівним, так і зі

скошеним (загостреним) кінцем. Останнє значно полегшує проникнення цього інструмента всередину зони пелюциди. Поміщені у прозору оболонку четвертини ембріонів заряджають до контейнерів для пересадок і пересаджують реципієнтам.

Порожні зони пелюциди отримують заздалегідь з ооцитів великої рогатої худоби. Ооцити добувають із яєчників і очищують від клітин кумулюсу. Потім поміщають на предметне скло у краплю середовища Дюльбекко і фіксують мікроприсоскою. Мікроножем, зробленим із леза бритви, трохи надрізають зону пелюцида, до якого підводять скляну мікропіпетку діаметром 50...70 мкм і виймають ооцит із прозорої оболонки. Одержані таким чином порожні зони пелюцида зберігають у середовищі Дюльбекко за температури +4,0...5,0°C.

За поділу пізньої морули або ранньої бластоцисти на 4 частини ембріони теж спочатку розділяють на дві половинки, кожна з яких культивують за температури 38,0°C у поживному середовищі 2...4 години, після чого кожен напівембріон поділяють на дві частини і культивують до формування бластоціля. Мікрохірургію ембріонів даних стадій розвитку краще проводити за кімнатної температури або в охолодженому розчині, тому що за температури середовища вище 20,0°C клітинні мембрани стають більш липкими, що утрудняє маніпуляції. У досліджах щодо чверті пізніх морул і ранніх бластоцистів у процесі культивування *in vitro* компактизують і формують бластоціль з помітними клітинами трофктодерми і внутрішньої клітинної маси. Однак, їх приживаність була значно нижчою порівняно з половинками і цілими ембріонами.

Інший спосіб одержання бластоцист-чвертей великої рогатої худоби полягає у розподілі 4-клітинних ембріонів, отриманих *in vitro*, на окремі бластомери, поміщення їх у прозорі оболонки і наступного культивування до стадії бластоцисти. Від кожного з 73% 4-клітинних ембріонів було отримано 3...4 бластоцисти з кількістю клітин, у чотири рази меншою, ніж у звичайних бластоцист. У 1995 році вперше з'явилось повідомлення про одержання чотирьох монозиготних телят (після пересадження бластоцист-чвертей) з ізольованих бластомерів 4-клітинного ембріона, отриманого *in vitro*.

Досліди показали, що з чвертей пізніх морул можуть утворюватися нормальні бластоцисти з числом клітин, у чотири рази меншим, ніж у звичайної бластоцисти. Ці бластоцисти можуть імплантуватися і розвиватися. Підтвердженням тому є народження

двох живих теличок із чвертей однієї пізньої морули. Наступні дослідження, однак, показали, що ембріони-чверті порівняно з цілими ембріонами і половинками, мають знижену приживаність, тому розподіл пізніх морул і ранніх бластоцист на 4 частини визнано недоцільним у комерційній діяльності. Очевидно, вироблення ранніх ембріональних факторів поодинокими чвертями недостатнє для запобігання лізису жовтого тіла реципієнтів. А кількість клітин трофктодерми і внутрішньої клітинної маси, що утворюється в таких ембріонах, не завжди забезпечує імплантацію і (або) формування позазародкових і ембріональних тканин плоду. До того ж, у процесі розподілу може відбуватися руйнування частини їх клітин. Збільшити частоту приживаності чвертей ембріонів великої рогатої худоби можна шляхом пересадження разом із чвертю свіжоотриманих трофобластичних пухирців.

Після розподілу пізніх морул і ранніх бластоцист на 2...4 частини з кожної частини ембріона формується бластоциста з числом клітин, удвічі або вчетверо меншим, ніж у звичайної бластоцисти. Успішна імплантація таких бластоцист завершується народженням нормальних нащадків. Дослідження, проведені на мишах, показали, що в зародках-половинках після імплантації на стадії гастрюляції відбувається прискорення проліферації клітин і до 10-ї доби вони досягають норми. Якщо ж агрегувати дві або більше морул миші, з них сформується бластоциста, розміри якої значно більше розмірів звичайної бластоцисти. Проте, через 30...36 годин після імплантації в гігантських бластоцистах починається уповільнення темпів проліферації клітин і вже на стадії пізнього зародкового циліндра химерні ембріони за своїми розмірами не відрізняються від звичайних. Таким чином, постімплантовані ембріони мишей здатні дізнаватися про кількість клітин що відповідає гастрюляції і коректувати темп проліферації, нормалізуючи ріст і морфогенез. Очевидно, це стосується не тільки до мишей і великої рогатої худоби, а й усіх видів ссавців. Наприклад, трансплантація вівцям-реципієнтам реконструйованих бластоцист овець, що містять власну і чужу внутрішню клітинну масу, призвела до народження химерних ягнят; після пересадження половинок морул і бластоцист отримано монозиготних близнюків у свиней і кіз. Однак, здатність до регуляції маси клітин зародка не нескінченна і визначається певною граничною кількістю клітин. Значне зменшення їх кількості якщо і не перешкоджає здійсненню кавітації (від лат. *cavitatis* – заглиблення,

порожнина – утворення пухирців), то і не призводить до формування нормальної бластоцисти, обмежуючись утворенням трофобластичних пухирців, нездатних до імплантації.

Як показали дослідження, наявність прозорої оболонки не є необхідною для подальшого розвитку половинок пізньої морули або бластоцисти. Значення прозорої оболонки для подальшого розвитку розподіленого ембріона зростає при трансплантації чверті ембріона. Оскільки напівембріони, поміщені в оболонку, легше ідентифікуються під мікроскопом, менше схильні прилипати до стінок піпетки або пайєти, можуть бути менше травмовані при трансплантації реципієнтам.

Прозора оболонка є складним біохімічним і антигенним комплексом позаклітинних глікопротеїнів, що оточують не тільки ооцити, а й доімплантаційні зародки. Прозора оболонка є потенційною імуноконтрацептивною мішенню, адже антитіла проти неї повністю пригнічують запліднення як *in vitro*, так і *in vivo*. У свиней прозора оболонка складається з 4-х глікопротеїнів (*ZP1* – 82000, *ZP2* – 61000, *ZP3* – 55000 і *ZP4* – 21000). У яйцеклітинах свиней переважає *ZP3*, цей глікопротеїн ізольований і очищений хроматографічно, його використовують для отримання протизаплідних вакцин.

У мишей прозора оболонка складається з трьох сульфатованих глікопротеїнів (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3*), що розрізняються молекулярною вагою та іншими властивостями. *ZP3* має молекулярну вагу 83000 і є специфічним глікоротеїном для зв'язування сперматозоїдів. Ізольований *ZP3* ефективно запобігає зв'язуванню сперматозоїдів з прозорою оболонкою і таким чином пригнічує запліднення у мишей. Якщо імунізувати мишей сироваткою проти прозорої оболонки, при цьому виникає безпліддя. Цей ефект зворотний і обумовлений запобіганням зв'язування сперміїв з прозорою оболонкою або її непроникністю для сперміїв. Найбільше у складі прозорої оболонки яйцеклітин мишей міститься сульфатованих глікопротеїнів з молекулярною вагою 140000 (*ZP2*). Цей глікопротеїн також змінюється після запліднення і, ймовірно, бере участь у блокаді поліспермії. Антитіла до *ZP2* не заважають прикріпленню сперміїв до прозорої оболонки, але блокують запліднення, роблячи неможливою penetрацію прозорої оболонки.

Прозора оболонка розчиняється проназою, трипсином, хімотрипсином та іншими протеолітичними ферментами (у хом'яків і



мишей – усіма цими ферментами, у корів – тільки проназою), та її стійкість до дії цих ферментів суттєво зростає після запліднення. Вважають також, що стійкість прозорої оболонки обумовлена часом перебування яйцеклітин у яйцепроводі самки (найшвидше перетравлюються прозорі оболонки незрілих яйцеклітин, найдовше – оболонки доімплантаційних зародків). Відомо також, що перебування ооцитів (незрілих або дозрілих *in vitro*) у середовищах без сироватки призводить до затвердіння прозорої оболонки, що викликає підвищення стійкості її до протеолітичних ферментів, а також до значного зниження частоти запліднення таких яйцеклітин. За штучної активації розчинність прозорої оболонки трипсином або проназою погіршується, але меншою мірою, ніж після запліднення.

Основне значення прозорої оболонки зводиться до участі у заплідненні. За допомогою глікопротеїну *ZP3* спермії зв'язуються з прозорою оболонкою, а після проникнення одного спермія в яйцеклітину цей глікопротеїн прозорої оболонки модифікується, і вона стає недоступною для інших сперміїв. У яйцеклітин з інтактною прозорою оболонкою блокада поліспермії розвивається за одну хвилину після запліднення.

Прозора оболонка зберігається протягом значної частини доімплантаційного розвитку зародків (кролі, вівці, свині). Завдяки прозорій оболонці бластомери зародка, що дробиться, розташовуються компактно і впорядковано, орієнтуючись в обмеженому тривимірному просторі. Це має важливе значення для взаємодії бластомерів і створення між ними максимальної кількості контактів, що сприяє нормальній компактизації і поляризації бластомерів. Якщо видалити прозору оболонку у некомпактизованих зародків, то дроблення бластомерів буде продовжуватися, однак у багатьох випадках вони будуть розташовуватися у вигляді ланцюга, і компактизація повністю порушиться і буде дуже запізнюватися.

Прозора оболонка перешкоджає випадковому злипанню сусідніх зародків (бластомери доімплантаційних зародків мають підвищену здатність до злипання), а також прилипання зародків до стінки яйцепроводу і матки, яке викликає загибель ранніх зародків. Тому при роботі *in vitro* з ранніми зародками з віддаленою прозорою оболонкою їх або поміщають в інші прозорі оболонки (наприклад, незрілих або дозрілих ооцитів), або використовують штучні оболонки, наприклад, з агару або желатину.

Важливу роль прозорої оболонки зазначено в досліджах, що

продемонстрували можливість кріоконсервування половинок 7-денних ембріонів великої рогатої худоби. Половинки пізніх морул або бластоцист великої рогатої худоби, кріоконсервованих без оболонки, були непридатні для пересадження. Пересадження заморожено-відтаяних половинок відмінної і хорошої якості, що були в одній оболонці, індукувало тільність у 25,0% реципієнтів. Переміщення ж половинок до додаткової прозорої оболонки бластоцист, що вилупилися, отриманих у свині, призвело до тільності 46,2% реципієнтів. Таким чином, переміщення напівембріонів у додаткову оболонку є ефективним методом збереження їхньої життєздатності при кріоконсервуванні.

Для пересадження половинок і чвертей до прозорих оболонок, використовують оболонки свіжоотриманих дегенерованих зародків або незапліднених яйцеклітин, а також оболонки статевих клітин і зародків, що зберігаються в 2,0 М розчині сахарози за температури -20°C.

Половинки і чверті ембріонів великої рогатої худоби пересаджують реципієнтам після нетривалого культивування, протягом якого вони компактизуються – набувають кулястої форми.

Застосовують різні способи нехірургічної трансплантації половинок ембріонів реципієнтам, синхронізованим за статевим циклом зі стадіями розвитку напівембріонів: по одній половинці пересаджують кожному реципієнтові в ріг матки; обидві половинки трансплантують одному реципієнтові в ріг матки зі сторони яєчника з жовтим тілом; дві половинки пересаджують одному реципієнтові в різні роги матки.

Двійні, що розвиваються в одному розі, можуть призводити до ускладнення отелень і високої смертності монозиготних близнюків. З метою підвищення приживаності половинок в один ріг матки можна пересадити як половинку, так і нерозподілену бластоцисту умовно-придатної якості з життєздатними клітинами трофектодерми, що обумовить підвищену інтенсивність ембріональних сигналів матці реципієнта на продовження функцій жовтого тіла статевого циклу і перетворення його на жовте тіло вагітності.

Установлено, що тривалість культивування половинок ембріонів більше 4-х год. знижує результативність їх наступної приживаності. Культивування *in vitro* половинок ембріонів великої рогатої худоби протягом 24-х год. знижує їх приживаність приблизно в три рази порівняно з культивуванням *in vitro* протягом 4...6 год.

За даними Дж. Хан і Т. Розеліуса, розподілення ембріонів суттєво не впливало на їх життєздатність. Якщо за пересадження цілих ембріонів одержано 63,5% тільності реципієнтів, то за трансплантації половинок – 58%. Тепер широко практикують розділення на половинки і четвертинки розморожених ембріонів.

Теоретично можливо розділити ембріони на досить велику кількість частин, і створити мікроклон, тим самим різко збільшити кількість нащадків. Проте, як зазначають Л.К. Ернст і А.К. Голубев, найперспективнішим шляхом є використання культури клітин. Якби вдалося культивувати окремо клітини ембріобласта і трофобласта без втрати їх специфічності, то потім створені ембріони (шляхом з'єднання клітин ембріобласта і трофобласта з клітинною культурою) давали б необмежені кількості однакових за генотипом нащадків (стандартних тварин). Але слід враховувати, що тут, як і за одержання монозиготних двійнят, відбувається копіювання генотипу, невідомого щодо продуктивних якостей організму. Це є основним недоліком зазначеного методу. Необхідно також враховувати, що за допомогою розглянутих методів поки що не вдалося одержати великої кількості ідентичних нащадків. Розподіл ембріона на велику кількість частин знижує їх здатність до розвитку. Однояйцеві близнюки не є абсолютними, зокрема фенотиповими копіями один одного. Так, у розподілених половинок 2-бластомерного ембріона миші була різна швидкість дроблення, а одержані таким способом ягнята-близнюки мали відмінності у пігментації вовни. Це також спостерігали у телят.

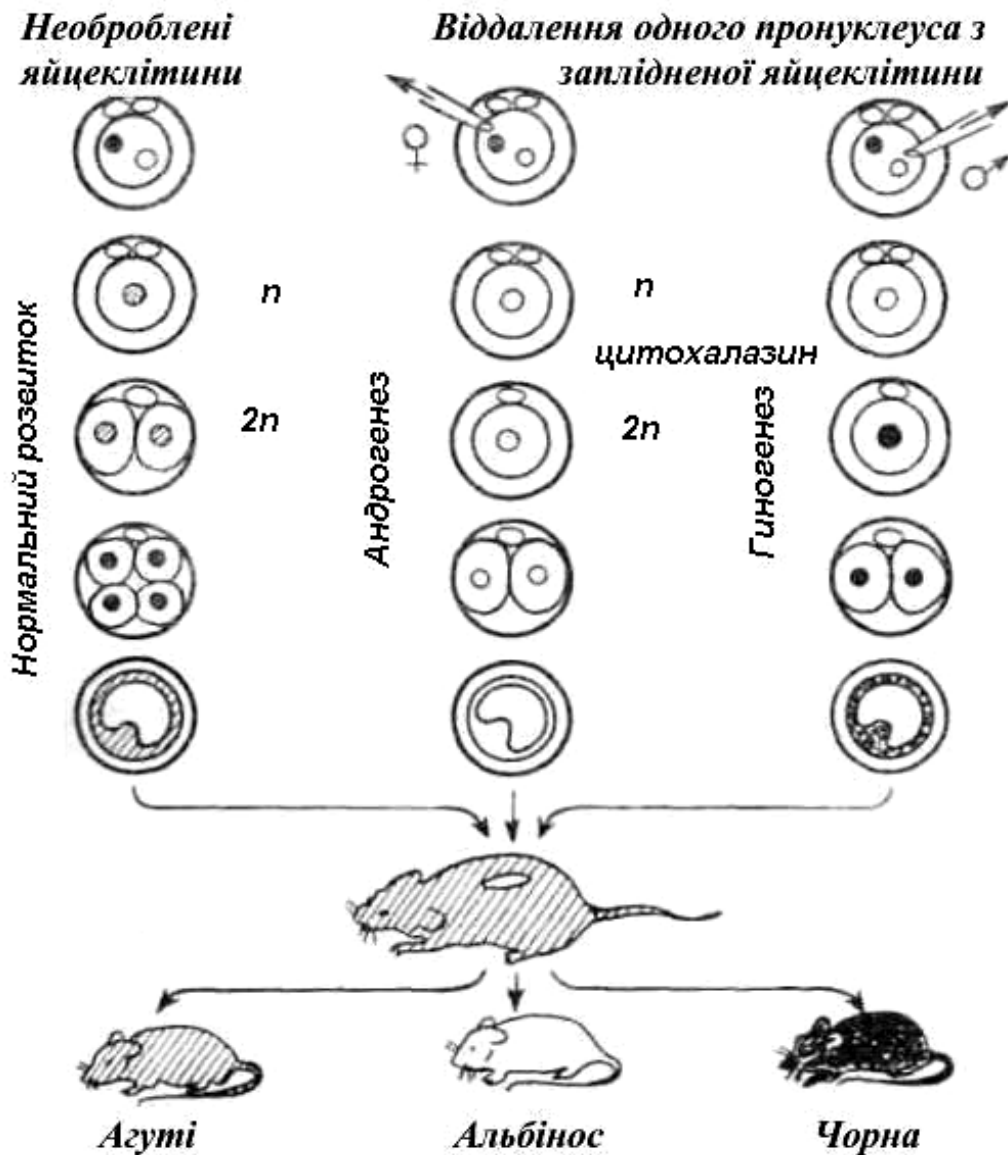
#### **6.4. Створення партеногенетичних тварин**

Під *партеногенезом* розуміють розвиток ембріона з жіночої гамети без участі чоловічої статевої клітини, тобто партеногенетичні особини в хромосомах містять тільки гени матері. Таким чином, партеногенез приймає форму безстатевого розмноження у тварин зі статевим способом відтворення.

У біології розмноження тварин розмежовують два різновиди партеногенезу – гіногенез і андрогенез. При *гіногенезі* спермії проникають в яйцеклітину, але її функція полягає лише в активації яйцеклітини, а ембріон розвивається без участі хромосом спермія. Однак, при гіногенезі спермії можуть внести в ядро яйцеклітини

позахромосомні, у тому числі й спадкоємні фактори, що здатні брати участь в індивідуальному розвитку тварини.

При **андрогенезі**, на відміну від справжнього партеногенезу, після активації жіночої гамети спермієм весь генетичний матеріал заплідненої яйцеклітини елімінується, і тому ембріон містить лише батьківський набір хромосом. У цьому разі зигота, а потім і ембріон, розвиваються тільки за участю набору хромосом чоловічого ядра (рис. 63).



**Рис. 63. Схема отримання різних типів партеногенетичних тварин**

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

Розрізняють диплоїдну і гаплоїдну форми партеногенезу. За

диплоїдного партеногенезу мейоз (тобто редукції числа хромосом) не відбувається, або диплоїдний набір хромосом відновлюється. Відомі два механізми диплоїзації партеногенезу: амейотичний і мейотичний.

За **амейотичного** партеногенезу активація яйцеклітин до партеногенезу відбувається на метафазі першого розподілу. Під впливом незвичайних умов на цій стадії мейозу яйцеклітини повністю придушується редукційний розподіл хромосом, потім відбувається другий – екваційний розподіл мейозу розподіл сестринних хроматидів.

У результаті таких процесів формується яйцеклітина з диплоїдним жіночим пронуклеусом. З таких яйцеклітин можуть розвиватися диплоїдні ембріони винятково жіночої статі. Хоча слід мати на увазі, що в ссавців, в тому числі й сільськогосподарських тварин, амейотичний партеногенез невідомий. Однак, при штучному придушенні мейозу є можливість одержання амейотичного партеногенезу, за допомогою якого весь набір генів (за відсутності кросинговеру, або перехрестя хромосом) матері може бути переданий нащадкам.

За **мейотичного** партеногенезу мейоз протікає нормально, тобто завершуються обидва розподіли з утворенням жіночого пронуклеусу. Останній поділяється на два гаплоїдні дочірні ядра, які об'єднуються в одне диплоїдне ядро, що забезпечує партеногенетичний розвиток ембріона, а потім і особини по материнській лінії.

У 1886 р. російський біолог А.А. Тихомиров відкрив явище штучного партеногенезу шовковичного шовкопряда. Уперше він експериментально довів, що незапліднена яйцеклітина шовковичного шовкопряда може бути активована до розвитку штучними стимулами, зокрема, розрідженою сірчаною кислотою. Це відкриття стало початком вивчення проблеми партеногенезу. Шовкопряд виявився найбільш придатним об'єктом для вивчення і практичного використання партеногенезу. Б.Л. Астауровим і В.А. Струнниковим було отримано різні варіанти партеногенетичних порід та ліній шовкопряда. Результати цих робіт викликають не тільки великий теоретичний інтерес, а й мають фактичне застосування в промисловому шовківництві.

**Природний партеногенез.** Природний партеногенез найпоширеніший у комах – палочників, жуків-довгоносиків, а також у ракоподібних і коловерток. Його виявлено також у бджіл (трутні),

ос, скельної ящірки, а серед свійських тварин – у індичок. Було помічено, що із незапліднених яєць белтсвилських дрібних білих індичок у деяких випадках (1...4%) можуть розвиватися ембріони. Селекція на підвищення частоти природного партеногенезу виявилася ефективною. У результаті цілеспрямованої селекції частка партеногенетичних яєць, що розвиваються, досягла 42%. Було помічено, що за відсутності відбору лише в поодиноких випадках партеногенетичний розвиток проходить до вилуплення пташенят-партеногенів. За здійснення селекції відсоток ембріонів, що розвиваються до пізніх стадій інкубації, зростає.

Слід зазначити, що всі партеногенетичні ембріони й індиченята, що сформувалися з них, були самцями. Цитогенетичний аналіз показав, що партеногени мали диплоїдний набір хромосом.

З погляду генетики одержання партеногенетичних самців можна пояснити таким чином. В індичок жіноча стать гетерогаметна (ZW). Тому самка має половину ооцитів з Z-статевою хромосоною, а половину – з W-статевою хромосоною. При партеногенетичному розвитку яєць відбувається злиття хромосом в ооцитах з Z-хромосоною, що призводить до утворення зиготи ZZ, з якої і утворюються життєздатні самці з нормальним для них набором статевих хромосом. При подвоєнні хромосом типу W утворюються зиготи, а потім і ембріони з набором хромосом WW, тобто позбавлені Z-хромосоми. Такі особини є нежиттєздатними. Слід підкреслити роль селекції в створенні партеногенетичних тварин і ліній. У згаданій породі індичок у результаті партеногенетичного розвитку із заплідненого яйця було отримано диплоїдного індика, який став батьком 122 нормальних індичат. Однак спонтанний партеногенез є лише винятком у розмноженні тварин. Навіть у наведеному прикладі з індіками природний партеногенез не можна розглядати як нормальний статевий процес.

**Штучний партеногенез.** На базі сучасної біотехнології можуть бути розроблені ефективні методи, що викликають штучний партеногенез шляхом стимуляції партеногенетичного розвитку яйцеклітини. Найбільший інтерес викликає індукований партеногенез у ссавців. Однак, у цього класу тварин це пов'язано з великими труднощами через особливості оогенезу. Справа в тому, що у ссавців, як правило, яйцеклітини овулюють на стадії метафази II. Тому партеногенетичному розвитку можуть бути піддані лише зрілі ооцити. Лише у 70-і роки, з розробкою методів культивування й

запліднення фолікулярних ооцитів *in vitro*, почалися широкі дослідження стимуляції партеногенезу в ссавців, у тому числі у великої рогатої худоби. Як стимулятори, що викликають партеногенетичний розвиток яйцеклітини, використовують механічні, фізичні, хімічні й біологічні фактори.

Активація ооцитів тварин призводить до різних шляхів партеногенетичного розвитку (рис. 64). Наведемо деякі приклади:

1. Завершення другого мейотичного поділу може призвести до виділення одного гаплоїдного набору хромосом у вигляді полярного тільца і формування єдиного пронуклеуса з іншого. Потім у гаплоїдному пронуклеусі відбувається реплікація ДНК, і яйцеклітина поділяється на два бластомери з гаплоїдними наборами хромосом. Ці зародки називають генетично однорідними гаплоїдами, тому що їх гомологічні хромосоми генетично ідентичні;
2. Ооцит, завершивши перший розподіл дозрівання, замість утворення другого полярного тільца (тобто минаючи другий мейотичний розподіл), вступає в дроблення – поділяється на дві однакові за розмірами гаплоїдні клітини, у кожній з яких формується пронуклеус (негайне дроблення). Внаслідок того, що розподіл відбувається після кросинговеру і обидва гаплоїдних набори не є генетично ідентичними, зародки називають мозаїчними гаплоїдами;
3. Після метафази другого розподілу дозрівання і розбіжності хромосом цитотомія не здійснюється (друге полярне тільце не виділяється), внаслідок чого відбувається формування двох гаплоїдних пронуклеусів. Після цього в одних випадках ооцит поділяється на два бластомери –мозаїчний гаплоїд, а в інших, після реплікації ДНК, формування метафазної пластинки і розподілу дроблення, розвивається гетерозиготний партеногенетичний диплоїд (гетерозиготність обумовлена кросинго-вером);
4. Ооцит не проходить другого розподілу дозрівання і хромосоми формують один великий диплоїдний пронуклеус. Після реплікації ДНК і наступного дроблення утворюються гетерозиготний (наслідок кросинговера) партеногенетичний диплоїд;
5. Відбувається нормальний мейоз із двома розподілами, після чого гаплоїдний набір хромосом яйцеклітини формує єдиний

пронуклеус, який після подвоєння свого хромосомного набору поділяється на два гаплоїдних ядра. Ці ядра зливаються, утворюють одне диплоїдне ядро, розвивається гомозиготний диплоїд. Різновидом цього шляху розвитку, що властивий шовковичному шовкопрядові, є утворення диплоїдного пронуклеуса в яйцеклітині ссавця після мікрохірургічного видалення чоловічого пронуклеуса і штучної диплоїдизації жіночого пронуклеуса зиготи, що залишився;

6. Цілком придушується редукційний розподіл або виділення першого полярного тільця (в останньому випадку хромосоми полярного тільця поєднуються з хромосомами ооциту). Далі відбувається розподіл, що призводить до розбіжності сестринних хроматид. Внаслідок цього в шовковичного шовкопряда утворюються два генетично ідентичних диплоїдних пронуклеуси (у деяких представників гетерогаметної статі), з одним із яких пов'язаний подальший розвиток: після реплікації ДНК яйцеклітина поділяється на два бластомери, кожен з яких містить диплоїдний набір хромосом. Розвивається гетерозиготний партеногенетичний диплоїд, генотип якого ідентичний генотипові матері (амейотичний партеногенез).

Крім названих шляхів розвитку стимульованих до партеногенезу ооцитів є й інші. Так, у деяких яйцеклітин утворюється три пронуклеуси, може мати місце тетраплоїдний партеногенез, гаплоїдний зародок може перетворюватися в гаплодиплоїдний та ін.

Одержання того або іншого типу партеногену обумовлене стадією оогенезу, на якій здійснюється активація ооцита, типом активуючого фактора, інтенсивністю впливу і тим поживним середовищем, у якому культивувалися яйцеклітини після активації.

Змінюючи ці фактори, можна спрямувати отримання партеногену того або іншого типу.

У більшості випадків, як показали дослідження, за оптимальних умов активації розвивається один тип партеногенів – однорідні гаплоїди, тобто яйцеклітини, що виділили після активації друге полярне тільце і мають один гаплоїдний пронуклеус. У такому гаплоїдному пронуклеусі здійснюється редуплікація ДНК і яйцеклітина розподіляється на два бластомери з гаплоїдним набором гомологічних хромосом. Інакше кажучи, цей шлях партеногенетичного розвитку яйцеклітин дозволяє отримати гомозиготних особин протягом одного покоління.



## Цитологічні перемінні

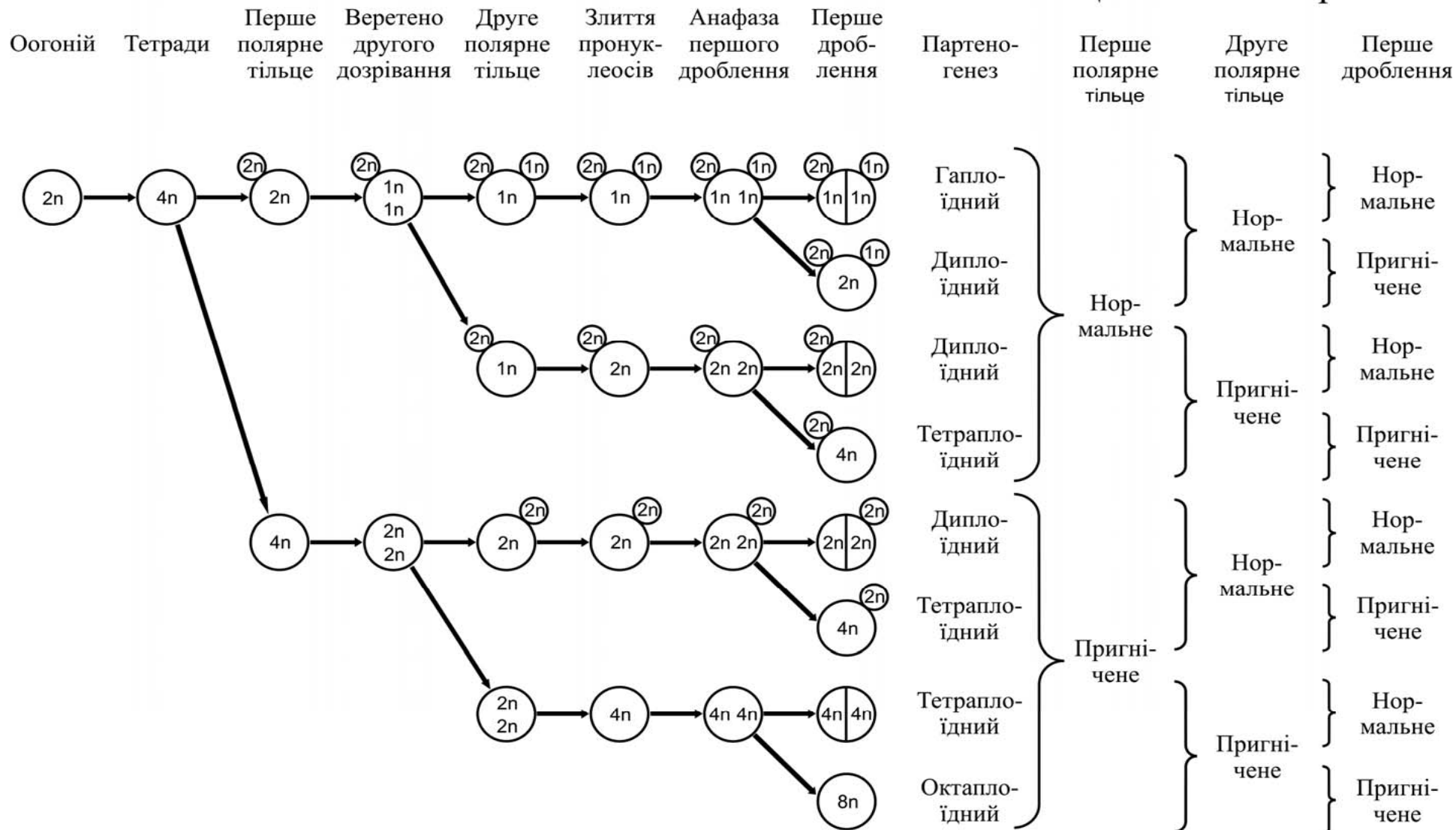


Рис. 64. Шляхи партеногенетичного розвитку з урахуванням трьох перемінних: першого та другого полярного тільця і першого дроблення (за Beatty, 1957)

Посилення інтенсивності впливу факторів, що активують, призводить до збільшення частоти мозаїчних гаплоїдів і обох типів диплоїдних партеногенетичних зародків.

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

Стимуляція електричним або температурним шоком є найбільш ефективною як *in vitro*, так і *in vivo*. Електричний струм активує до партеногенезу близько 3/4 свіжоовульованих яйцеклітин, 90% з яких досягає стадії морули або бластоцисти. Температурні впливи стимулюють до 90...100% яйцеклітин. При застосуванні осмотичного шоку активованих яйцеклітин було значно менше – 38...58%.

Є передумови одержання партеногенів і на більш ранніх стадіях стимуляції яйцеклітини ссавців. Цей підхід можливий в умовах культивування ооцитів *in vitro*. Виділені з яєчників ооцити можна культивувати до стадій метафази I і метафази II, після чого їх стимулюють до партеногенетичного розвитку з наступним культивуванням і трансплантацією реципієнтам.

Ооцити, що є на різних стадіях мейотичного дозрівання, стимулювалися до партеногенетичного розвитку холодним шоком за температури 0...4°C протягом 15...36 хв. Потім клітини прогрівали протягом 5 хв. за температури 37,5°C у звичайному середовищі культивування. Після прогрівання ооцити культивувалися у звичайних середовищах. Тривалість культивування ооцитів і зародків – 69...73 год.

Ознаками партеногенетичного розвитку були: виділення полярного тільця, утворення пронуклеусів, синкаріону, першої метафазної пластинки мітозу, дроблення клітин. Результати проведених досліджень показали, що при стимуляції ооцитів до партеногенезу на різних стадіях мейозу найвищий ефект спостерігається за їх активування на метафазі II.

Частка активованих до партеногенетичного розвитку ооцитів, що оцінювалася за виділенням другого напрямного тільця, утворенням пронуклеусів і проходженням першого розподілу дроблення, становила 56,4%. Цитогенетичний аналіз виявив наявність

ядер у бластомерах. Цікавим було те, що холодний шок на стадії метафази II призводив до мейотичного, а на метафазі I як до мейотичного, так і до амейотичного партеногенезу.

У великої рогатої худоби мейотичний партеногенез дозволить отримати майже повністю гомозиготних нащадків. За амейотичного партеногенезу, коли активування ооцитів до розвитку відбувається на метафазі I, є можливість майже повністю повторити генотип матері в її нащадках.

Короткочасний вплив на свіжоовульовані ооцити миші 7-процентним розчином етилового спирту протягом 1, 3 і 5 хвилин викликає однаково високу частоту партеногенетичної активації – 64,6; 69,5 і 63,7%, відповідно.

У досліджах виявлена чітка залежність інтенсивності дії етанолу від його концентрації і температури середовища під час активації. Показано, що максимальне число яйцеклітин активується 4-процентним етанолом за температури 33,2°C, а при 7-процентній його концентрації активізуючий вплив найбільш повно виражений за температури 24,5°C. Після трансплантації активованих яйцеклітин реципієнтам зародки до 72...96 год. досягали стадії морул і бластоцист.

Найбільший інтерес викликає застосування біологічних факторів, оскільки їх дія може зберігатися і у наступних поколіннях. Ефект інфікування курей та індичок вірусом саркоми Рауса або вірусом віспи птиці зберігається протягом двох поколінь і виявляється в збільшенні до 25% числа знесених яєць, здатних до партеногенетичного розвитку. Для викликання партеногенетичного активування дозрілих *in vitro* ооцитів великої рогатої худоби також використовують біологічні методи (віруси саркоми Рауса й віспи птиці, запліднення сперматозоїдами інших видів ссавців).

Досліди на мишах показали, що партеногенетичні зародки здатні у своєму ранньому ембріональному розвитку завершити передімплантаційну стадію, тобто утворити бластоцисти. Однак, партеногенетичні бластоцисти здебільшого не можуть імплантуватися або гинуть на початкових стадіях постімплантаційного періоду.

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

характерна для всіх типів партеногенетичних зародків. Однак, слід зазначити, що диплоїдні партеногенетичні зародки розвиваються краще і гинуть пізніше гаплоїдних. Морфологічні і гістологічні дослідження показали, що партеногенетичні, особливо гаплоїдні бластоцисти, нерідко відрізняються значними відхиленнями від норми. Це негативно позначається не тільки на розвитку партеногенетичних зародків, а й на результатах їхньої імплантації.

Дотепер механізм загибелі партеногенетичних зародків у ссавців не з'ясований. Висловлено припущення, що загибель викликана порушенням темпів дроблення, формуванням неповноцінних бластоцист, десинхронізацією процесів, що протікають у стінці слизової матки та в трофоектодермі при введенні зародка в слизову матки.

А.П. Дибан і Е.М. Ноніашвілі (1986) припускають, що загибель партеногенетичних зародків мишей може бути викликана нестабільністю їхнього каріотипу, появою хромосомних аберацій, а також обумовлюватися рецесивними летальними мутаціями, ефект яких проявляється в гемізіготному стані алелів у гаплоїдів. Ці ж автори, узагальнивши великий літературний матеріал, указують на дві основні гіпотези загибелі постімплантаційних партеногенетичних зародків.

Відповідно до першої – за активації яйцеклітини до партеногенетичного розвитку її цитоплазма стає неповноцінною.

На підставі останніх експериментів і теоретичного аналізу отриманих результатів була сформульована друга гіпотеза, що має все більше визнання. Останнім часом у дослідях з реципрокними пересадженнями пронуклеусів між зиготами миші було показано, що у ссавців для завершення ембріогенезу необхідні як чоловічий, так і жіночий пронуклеуси.

Класичні досліді М. Сурані зі співавторами, проведені на мишах, показали, що ні подвійна доза материнських генів (партеногенетичні ембріони), ні подвійна доза батьківських генів (андрогенетичні ембріони), ні наявність у ембріонів диплоїдних одноматеринських і однобатьківських клітин недостатні для нормального ембріонального розвитку, що для завершення ембріогенезу клітина повинна мати і материнські, і батьківські хромосоми.

Було показано, що чоловічий геном необхідний для утворення позазародкових тканин, а жіночий – для проходження визначених

стадій ембріогенезу. В роботі, проведеної також на мишах, показано, що чоловічий геном необхідний для розвитку трофктодерми (ТЕ) і надалі – плаценти, але до 8-клітинної стадії участь батьківського генома в повноцінному розвитку мишачих ембріонів не обов'язкова. Гаплоїдний набір недостатній для проліферації клітин, тому виживають тільки диплоїдизовані клітини. Нормальний розвиток ембріонів можливий лише в тому випадку, якщо бластоцисти містять як клітини внутрішньої клітинної маси (ВКМ), так і клітини трофктодерми. Це пояснюється тим, що клітини ВКМ і ТЕ відрізняються низкою властивостей. Клітини ТЕ під індукційним впливом ВКМ проліферують і з них утворюються позазародкові тканини, коли клітини ВКМ не утворюють зародкових оболонок, а формують тіло зародка, тобто його тканини і органи.

Незважаючи на проведені дослідження, механізм партеногенетичного розвитку у великої рогатої худоби ще не повністю розпізнаний. Тільки остаточне вивчення механізму партеногенетичної активності ооцитів сприятиме розробці надійного методу клонування, одержання майже повністю гомозиготних нащадків (мейотичний партеногенез) або генетичних копій матері (амейотичний партеногенез). За допомогою клонування можливо буде прискореними темпами створити генетичні лінії в племінному скотарстві і популяції ідентичних особин з необхідними генотипами для ефективного виробництва молока і м'яса в промисловому скотарстві.

Дуже важливим за клонування тварин є амейотичний партеногенез, що дозволяє практично без змін повторювати цінний генотип матері в її потомстві. Можливість одержання тільки жіночих особин, наприклад, у великої рогатої худоби, що в поєднанні із кращими продуктивними якостями, як повторюються в наступних поколіннях, значно спрощує селекцію. Комплексне використання методів партеногенетичного розвитку яйцеклітин і їхньої трансплантації дозволяє перевести відтворення високопродуктивних тварин на промислову основу, що має велике господарське значення.

Стимуляція партеногенетичного розвитку дає можливість у перспективі одержувати величезну кількість гомозиготного або одноманітного за генотипом потомства. Це дозволить у найкоротший термін різко підвищити продуктивність тварин і одержувати особин бажаної статі. Створення черід із клонованих тварин буде сприяти розвитку промислового тваринництва. Тварин одного генотипу

можна утримувати на однаковому раціоні, непотрібно здійснювати селекцію за екстер'єром, реакціями поведінки, вименем й іншими ознаками. Полегшується розробка питань машинного доїння, норм годівлі. Створений доїльний апарат для однієї корови буде придатним для всіх її генетичних аналогів.

Таким чином, створення клонів тварин можна розглядати як ефективну біотехнологію майбутнього племінного і користувального скотарства.

## **6.5. Створення химерних тварин (генетичних мозаїків)**

Поняття химера (грец. *Chimaira*) означає складена тварина. У сучасному понятті термін химера використовується головним чином за одержання складених організмів, у яких генетично різні клітинні популяції походять більше, ніж від однієї зиготи або зародка. За класифікацією К. Форда (1969), варто розрізняти первинний химеризм, коли різні клітинні популяції співіснують із моменту запліднення або раннього ембріогенезу, і вторинний, за якого комбінуються тканини від двох і більше дорослих особин або ембріонів після початку глибокої клітинної диференціації. Наприклад, у близнюків великої рогатої худоби спостерігається загальний плацентарний кровообіг і в крові можна виявити вторинний химеризм (Завертяєв Б.П., 1987). Варто відрізняти химер від спонтанно виниклих складених тварин – мозаїків, що походять з однієї заплідненої яйцеклітини.

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

**Методи створення експериментальних химер.** Усі дотепер відомі в науці експериментальні химери ссавців створені методами агрегації двох (або більше) генотипічно різнорідних зародків або шляхом мікроін'єкції клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоціль ембріона-реципієнта. Перший метод

дістав назву агрегаційний, другий – ін'єкційний. Схематично ці методи показано на рис. 65.

**Агрегаційний метод.** Уперше агрегаційний метод одержання химерних мишей був розроблений *A. Tarkowski* (1961, 1963) і *B. Mintz* (1962).

Два ембріони, що розрізняються генотипами на стадії 8...12 бластомерів, обробляють протеолітичним ферментом проназою, вивільняють від зони пелюциду і зближують один з одним у культуральному середовищі. З'єднані ембріони культивують протягом 24...48 год. до завершення агрегації, тобто до утворення бластоцисти. Використають середовище Бринстера в краплях модифікованого розчину Кребса – Рингера з бікарбонатом, а також інші. Отримані таким чином химерні ембріони трансплантують реципієнтній миші. Агрегаційні химери можливо одержувати не тільки між двома ембріонами, а й між різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів (Мак-Ларен Е., 1979). При цьому маса химерних ембріонів буває не більше ніж у звичайних, тобто вона підлягає дії механізмів ембріональної регуляції. Перевага агрегаційного методу полягає в тому, що він не потребує втручання мікрохірургічної техніки, що дозволяє широко його використати в ембріогенетиці.

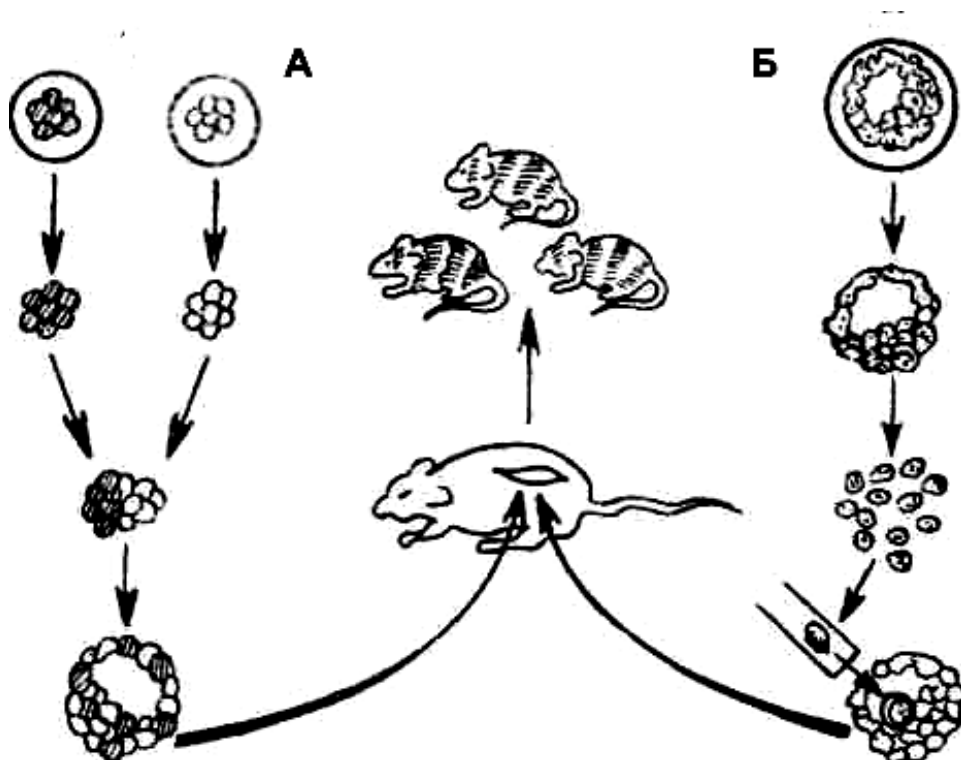


Рис. 65. Схема отримання химерних мишей агрегаційним (А) та ін'єкційним (Б) методами (Завертяєв Б.П., 1989)

**Ін'єкційний метод.** Ін'єкційний метод, що потребує застосування мікроманіпуляційної техніки й мікрохірургічного втручання, був розроблений Р. Гарднером (1968). За ін'єкційного методу використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Бластоцисту тримають усмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікроманіпулятори, у трофобласті шляхом проколів голками зони пелюциду роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Пізніше вдалося встановити, що за цим методом можливо ін'єктувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, а й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують миші-реципієнтови.

Ін'єкційний метод знайшов застосування за одержання міжвидових химер.

Для ідентифікації химерних тварин застосовують ряд маркерів. Як маркерні використовують гени, що контролюють пігментацію, структуру шерсті, антигенні, біохімічні, морфологічні й ін. За одержання химерних тварин, що створюються від фенотипових контрастних порід або видів, широко використовують морфологічні маркери (рис. 66).



**Рис. 66. Химерні миші**

(за матеріалами співробітників лабораторії генетики розвитку Інституту загальної генетики РАН Мартинової М.Ю. і Ісаєва Д.А.)



**Створення химерних лабораторних ссавців.** Першими створеними й ідентифікованими химерами були миші між лініями агуті і неагуті (чорна). Химери виявилися крапчастими, причому агуті (кремовий колір) і чорне забарвленням, перемішуючись, формували своєрідний візерунок (Mintz B., 1965). Надалі було показано, що в експериментальних химер, отриманих з пігментованої і непігментованої ліній, стрижні деяких шерстинок були повністю пігментовані, інші – зовсім позбавлені меланіну, а треті – були плямистими. Таким чином, у забарвленні шерсті мишей проявляється дія батьківських генів з характерним різним ступенем проміжної експресії генів. Якщо химеризм стосується кількох локусів, що впливають на колір шерсті, за утворення пігменту відбуваються фенотипові взаємодії.

Одержання агрегаційних внутрішньовидових химер-мишей дозволило встановити, що в організмі химери є генотипово різні популяції клітин, тобто генетична мозаїка. Це дозволяє аналізувати механізм дії різних генів, особливо мутантних, у процесі онтогенезу ссавців (Конюхов Б.П., Платонов Е.З., 1985).

Химери-миші отримані ін'єкційним методом, використання якого поглибило знання в проблемі детермінації клітин в онтогенезі. Наприклад, показано, що чим пізніше стадія розвитку ембріона, від якого взята ВКМ для ін'єкції в бластоциль, тим менша ймовірність одержання химер, і, нарешті, на основі ін'єкційного методу було отримано нові дані для розкриття механізму диференціації й малігнізації (від лат. *malignus* шкідливий, згубний, злякисне переродження пухлини) клітин. На підставі цих даних з'ясовано, що, наприклад, багато генів які раніше «мовчали» у ракових клітинах, експресуються не тільки в онтогенезі миші, а й у її потомства. Отже, виникнення злякисних новоутворень може бути обумовлено зміною експресії нормального клітинного генома і не слід розглядати мутації як єдину причину малігнізації.

У зв'язку з цим можна відзначити, що при ін'єкції в бластоцисту ВКМ тератокарциноми, її клітини у разі інтеграції в ембріон втрачають ракові ознаки. Отже, пухлинні клітини під впливом нормальних ембріональних клітин перетворюються на нормальні. Ці дані мають велике значення за виведення химерних тварин, стійких до пухлинних захворювань.

В останні роки велика увага приділяється одержанню міжвидових і міжпородних химер ссавців. Це особливо важливо в селекції

сільськогосподарських тварин, тому що міжвидові або міжпородні химери в одному організмі можуть поєднувати різні господарсько-важливі ознаки.

Уперше міжвидові химери були отримані ін'єкційними і агрегаційними методами між двома близькими видами мишей, які звичайно не схрещуються – *M. musculus* і *M. caroli*. У міжвидових химер, отриманих шляхом ін'єкції ВКМ *M. caroli* у бластоцисти *M. musculus* і пересаджених реципієнтам останнього виду, не виявили імуногенетичної несумісності клітин, і їхній розвиток відбувався нормально. Якщо ж міжвидові химери одержували реципрокною ін'єкцією і розвиток зародків відбувався в організмі *M. musculus*, то химери гинули протягом 16 діб після пересадки. Це свідчить про те, що бластоцисти *M. caroli* дегенерують у матці *M. musculus*, в той час як агрегація двох генетично різних зародків забезпечує життєздатність химер.

Уперше міжвидові химерні зародки між мишею і пацюком шляхом агрегації морул було отримано у 70-х роках. У 1973 р. в експерименті з ін'єкції ВКМ пацюка в бластоцисту миші химерні бластоцисти були пересаджені в матку миші, де вони розвивалися до 30 пар сомітів (Gardner R. G., Johnson M., 1973). У подальших дослідках ці автори отримали всі химерні ембріони до середини вагітності й декілька – до народження. Результати досліджень показали вирішальну роль у виживанні ембріонів сумісності трофобласта і матки.

**Створення химер сільськогосподарських тварин.** Успіхи, досягнуті в розробці методів створення химерних лабораторних ссавців, дозволили практично підійти до створення химер сільськогосподарських тварин. На початку 80-х років була спроба одержання химерних телят від корів *Bos taurus* і *Bos indicus*. У цих експериментах використовували агрегаційний метод, тобто ранні ембріони, що були на стадії морули, обробляли проназою, видаляли *in vitro* прозору оболонку і змішаний агрегат бластомерів культивували *in vitro*. Пересаджені коровам-реципієнтам химерні морули гинули (Sammer P.M. et al., 1983). Автори довели, що метод агрегації неприйнятний для одержання химерних тварин великої рогатої худоби, тому що важко видалити 5-процентною проназою зону пеллюциду. Крім того, ще немає надійного середовища для культивування *in vitro* 8...12-клітинних змішаних агрегатів бластомерів.

Із цих причин дослідники застосували ін'єкційний метод, увівши ВКМ бластоцисти донора в бластоціль реципієнтного ембріона. Ін'єкцію ВКМ робили за описаною раніше методикою R. Gardnera (1968). Ембріони культивували у фізіологічному розчині Дульбекко з буферним фосфатом і добавками біологічно активних речовин.

Внаслідок ін'єкції від 1 до 6 клітин 7-денних ембріонів виду *Bos taurus* у бластоціль виду *Bos indicus* народилося 7 телят, серед яких одне (SV 29) був ідентифіковано як химерне чотирьох батьків. Фенотипово воно не відрізнялося від однолітків, але за еритроцитарного типірування в нього було виявлено еритроцитарний антиген, типовий для *Bos taurus*. Автори припускають, що химеризм міг би бути й в інших телят, однак через відсутність відповідних маркерів їм не вдалося точно встановити цей факт.

Останнім часом були отримані міжвидові химери між вівцею і козою, яких назвали вівцекозами. Відомо, що вівця ( $2n = 54$ ) і коза ( $2n = 60$ ) не належать до близьких видів і між собою не схрещуються. Уперше таких химерних тварин вивели в 1984 р. у Великобританії (Fehilly C. et al., 1984) і у ФРН (Meinecke-Tillmans, Meinecke B., 1984).

C. Fehilly зі співробітниками для одержання міжвидових химер між вівцею і козою застосовували агрегаційний та ін'єкційний методи і реципрокні пересадження. Агрегаційним методом було отримано 6, а ін'єкційним методом 2 химери. Шерсть у таких тварин являла собою суміш вихідних видів, роги за будовою були як у кози, але закручені як у барана, проте екстер'єр відповідав одному із батьківських видів. Таким чином, у химер спостерігали мозаїчність тільки волосяного покриву. Цікавим є факт народження ягняти від кози й цапеняти від вівці. Ці так звані однокомпонентні тварини розвивалися з ін'єкційних химер.

У досліді S. Meinecke-Tillman і В. Meinecke були отримані лише агрегаційні химери. Агрегація зародків відбувалася на стадії 8...12 бластомерів. Химерні бластоцисти пересаджували в матку вівці. З 15 трансплантованих ембріонів народилося два ягняти і одне цапеня, але аналіз крові не виявив химеризму. Однак, як і в першому досліді, вівця була здатною виносити цапеня. За припущенням авторів, відсутність імунологічної реакції обумовлено наявністю в плаценті агрегованого зародка клітин овечого генотипу.

У США в Каліфорнійському університеті від ін'єкції ВКМ бластоцисти кіз у бластоцисту овець було отримано овечо-козячі

химери (Polzir V. et al., 1987). Двадцять дві химерні бластоцисти хірургічно трансплантували 12 вівцям-реципієнтам. Від 9 суягних овець було отримано 13 нащадків. За електрофоретичним аналізом крові і каріотипом десять тварин віднесли до вівці, одну – до кози і дві – до міжвидових овечо-козячих химер.

У 1987 р. в університеті штату Каліфорнія США за ін'єкційним методом отримано міжпородні химери вівці – між породами рамбульє і фінський ландрас. З 36 отриманих ягнят у 16 за методом аналізу груп крові і каріотипу було підтверджено химерізм.

У 1982 р. у ФРН ін'єкція хромосомально маркірованих клітин бластоцисти в нормальну бластоцисту великої рогатої худоби і наступне пересадження корові-реципієнтови химерної зиготи призвели до народження химерної телички (Stranziger G., 1986). Чотири батьки, реципієнт і химерна теличка були досліджені цитогенетичними і біохімічними методами. У цієї телички за рядом ознак установлений химерізм. Автори довели ефективність ін'єкційного методу.

Пізніше у ФРН (1985) було отримано химерних телят після агрегації половинок 32-клітинних ембріонів від корів контрастних порід – швицької (бурої) і голштино-фризської. Із семи народжених телят у п'яти були відсутні ознаки химерізму, а в двох у фенотипі поєднувалася характерна масть вихідних порід – бура і чорно-строката.

У колишньому Радянському Союзі ін'єкційним методом виведено химерний бичок від чорно-рябої і червоної порід, що у фенотипі поєднує чорно-рябу масть із червоними плямами (Л.К. Ернст, 1987).

Таким чином, проведені експерименти показали можливість одержання химер (генетичних мозаїків) у тваринництві.

Химерні тварини не передають нащадкам характерну для них генетичну мозаїчність. Подібно гетерозиготним або гібридним тваринам у нащадків відбувається розщеплення, внаслідок чого порушуються цінні генетичні комбінації. Хоча химерні тварини підтримують господарсько-важливі ознаки лише протягом одного покоління, у розведенні великої рогатої худоби вони можуть викликати великий практичний інтерес. Наприклад, можна створити химерних тварин, що поєднують такі ознаки, як молочна і м'ясна продуктивність, що є антагоністами і несумісні в одному організмі. Створення ін'єкційних химер шляхом введення в ембріон певних

ліній клітин дозволить поліпшити імунну систему і підвищити резистентність до ряду хвороб.

Метод одержання експериментальних химер становить великий інтерес для створення ліній (клонів) тварин шляхом партеногенезу. Ембріони ссавців, що розвиваються з партеногенетично активованих яйцеклітин, як показано, гинуть. Однак, за агрегації з біологічно повноцінними ембріонами клітини ранніх партеногенетичних зародків впливають на побудову тканин химерної тварини. Якщо з партеногенетичних клонів клітин будуть формуватися гамети химерної особини, то її генотип можлив закріпити в наступному поколінні.

Важливою особливістю химерних ембріонів є те, що вони підтримують життєздатність клітин зародків летальних генотипів. Наприклад, химери, отримані від нормальних і нежиттєздатних зародків-трисомиків за хромосомами 17, 15 і 12, нормально розвивалися і давали потомство, що не має трисомиків. Химерні ембріони становлять великий інтерес для вивчення можливості розробки методів клонування дорослих тварин шляхом партеногенезу. Доведено, що пересадження мишам і великій рогатій худобі химерних ембріонів, які складаються з клітин звичайних (отриманих у результаті запліднення) і диплоїдних гомозиготних гіногенетичних зародків, призвело до народження живого потомства, органи і тканини якого походили як від звичайних, так і партеногенетичних бластомерів. Наступні експерименти підтвердили участь партеногенетичних клітин химерних зародків миші в розвитку ембріона. Отже, для завершення ембріонального розвитку наявність материнських і батьківських хромосом у кожному бластомері не обов'язкова. Для завершення ембріогенезу і народження химерного потомства миші може бути достатньою одна клітина 8-бластомерного звичайного ембріона, агрегованого з 4-бластомерним партеногеноном. Дослідження тканин химерних мишей показало, що всі клітини, що створилися від гаплоїдних партеногенонів, мали диплоїдний набір хромосом. Гаплоїдного набору не достатньо для проліферації клітин, тому виживають лише диплоїдизовані клітини. Виходячи з вищевикладеного, робимо висновок, що клонування тварин-донорів ооцитів шляхом трансплантації реципієнтам химерних зародків, які складаються з клітин звичайних і амейотичних партеногенетичних ембріонів становить великий інтерес. Такий химерний ембріон може бути отриманий методами мікроманіпуляцій

шляхом заміни клітин ВКМ звичайної бластоцисти на ВКМ бластоцисти партеногенетичного походження, тобто химерна бластоциста буде складатися з клітин ТЕ звичайної бластоцисти і ВКМ бластоцисти-партеногена. Наявність батьківських хромосом у трофктодермі химерної бластоцисти, ймовірно, забезпечить імплантацію і формування позазародкових тканин, а можливо, і розвиток ембріона з генотипом партеногена.

Одержання тварин з бажаними якостями іншим шляхом може стати пересадження химерних ембріонів, що складаються з клітин різновікових партеногенетичних і звичайних зародків. Дослідження показали, що для одержання химерних телят не обов'язково використання одновікових ембріонів. Агрегація ізольованої імунохірургічним способом внутрішньої клітинної маси 8- і 10-денних ембріонів або шляхом розрізу внутрішньої клітинної маси 14-денних ембріонів великої рогатої худоби з 5,5-денними морулами відбувалася в 89, 62 і 0% випадків, відповідно. Трансплантація 8 агрегованих ембріонів, що складаються з клітин 5,5- й 8-денних ембріонів, і 11 ембріонів, що складаються з клітин 5,5- і 10-денних ембріонів, призвела до народження шести і чотирьох телят, відповідно. У першому випадку п'ять з шести телят виявилися химерами, причому з фенотипом, здебільшого характерним для ізольованих клітин внутрішньої клітинної маси.

У даний час обговорюються можливості використання химерних ембріонів за розробки нових підходів до клонування зародків з використанням ембріональних стовбурових клітин (ЕС-клітин). Так, для мишей показана принципова можливість одержання живих нащадків, що повністю утворюються з ЕС-клітин, шляхом введення 12...15 ЕС-клітин у порожнину бластоцист із вилученої власної ВКМ. Однак, ці мишенята відрізнялися зниженою життєздатністю і загинули незабаром після народження.

Нові можливості в селекції тварин відкриваються з використанням у дослідах за одержання трансгенних тварин бластоцист, у порожнину яких ін'єктовано генетично трансформовані ембріональні стовбурові клітини. Пересадження таких химерних бластоцист може призвести до народження химерних тварин, у яких частина клітин різних органів, у тому числі гонад, буде походити від ембріональних стовбурних клітин. В останньому випадку частина потомства може виявитися трансгенною. Вважається, що такий метод одержання трансгенних тварин є більш ефективним, ніж

ін'єкціячДНК (чужорідної ДНК) у чоловічий пронуклеус, тому що дозволяє оцінити трансформацію генома ЕС-клітин до їх введення в ембріон.

Більш простий спосіб одержання химерних ембріонів з використанням ЕС-клітин запропонував С. Вуд зі співавторами. Звільнені від прозорої оболонки 8-клітинні ембріони мишей культивували на моношарі ЕС-клітин, після чого ембріони з ЕС-клітинами, що прикріпилися до них, переносили в звичайне середовище і культивували до стадії бластоцисти; у процесі культивування ЕС-клітини колонізували ВКМ бластоцист. Цей спосіб, зазначають автори, є ефективним для одержання химер, скорочує час і спрощує маніпуляції порівняно з введенням ЕС-клітин у порожнину бластоцисти.

Використання химерних ембріонів може розширити можливості дослідників у вирішенні ряду фундаментальних проблем біології розвитку.

### ***Контрольні запитання***

1. На підставі чого і які типи клонування розрізняють?
2. У чому різниця процесу клонування амфібій і ссавців?
3. Які показники впливають на частоту злиття ізольованих бластомерів великої рогатої худоби з енуклеюваними ооцитами?
4. Які способи розділу ембріонів застосовують у наш час?
5. Які показники враховують за оцінки якості ембріонів для мікро-хірургічних робіт?
6. У чому полягає значення прозорої оболонки в процесах запліднення і клонування?
7. Які існують види партеногенезу? Чому андрогенез можна здійснити лише штучним шляхом?
8. Чим у наш час пояснюється неможливість отримання життєздатних партеногенетичних ссавців?
9. Які способи створення химер існують?
10. Які можливості надає процес створення химер у селекції, трансгенезі, клонуванні?

## РОЗДІЛ 7

### ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Промислова біотехнологія – це наука про одержання різних цільових продуктів на основі життєдіяльності мікроорганізмів. Її основою є робота з мікробними організмами. А тому, промислова мікробіологія (або технічна мікробіологія) в даний час є самостійною і найбільш великотоннажною галуззю сучасної промислової біотехнології. Величезна різноманітність мікроорганізмів, які утилізують як ростові субстрати різні сполуки, у тому числі відходи, дозволяє отримувати широкий спектр біологічно активних сполук, а також здійснювати корисні для людини реакції, включаючи знешкодження відходів, трансформацію і здобуття енергії, і багато іншого.

У даний час в різних процесах промислової мікробіології одержують близько 200 сполук, що мають комерційну цінність. Найважливішими серед них є: амінокислоти, антибіотики, антиметаболіти, антиоксиданти, білки, вітаміни, гербіциди, інсектициди, коферменти, ліпіди, нуклеїнові кислоти, органічні кислоти, пігменти, полісахариди, протипухлинні агенти, ферменти, нуклеотиди, емульгатори.

#### **7.1. Кормові препарати для сільськогосподарських тварин**

Усі незамінні амінокислоти повинні міститися у білках їжі в певних співвідношеннях, що відповідають потребам даного організму. Якщо хоч би однієї амінокислоти не вистачає, то інші амінокислоти, що є в надлишку, не використовуються для синтезу білків (відповідно до механізму синтезу білків). За таких умов для забезпечення подальшого синтезу білкових речовин і підтримки життєдіяльності організму буде потрібна додаткова кількість харчового або кормового білка, внаслідок чого має місце перевитрата кормів і підвищення собівартості продукції тваринництва.

Для запобігання перевитрати кормів необхідно контролювати



збалансованість білків корму за вмістом незамінних амінокислот і загальної кількості білка в кормі. Для оцінки амінокислотного складу білків визначають показники, що характеризують їх біологічну поживну цінність. Кормові і харчові білки, що мають оптимальний вміст незамінних амінокислот, називають біологічно повноцінними білками.

У результаті узагальнення численних даних досліджень амінокислотного складу білків Міжнародною організацією з продовольства і сільського господарства (ФАО), створеною при ООН, розроблено рекомендації, в яких дається оптимальний вміст незамінних амінокислот у харчових і кормових білках. Ці рекомендації використовуються як еталон за оцінки біологічної поживної цінності різних білків. Наприклад, якщо прийняти за 100% біологічну цінність еталонного, за рекомендаціями ФАО, білка, то біологічна цінність більшості тваринних білків становить 90...95%, білків вегетативної маси бобових трав – 80...90%; білків зерна зернобобових і насіння олійних культур, картоплі, коренеплодів, овочів, вегетативної маси багатьох трав'янистих рослин – 75...85%; білків зерна більшості злакових культур – 60...70%; особливо низька біологічна цінність білків зерна кукурудзи – 52...58%.

Якщо вміст білків у рослинній масі, що використовується для годівлі сільськогосподарських тварин, нижче норми, для того, щоб уникнути перевитрати кормів і підвищення собівартості тваринницької продукції, кількість білка в кормі балансують введенням білкових добавок. Нестачу до норми вмісту будь-якої амінокислоти балансують додаванням в корм чистих препаратів дефіцитних амінокислот або білкової маси, що має вищий вміст даної амінокислоти порівняно з еталоном.

Найбільш збалансований вміст незамінних амінокислот мають білки насіння сої (табл. 10). У них бракує до еталону лише метионіну і триптофану. Відносно високу біологічну цінність мають також білки зерна рису і гороху. У той же час зернові культури, що вирощуються в нашій країні – пшениця, кукурудза, ячмінь – відрізняються незбалансованим амінокислотним складом білків. У білках зерна пшениці і ячменю дуже мало міститься лізину, метионіну й ізолейцину, а в білках зерна кукурудзи ще і триптофану.

Високою інтенсивністю синтезу білків відрізняються багато мікроорганізмів, причому білки мікробних клітин мають збільшений вміст незамінних амінокислот. Спеціальними дослідженнями було

проведено харчову і токсикологічну оцінку білкової мікробної маси, яка показує, що клітини деяких мікроорганізмів можна використовувати як концентровані кормові добавки, що не поступаються за біологічною цінністю білків соєвому шроту або рибному борошну.

Таблиця 10

**Вміст незамінних амінокислот у різних білках (г у 100 г білка)**

Амінокислоти	Молоко корови	Еталон ФАО	Соє	Горох	Рис	Пшениця	Кукурудза	Ячмінь
Лізин	6,6	4,2	6,6	6,5	3,5	2,6	2,5	3,2
Триптофан	1,4	1,4	1,3	0,8	1,3	1,3	0,6	1,2
Метионін	2,4	2,2	1,4	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7
Треонін	4,6	2,8	3,8	3,8	3,5	2,6	3,2	2,9
Валін	6,9	4,2	5,4	4,5	6,5	4,6	4,4	5,4
Лейцин	9,9	4,8	7,9	6,5	8,0	6,9	11,2	7,2
Ізолейцин	6,6	4,2	5,3	5,0	4,6	3,4	2,7	3,5
Фенілаланін	4,9	2,8	5,1	4,8	5,2	4,3	4,1	5,1

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

### 7.1.1. Отримання кормового білка

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

Відповідно до норм харчування людина повинна щоденно отримувати із їжею від 60 до 120 г повноцінного білка. Для

правильного годування сільськогосподарських тварин необхідно щоб в їх раціоні на кожну кормову одиницю містилося не менше 110 г добре перетравного і повноцінного протеїну.

Нетрадиційним і принципово новим способом отримання білкових речовин є мікробіологічний синтез. За швидкістю росту мікроорганізми перевершують сільськогосподарські культури в сотні, а тварин – у тисячі разів. Тому мікробіологічний синтез більш ефективно використовує матеріальні й енергетичні ресурси, не потребує великих земельних площ і не залежить від погодних та кліматичних умов, не забруднює навколишнє середовище отрутохімікатами, оскільки не використовує пестициди. Якість мікробних білків близька до білків тваринного походження. Застосування мікробних білків у кормовиробництві поліпшує якість і засвоюваність традиційних рослинних кормів. Наприклад, 1 т кормових дріжджів забезпечує економію 5 т зерна і збільшує продуктивність у тваринництві на 15...30%. Сучасний середній завод з виробництва мікробного білка потужністю 50 т/рік, що займає площу 0,2 га, може забезпечити потребу в протеїні до 10 млн. чоловік. Сільськогосподарські технології для таких масштабів виробництва повинні мати до 16 тис. га, засіяних пшеницею, або утримувати ферму з продуктивністю 400 порослят/день.

У 60-і роки виник новий термін – білок одноклітинних (*single cell protein*, «SCP»), що означає цілі неживі висушені мікробні клітини (водоростей, дріжджів, бактерій, грибів), призначені як білковий продукт для кормових і харчових цілей. Термін дещо умовний, оскільки в мікробних біомасах, окрім білків, суттєву частку займають інші компоненти – цукри, ліпіди, нуклеїнові кислоти. Білок одноклітинних повинен задовольняти спеціальні вимоги. Головними є: поживність, перетравність, економічна ефективність. Поживність мікробного білка за хімічним складом близька до традиційних білкових продуктів (табл. 11).

Мікробна біомаса поживна, якщо її компоненти перетравлюються ферментами травного тракту вищих тварин або людини. Перешкодою цьому можуть бути клітинні стінки окремих продуцентів, які заздалегідь доводиться руйнувати, а також високий рівень нуклеїнових кислот. Останні метаболізуються в організмі тварин і виводяться з організму із сечею, отже, не є для вищих тварин небезпекою. Для людини такий рівень нуклеїнових кислот неприйнятний, оскільки у процесі їх засвоєння можливе порушення

обміну речовин і виникнення патологічного стану. Тому для харчових цілей мікробну біомасу заздалегідь обробляють, використовуючи різні методи руйнування і денуклеїзації.

*Таблиця 11*

**Хімічний склад мікробних біомас і традиційних білкових продуктів (за Waterworth, 1982)**

Склад, %	Водорості	Нитчасті гриби	Дріжджі	Бактерії	Соя	Рибне борошно
Білок	47...63	31...50	47...56	72...83	45	64
Жири	7...20	2...8	2-6	1...3	1	9
Зола	7	2	6	8	6	18
Лізін	2,4	1,5	4,2	4,1	2,8	4,0
Метіонін – Цистеїн	1,7	0,8	1,7	2,3	1,3	2,8
Нуклеїнові кислоти	3...8	9	6...12	8...16	нема	нема

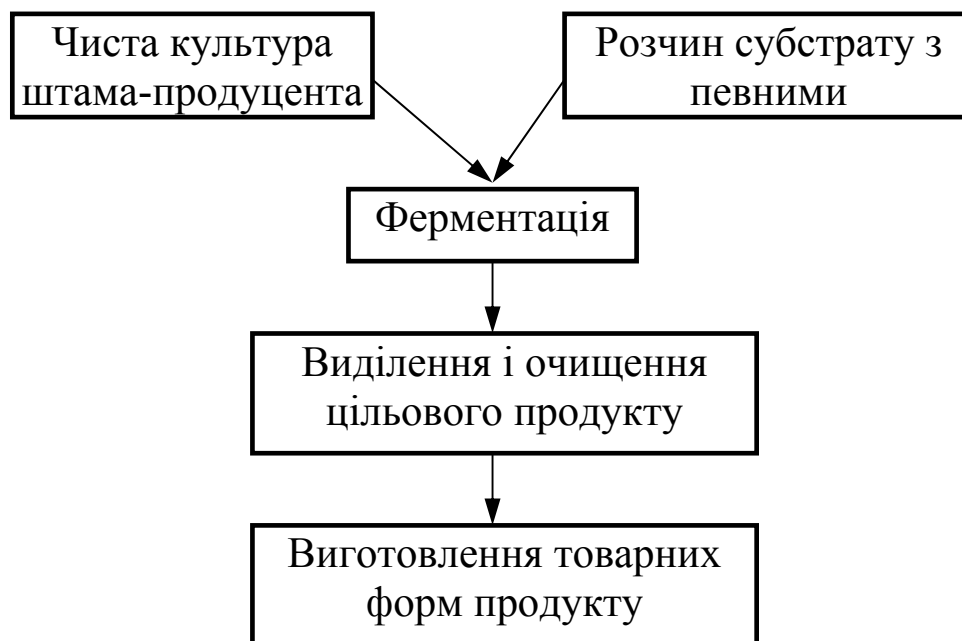
У техніко-економічних показниках мікробіологічного синтезу білка визначальне значення мають питомі витрати і вартість сировини (до 50% в структурі всіх витрат) та енерговитрати (до 15...30%). Тому найважливішим питанням при розробці нових технологій отримання білка одноклітинних є доступність сировинної бази. Доступність сировини – це наявність різних резервних варіантів, що дозволяють оперативно замінювати і використовувати різні джерела сировини без суттєвої зміни якості отриманого продукту. У сучасних промислових процесах використовують як чисту сировину постійного хімічного складу, так і комплексні сполуки, включаючи відходи різних виробництв. Останнє економічно найвигідніше і має величезне значення для охорони навколишнього середовища.

Мікроорганізми здатні засвоювати різні вуглеводовмісні субстрати, які прийнято підрозділяти на декілька поколінь:

- перше покоління – вуглеводи;
- друге покоління – рідкі вуглеводні;
- третє покоління – оксидати вуглеводнів, газоподібні вуглеводні, вуглекислий газ, включаючи суміші воднем.

Незалежно від виду використаної сировини, типова схема мікробіологічного виробництва білка передбачає п'ять операцій: підготовка сировини, підготовка біологічно діючого першоджерела,

стадія ферментації, виділення і очищення цільового продукту, приготування товарних форм продуктів (рис. 67).



*Рис. 67. Схема біотехнологічного процесу*

Велике значення має якість вихідного посівного матеріалу (інокуляту). Інокулят отримують з музейної культури в декілька стадій із застосуванням принципу масштабування. Підготовлені інокулят, основний ростовий субстрат і всі необхідні поживні компоненти разом з повітрям додають у ферментер, в якому відбувається основна стадія біотехнологічного процесу – ферментація. Стадія ферментації проводиться відповідно до технологічного регламенту, розробленого для конкретного процесу, включаючи субстрат і тип продуцента. Вона зводиться до дозованого надходження у ферментер потоків поживних речовин і повітря (або газової суміші), стабілізації основних параметрів процесу на заданих рівнях і своєчасного відведення з апарату відпрацьованого повітря, продуктів, що утворюються, а також тепла.

Максимальні швидкості синтезу білкових речовин мікробними клітинами реалізуються за оптимальних умов середовища, коли питома швидкість росту близька до максимальної. Тому для отримання білка одноклітинних біотехнологічні процеси реалізують в проточному режимі, що дозволяє стабілізувати практично всі параметри стадії ферментації на рівнях, оптимальних для розмноження клітин з швидкостями росту, близькими до максимальних, тобто в режимі білкової спрямованості біосинтезу. За

виробництва біомаси як кормового білкового продукту, як правило, здійснюється режим незахищеної ферментації, тобто без дотримання правил стерильності. Останнє виправдане як умовами ферментації (проточне культивування), так і специфікою вживаних субстратів і штамів-продуцентів, а також сферою застосування кінцевого продукту. Отримувана на стадії ферментації суспензія з 1,0...2,5% вмістом мікробної біомаси за сухою речовиною (АСР), тобто 10...25 кг/м<sup>3</sup>, на стадії постферментації піддається згущуванню у декілька етапів до 12...16% АСР і термообробці, під час якої протягом 10...40 хвилин за температури 75...90°C практично всі клітини штаму-продуцента і супутня мікрофлора гинуть. Після стадії термообробки суспензію у вакуумвипаровувальних установках згущують до концентрації 20...25% АСР і далі висушують до залишкової вологості кінцевого продукту близько 10%. Дрібнодисперсний порошок висушених клітин гранулюють. Порошок або гранулят фасують по 25...30 кг і затарюють у багатошарові паперові мішки.

Обов'язковою умовою технологічного процесу отримання мікробної біомаси є очищення газо-повітряних викидів, що утворюються на стадії ферментації і постферментації у вигляді великих об'ємів повітря, забрудненого живими мікробними клітинами, білковим пилом й іншими продуктами мікробного синтезу. Очищенню піддаються також великі об'єми культуральної рідини, що утворюється після відокремлення клітинної біомаси. Очищена рідина використовується в циклі зворотного водопостачання технологічної схеми виробництва.

Технологія отримання мікробного білка є в даний час найбільш великотоннажною галуззю біотехнології, що виробляє найважливіші кормові препарати і білкові добавки для тваринництва, звірівництва, птахівництва, рибництва, а також білок харчового призначення з використанням різноманітної сировини і субстратів.

**Субстрати першого покоління – вуглеводи.** Ідею використання біомаси мікроорганізмів як білкового компоненту живлення з 1890 р. починав пропагувати М. Дельбрюк, який разом із колегами розробив перший технологічний процес вирощування пивних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на мелясі. Отриману дріжджову біомасу рекомендували використовувати як білкову добавку до харчових продуктів. Під час першої світової війни потужність установок з виробництва дріжджового білка, що діяли у Німеччині, досягала 10 тис. тонн/рік. Отримуваний продукт використовували, головним

чином, додаючи до м'ясних фаршів. До середини 30-х років виробництва дріжджів на гідролізатах відходів сільського господарства і деревообробної промисловості, сульфїтному луґу, барді гідролїзних заводів почали з'являтися у рїзних країнах. У Росїї перший завод з виробництва кормових дріжджів з відходів сільського господарства був запусшений у 1935 р. Під час другої світової війни біомаса харчових дріжджів (*Candida arborea* і *C. utilis*) також була важливим білковим компонентом харчування у Німеччині. Після другої світової війни серію заводів з виробництва харчових дріжджів на вуглеводній сировині продуктивністю 10...12 тонн на добу було побудовано в рїзних країнах.

У даний час в мікробіолоґічних виробництвах білка застосовується рїзна цукрововмісна сировина. Це відходи харчової, молочної, спиртної, цукрової і целюлозної промисловості та продукти переробки рослинної сировини (деревини, соломи, торфу, неїстівних часток рослин – стеблини, лушпиння). Поживне середовище, приготовлене на основі названих субстратів, містить набори моно- і дисахаридів, органічні кислоти, спирти та інші органічні сполуки, а також мінеральні елементи, тобто є складними багатоконпонентними субстратами. Тому за їх застосування використовують штами-продуценти, здатні, по-перше, засвоювати як пентози, так і гексози, і, по-друге, – стійкі до присутності спиртів, фурфуролу та інших продуктів гідролїзу рослинних біомас. Найбільшого поширення набули види дріжджів роду *Candida*: *C. utilis*, *C. scottii*, *C. tropicalis*, здатні утилізувати поряд із гексозами пентози і толерантні до наявності фурфуролу в середовищі. Дріжджі утилізували вуглеводовмісні компоненти гідролїзатів, сульфїтного луґу послїдовно: глюкоза, оцтова кислота, маноза, ксилоза, галактоза, арабіноза. Залежно від вибраної схеми культивування дріжджів повнота використання названих вуглеводовмісних компонентів рїзна; максимальна – за використання змішаних культур. Застосовуються дві, найбільш ефективні, схеми з'єднання апаратів ферментації при спільному вирощуванні *C. scottii* і *C. tropicalis*: двоступенева послїдовна і паралельно-послїдовна. У першому варіанті як вихідне поживне середовище використовують нерозбавлений гідролїзат (сусло) із концентрацією редукуючих речовин (РР) 30...35 г/л (за масою). У першому ферментері утилізується до 70% РР, головним чином за рахунок легкозасвоюваних гексоз, до залишкової концентрації РР до 10...15 г/л, в основному, пентоз. Отримані в

першому апараті дріжджі виділяються із дріжджової суспензії і піддаються обробці до отримання готового продукту; відокремлена культуральна рідина поступає в другий апарат, в якому пентози, що залишилися, утилізуються більш пристосованими до них іншими штамми дріжджів. За другим варіантом використовують два послідовно з'єднаних ферменти: у перший надходить розбавлене сушло концентрацією РР близько 15...18 г/л, у ньому в ході ферментації дріжджів утилізуються в основному гексози. Далі дріжджова суспензія поступає в другий апарат, в якому без додавання субстрату відбувається доутилізація цукрів, що залишилися. Загальний вихід дріжджів досягає при цьому 70...80% по відношенню до РР.

Для збагачення дріжджової біомаси вітаміном  $D_2$  дріжджі опромінують ультрафіолетом, під впливом якого ергостерин, що міститься в ліпідній фракції клітин, перетворюється на вітамін. Склад біомаси дріжджів – це (%): білок – 43...58, ліпіди – 2...3, вуглеводи – 11...23, зола – 11, залишкова вологість – не більше 10.

Нарощування обсягів виробництва кормових дріжджів на гідролізатах деревини стримується існуючим рівнем технологій хімічного гідролізу рослинної сировини. Деякі переваги мають процеси отримання кормових дріжджів на підприємствах целюлозно-паперової промисловості, оскільки відходи даного виробництва (сульфітний луг, передгідролізат) мають порівняно низьку собівартість. Вихід дріжджів з 1 т целюлози досягає 37 кг за комплексного отримання дріжджів і спирту та 96 кг – за отримання лише дріжджів, вміст сирого протеїну в біомасі – 48%.

Є перспективним залучення як субстрату для отримання кормових дріжджів продуктів сумісного гідролізу рослинної сировини і мулу очисних споруд. При цьому поживне середовище додатково збагачується амінокислотами рослинного і тваринного походження. Це збільшує вихід дріжджів і вміст у них білка. Сировинна база виробництва мікробного кормового білка розширюється також за рахунок використання гідролізатів торфу, що містять у великих кількостях легкозасвоювані моноцукри, а також органічні кислоти. Вихід дріжджів досягає 65...68% від РР гідролізатів, при цьому якість дріжджової біомаси перевершує дріжджі, вирощені на гідролізатах відходів рослинної сировини.

Серед нових джерел сировини великий інтерес викликають так звані поновлювані ресурси вуглеводів, що одержують із лігнін-



целюлозних матеріалів. Дані матеріали з метою оцукрювання піддають обробці з використанням традиційних фізичних і хімічних, а також біотехнологічних методів, наприклад, на основі целюлолітичних ферментів або мікробних клітин. Мікробні клітини (дріжджі, бактерії, гриби білої гнилі) в процесі росту розкладають целюлозу і збагачують отриманий білковий продукт амінокислотами. Коло таких продуцентів розширюється за рахунок швидкорослих представників не лише дріжджів, але і грибів та бактерій, наприклад, родів *Trichoderma*, *Cellulomonas*, *Aspergillus* і *Alcaligenes*, що володіють порівняно з дріжджами вищими швидкостями росту і кращим набором амінокислот.

**Субстрати другого покоління** – рідкі вуглеводні. Здатність мікроорганізмів використовувати як основний ростовий субстрат вуглеводні була доведена В.О. Таусоном у 1935 р. Інтенсивні наукові дослідження вуглеводнів, як потенційного субстрату для отримання білка одноклітинних, були розгорнені в 50...60-і роки ХХ століття. Було встановлено, що мікроорганізмами можуть засвоюватися практично всі класи вуглеводнів, включаючи прямогонні дизельні фракції, очищені рідкі парафіни, масляні дистилати й інші нафтопродукти, що містять n-парафіни. Але з найбільшими швидкостями утилізувалися вуглеводні нормальної будови з довжиною вуглецевого ланцюга  $C_{11}...C_{18}$ , що скипають за температури 200...320°C.

Як штами-продуценти білка одноклітинних на вуглеводнях найбільшого поширення набули дріжджі роду *Candida*: *C. guilliermondii*, *C. maltosa*, *C. scottii*. Отримані в результаті селекційно-генетичної роботи швидкорослі штами стійкі до витіснення іншими мікробними видами в умовах нестерильної промислової культури. За отримання білкової біомаси на вуглеводнях є суттєві обмеження, оскільки в вихідних парафінах можуть бути присутніми циклічні вуглеводні. Тому як сировина використовується лише високоочищені парафіни із вмістом ароматичних вуглеводнів не більше 0,01%. Парафіни не розчиняються у воді, тому культивування на даному субстраті здійснюється в емульсії, що являє собою дрібнодисперговані в середовищі краплини вуглеводнів діаметром не більше 5 мкм. У даному разі культура є чотирифазною системою (газ – рідина – рідкі вуглеводні – мікробні клітини). Крім перемішування на ефективність диспергування вуглеводнів впливає також поверхневе натягування, тому дуже важливий склад і реологічні

властивості поживного середовища. Парафіни є лише джерелом енергії і вуглецю для мікроорганізмів, тому всі необхідні для росту дріжджів макро- і мікроелементи дозують в поживне середовище відповідно до потреб у них культури. До поживного середовища вводяться сульфат амонію, суперфосфат, хлорид калію і розчин мікроелементів, а також ПАР (поверхнево-активні речовини) для зниження поверхневого натягування і підвищення швидкості росту дріжджів. Аміачна вода, що використовується для корекції рН середовища, є також додатковим джерелом азоту. Вміст парафінів у вихідному поживному середовищі на стадії ферментації становить 3...5%. Готовий продукт, БВК (білково-вітамінний концентрат), отриманий на вуглеводнях, містить (%): сирий протеїн – до 60, жири – 5, вуглеводи – 10...20, зола, волога – до 10; вітамін D<sub>2</sub> – до 4000 МО і вітаміни групи В.

До середини 70-х рр. технології отримання білка одноклітинних на вуглеводнях були розроблені всіма розвиненими країнами. Однак цей напрям виробництва білка одноклітинних не дістав розвитку, за винятком Росії, оскільки вартість БВК із вуглеводнів поки не удалося знизити до рівня традиційних кормових продуктів (соевого і рибного борошна).

**Субстрати третього покоління** – оксидади вуглеводнів, газоподібні вуглеводні, вуглекислота, водень. Перспективними видами сировини для великотоннажного отримання мікробного білка прийнято вважати спирти, природний газ, водень. Масштаби виробництва, технологічність нижчих спиртів та якість отримуваного мікробного білка висунули метанол і етанол у розряд найбільш перспективних субстратів. Дослідження процесів мікробного синтезу на спиртах з середини 70-х років розгорнули всі розвинені країни. Було доведено, що здатність засвоювати метанол властива як дріжджам (роду *Hansenula*, *Candida*), так і бактеріям (*Pseudomonas*, *Methylomonas*).

Переваги метанолу порівняно з рідкими вуглеводнями полягають у прекрасній розчинності у воді, високій чистоті та відсутності канцерогенних домішок, високій летючості. Це дозволяє легко видаляти його залишки із готового продукту на стадії термообробки і висушування. Тепловиділення в ході ферментації на метанолі також суттєво нижче внаслідок хімічної будови спиртів і наявності в їхньому складі кисню. Біологічна активність спиртів, що виявляється по відношенню до сторонньої мікрофлори, є додатковим

фактором, який забезпечує домінування в культурі виробничих штамів-продуцентів. Однак горючість спиртів і можливість утворення з повітрям вибухонебезпечних сумішей (діапазон концентрацій 6...35% об'ємних), а також токсичність потребують спеціальних заходів для безпечного режиму роботи.

Поживне середовище, окрім спирту (8...10 г/л), містить усі необхідні для нелімітованого росту клітин елементи живлення. Окрім традиційних макро- і мікроелементів у середовище як додаткове джерело азотного живлення і вітамінів вводять дріжджовий екстракт (50 мг/л).

Отримані на метанолі дріжджі мають такий склад (%): сирий протеїн – 56...62, ліпіди – 5...6, нуклеїнові кислоти – 5...6, зола – 7...11, вологість – не вище 10.

При використанні як продуцента білка одноклітинних бактерійних форм (*Methylomonas clara*, *Ps. rosea*) бактеріальна біомаса порівняно з дріжджовою містить більше азотовмісних компонентів (%): сирого протеїну – до 74, нуклеїнових кислот – 10...13.

Високоочищеним субстратом для отримання мікробного білка харчового призначення є етанол. Найбільш продуктивні виробничі штами дріжджів (*S. utilis*, *Hansenula anomala*) забезпечують отримання білкового продукту харчового призначення з вмістом білка до 60%. До недавнього часу питання про реалізацію процесу отримання мікробного білка на спиртах у промислових масштабах не було злободенним через досить високу відпускну ціну на даний субстрат. Проте у зв'язку з розробкою останніми роками ефективніших технологій отримання спиртів і підвищенням попиту на білкові продукти дана технологія стала перспективною.

У 70-і роки з пошуком нових доступних джерел сировини почали розглядати можливості залучення для отримання мікробного білка газоподібних вуглеводнів, головним чином, – метану, джерелом якого є природний газ. Природний газ, окрім порівняно низької вартості та доступності, характеризується відсутністю домішок, що інгібують ріст мікроорганізмів. Це дозволяє отримувати порівняно великі виходи біомаси та не потребує спеціального очищення ні вихідної сировини, ні отриманої біомаси. Продуцентами мікробного білка на метані є бактерії родів *Methylococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Methanomonas*, які утилізували метан як джерело вуглецю і енергії. Біомаса містить (%): сирий протеїн – до 75,

нуклеїнові кислоти – 10, ліпіди – 5, зола – до 10, вологість – не вище 10. Отримуваний білок за вмістом і співвідношення амінокислот близький до рибного борошна і соєвих шротів.

Принципово новим напрямом у дослідженні перспективних продуцентів білка є залучення фотоавтотрофних організмів, які використовують як джерело вуглецю вуглекислоту, а енергії – світло. Дослідження водоростей, як можливих продуцентів білка, проводять декілька десятиліть. Увага до водоростей пояснюється способом їх живлення, хімічним складом біомаси, технологічністю. Процес приросту біомаси водоростей відбувається за рахунок фотосинтезу, тому головним фактором, що визначає ефективність, є освітленість. З середини 60-х років як перспективні біосинтетичні білка активно розглядали водорості (*Chlorella*, *Scenedesmus*). Проте ці надії не виправдалися через малу доступність даних біомас (неперетравлювані клітинні стінки, необхідність дезінтеграції клітин і очищення білків від токсичного хлорофілу та ін.), а також низьку енергетичну ефективність фотосинтезу.

Ефективним білковим продуктом виявилися ціанобактерії роду *Spirulina*, що ростуть у природних умовах і здатні фіксувати атмосферний азот. Біомаса *Spirulina* містить (%): до 70 білків, повноцінного амінокислотного складу, 19 вуглеводів, 4 нуклеїнових кислот і 4 ліпідів, 6 пігментів і по 3 золи і волокон. Клітинна стінка має відмінний від мікроводоростей склад і легко перетравлюється. Низький рівень нуклеїнових кислот у біомасі, нетоксичність пігментів, високий рівень перетравного білка, – все це зробило дану біомасу повноцінним білковим продуктом харчового призначення. За метаболізму білків спіруліни в організмі людини не утворюється холестерину, тому даний білок почали розглядати як компонент дієтичного харчування.

Перші згадки про спіруліну відносяться до початку XVI ст., коли на базарах в околицях Мехіко продавали у вигляді галет висушену *Spirulina maxima*, росла у природних умовах в лужному озері Текськоїко. В середині XIX ст. бельгійська експедиція через Сахару на сільських базарах у районі озера Чад також виявила синьо-зелені галети, що є висушеною біомасою іншої популяції, – *Spirulina platensis*, яка росте у лужних ставках, що оточують озеро.

Спіруліна росте практично як монокультура, оскільки рН озерної води в місцях її природного перебування досягає 10,5...11,0. Завдяки наявності в клітинах, наповнених газом, вакуолей, клубки

водоростей спливають на поверхню, і вітер виносить їх на берег. Час подвоєння біомаси спіруліни становить 3...4 дні, і збирати урожай можна цілодобово. В оптимальних умовах вихід біомаси – до 20 г АСР/м<sup>2</sup> на добу. Це на порядок перевищує урожаї пшениці, при цьому якість отриманого білка істотно вища рослинного (табл. 12).

Таблиця 12

**Продуктивність вищих рослин і спіруліни (за А. Сассоном, 1987)**

Продуцент	Вихід, т/га/рік	
	Маса (АСР)	Неочищений білок
Пшениця	4	0,5
Кукурудза	7	1,0
Соєві боби	6	2,4
Спіруліна	50	35,0

Експерименти за дослідження біологічної цінності спіруліни, виконані Французьким інститутом нафти спільно з компанією «Соса Текськоко», завершилися в 1973 р. створенням першої дослідної фабрики. До 1982 р. виробництво досягло 1000 т/г. Головними імпортерами продукту (борошно, пігулки) є Японія, США, європейські країни.

Генетичне вдосконалення наявних штамів *Spirulina* може суттєво підвищити їх урожайність. Отримані мутанти, в яких за збереження швидкості росту, пул амінокислот може бути суттєво вище, ніж у вихідного. Показана можливість вирощування спіруліни в штучних лужних ставках, а також у зливних теплих водах теплостанцій.

У середині 70-х років активізувалися дослідження, спрямовані на розробку технологій отримання мікробного білка з використанням хемолітоавтотрофних мікроорганізмів. Це бактерії, що використовують як джерело вуглецю вуглекислоту, а енергії – реакцію окислення водню. Перспективність воденьокислюючих бактерій визначається їхньою автотрофією і незалежністю від дефіцитних джерел органічної сировини, швидким ростом, високим вмістом повноцінного за амінокислотним складом білка, відсутністю позаклітинних проміжних продуктів обміну органічної природи (єдиним побічним продуктом процесу окислення водню є вода), високою екологічною чистотою процесу виробництва і отриманого продукту. Як джерело водню, окрім електролізного, можуть бути використані різні воденьвмісні гази, включаючи синтез-газ і відходи

ряду хімічних та нафтохімічних виробництв, а вуглекислоти – топкові гази і вуглекислота біохімічних виробництв. Таким чином, виробництво білка одноклітинних на основі воденьокислюючих бактерій може виконувати функції очисної споруди. В той же час дана технологія за рядом показників (важкорозчинний і вибухонебезпечний газовий субстрат) має обмеження аналогічне способу отримання білка одноклітинних на метані. Технологія отримання мікробного білка на основі водневих бактерій реалізована на рівні дослідного виробництва.

Нині порівняно з природним газом біотехнологія на основі водню вважається менш доступною для організації великотоннажного виробництва білка одноклітинних. Однак, у зв'язку з прогнозами розвитку водневої енергетики і високою екологічною чистотою даний процес, безсумнівно, є перспективним.

Таким чином, для ефективного заповнення наявного дефіциту білка можуть бути реалізовані різні нетрадиційні біотехнології за залучення різноманітних субстратів і штамів-продуцентів. Історія мікробного білка тільки починається, і якщо в даний час білки одноклітинних принципово не можуть вирішити проблему існуючого білкового дефіциту, то в наступні роки вони відіграватимуть усе більшу роль в житті людини.

### **7.1.2. Виробництво незамінних амінокислот**

Амінокислоти з кожним роком знаходять все більше застосування як кормові і харчові добавки та приправи, сировина фармацевтичної і парфумерної промисловості. Всі амінокислоти, з яких складаються білки, є L-формами. Із 20 амінокислот – 8 (ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін) незамінні для людини. Для сільськогосподарських тварин цей список доповнюють гістидин і аргінін, а для молодняка птиці – ще і пролін. Тому у великих кількостях амінокислоти використовують для балансування кормів. Введення до складу комбікормів амінокислот скорочує витрати дефіцитних білків тваринного походження. За останніх 10 років кількість амінокислот, що використовуються в кормовиробництві, зросла в 15 разів. Це майже 70% від обсягу їх виробництва. До 30% вироблених амінокислот використовується в харчовій промисловості. Так, цистеїн запобігає пригоранню їжі в процесі приготування, поліпшує

якість хліба при випічці, посилює запах їжі. Гліцин, що має освіжаючий, солодкуватий смак, використовується за виробництва напоїв. Глутамінова кислота – для посилення смаку і консервування їжі. Ряд амінокислот (аргінін, аспартат, цистеїн, фенілаланін та ін.) використовують у медицині, в хімічній і фармацевтичній промисловості як попередники для виробництва поліамінокислот, поліуретану і препаратів для сільського господарства.

Отримання амінокислот можливе декількома шляхами: хімічним синтезом, гідролізом природної білкової сировини і в біотехнологічних процесах. Хімічний синтез дає *рацемат* – продукт, що містить як L-, так і D-форми амінокислот. За винятком гліцину, який не має оптично активних ізомерів, і метіоніну, засвоєного організмами в обох формах, D-ізомери володіють токсичністю. Отримання оптично активних L-ізомерів амінокислот із гідролізатів природних матеріалів рослинного і тваринного походження пов'язане з багатоступінчастим і дорогим очищенням. Біотехнологічне отримання амінокислот включає пряму мікробну ферментацію, а також мікробіологічний або ферментативний синтез із попередників.

Мікробіологічний метод отримання амінокислот, найбільш поширений в даний час, заснований на здатності мікроорганізмів синтезувати всі L-амінокислоти, а в певних умовах – забезпечувати їх надсинтез. Біосинтез амінокислот у мікробних клітинах відбувається у вигляді так званих вільних амінокислот або пулу амінокислот, з якого в процесах конструктивного метаболізму синтезуються клітинні макромолекули. Для синтезу всіх білків необхідно 20 амінокислот. Шляхи синтезу більшості амінокислот взаємопов'язані. При цьому одні амінокислоти є попередниками для біосинтезу інших. Піруват є попередником аланіну, валіну, лейцину; 3-фосфогліцерат – серіну, гліцину, цистеїну; щавлево-оцтова кислота – аспартату, аспарагіну, метіоніну, лізину, треоніну, ізолейцину;  $\alpha$ -кетоглутарова кислота – глутамату, глутаміну, аргініну, проліну; фосфоенолпіруват + еритрозо-4-фосфат – фенілаланіну, тирозину, триптофану; 5-фосфорибозіл-1-пірофосфат + АТФ – гістидину. Синтез кожної амінокислоти в мікробних клітинах перебуває під суворим генетичним контролем і реалізується в чітко визначених кількостях, що забезпечує утворення наступних амінокислот. Контроль здійснюється за принципом зворотного зв'язку на рівні генів, відповідальних за синтез певних ферментів (репресія), і на рівні самих ферментів, які внаслідок надлишку амінокислот, що

утворюються, можуть змінювати свою активність (ретроінгібування). Даний механізм контролю виключає надвиробництво амінокислот і також перешкоджає їх виділенню з клітин у навколишнє середовище. Щоб досягти надсинтезу окремих амінокислот, необхідно обійти або змінити даний контрольний механізм їх синтезу. Для першого шляху можливе використання природних диких штамів; дуже суттєві при цьому умови ферментації, оскільки досягти дисбалансу в системі синтезу амінокислот можливо шляхом зміни ряду основних факторів середовища (концентрація основного субстрату, рН, співвідношення макро- і мікроелементів у середовищі та ін.). Зміна контрольного механізму синтезу амінокислот здійснюється генетичними методами. При цьому отримують організми мутанти: ауксотрофи і регуляторні (конститутивні) мутанти. Ауксотрофні мутанти – це організми, що втратили здатність до синтезу однієї або декількох амінокислот.

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

Для отримання таких амінокислот, як L-глутамату, L-валіну, L-аланіну, L-глутаміну і L-проліну можливе застосування природних штамів і посилення в них продукції амінокислот умовами ферментації. Синтез L-глутамата можна переключати на утворення L-глутаміну або L-проліну, змінюючи умови ферментації. За підвищення концентрації йонів амонію і біотину в середовищі стимулюється утворення L-проліну; слабкокислое середовище та йони цинку за надлишку амонію посилюють синтез L-глутаміну.

Ауксотрофні мутанти використовують у разі, коли необхідно синтезувати амінокислоти, що є кінцевими продуктами розгалужених ланцюгів метаболічних реакцій амінокислот. Наприклад, для отримання L-лізину, L-треоніну, L-метіоніну або L-ізолейцину, для яких загальним попередником є L-аспартат, застосовують мутанти, ауксотрофні за гомосеріном або треоніном і гомосеріном. Ауксотрофні мутанти не здатні утворювати інгібітори відповідного метаболічного шляху, що працюють за принципом негативного зворотного зв'язку через відсутність певної ключової ферментативної



реакції. Тому за вирощування такого штаму в середовищі з мінімальною концентрацією необхідного інгредієнта (амінокислоти) вони здатні на суперпродукцію амінокислоти-попередника. Ауксотрофні мутанти, що здатні накопичувати кінцеві продукти нерозгалужених ланцюгів біосинтезу, наприклад L-аргініну, неможливі. У даній ситуації доводиться одержувати мутанти з частково порушеною регуляцією біосинтезу, оскільки це дозволяє підвищити вихід цільового продукту. Такі організми є регуляторними мутантами.

Регуляторних мутантів відбирають за стійкістю до аналогів амінокислот або серед ревертантів ауксотрофів. Аналоги амінокислот виступають в ролі штучних інгібіторів ферментів, що працюють за принципом зворотного зв'язку, одночасно забезпечуючи біосинтез необхідних амінокислот і пригнічуючи процес їх введення в білки. Регуляторні мутанти отримують шляхом трансдукції, проводячи при цьому відбір спочатку окремих мутацій, що викликають повне розузгодження механізмів регуляції, а потім об'єднуючи дані ознаки шляхом котрансдукції. Внаслідок цього, в одному штамі можливо послідовно закріпити стійкість до декількох аналогів.

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

Виробничі біотехнологічні процеси отримання амінокислот реалізуються в умовах глибинної періодичної аеробної ферментації. Максимальна продукція амінокислоти настає, як правило, коли приріст біомаси практично припиняється. Тому поживне середовище на першому етапі ферментації повинно забезпечувати збалансований ріст клітин, а на другому – умови для надсинтезу цільової амінокислоти. Як джерело вуглецю і енергії використовують багаті цукровмісні субстрати, головним чином, мелясу. Можливе також залучення доступніших субстратів (ацетат, сульфідний луг, вуглеводні). Залежно від фізіологічних потреб мікроорганізмів як

джерело азоту використовують солі амонію, нітрати, а також амінокислоти і молекулярний азот. До складу середовища вносять необхідну кількість вуглецю і азоту, фосфатів та інших солей, а також стимулятори росту (вітаміни, дріжджовий екстракт), ПАР, антибіотики. Періодичний режим ферментації і багате за складом середовище потребують дотримання суворої стерильності під час отримання інокуляту і на стадії ферментації. Стерилізації піддаються поживне середовище, повітря і все технологічне обладнання. Після стадії ферментації в процесі обробки культуральної рідини клітини відокремлюють від розчину, який далі піддають очищенню від забарвлених домішок і зважених часток за допомогою сорбційних методів. Далі процес проводиться з використанням різних методів виділення і очищення залежно від сфери застосування кінцевого продукту. Для фармакології і харчової промисловості амінокислоти випускають у вигляді висушених чистих кристалічних препаратів; для кормових і технічних цілей – використовують стабілізовану і сконцентровану культуральну рідину.

**Технологія отримання глютамінової кислоти.** L-глютамінова кислота – перша амінокислота, отримана на основі промислового мікробіологічного синтезу. Вона є найважливішою амінокислотою рослинних і тваринних білків, не будучи незамінною. Можливість отримання глютамінової кислоти з вуглеводів на основі мікроорганізмів уперше було продемонстровано в 1957 р. японськими дослідниками М. Кіносита, С. Асаї та ін. Продукувати глютамінову кислоту здатні дріжджі, мікроскопічні гриби, бактерії. Бактерії забезпечують найбільший вихід по відношенню до використаного вуглецевого субстрату (не менше 40...50%). Промислове значення мають бактеріальні культури (*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*). Надсинтез кислоти у диких штамів можливий у спеціальних фізіологічних умовах за гальмування швидкості росту і збільшення проникності клітинної мембрани для глютамінової кислоти. Такі умови забезпечує певна концентрація біотину в середовищі (1...5 мкг/л), а також наявність деяких антибіотиків. Внутріклітинна концентрація глютамінової кислоти знижується внаслідок екскреції продукту в навколо клітинне середовище, тому регуляція синтезу кінцевим продуктом слабшає. Надпродукція глютамінової кислоти пов'язана також з високою концентрацією амонію в середовищі.

Глютамінова кислота в основному використовується у

фармакології і харчовій промисловості, тому завдання стадії постферментації – отримання високоочищених препаратів.

Глютамат натрію посилює смак багатьох харчових продуктів, сприяє тривалому збереженню смакових якостей консервованих продуктів (овочів, риби, м'ясних продуктів). За кордоном глютамат натрію додають у всі продукти не лише при консервуванні, а при заморожуванні та просто зберіганні. У Японії, США й інших країнах глютамат натрію є обов'язковою належністю столу аналогічно солі, перцю, гірчиці. Глютамінова кислота не лише підвищує смакову цінність їжі, а й стимулює травлення. Важливі властивості глютамінової кислоти – бути захисним фактором при отруєннях внутрішніх органів (печінки, нирок), послаблювати дію токсинів і підсилювати ряд фармакологічних препаратів. У даний час виробництво глютамінової кислоти є великотоннажним біотехнологічним виробництвом (близько 400000 т/рік). Обсяги її виробництва зростають з кожним роком. Провідними країнами – виробниками глютамінової кислоти і глютамату натрію є Японія і США.

**Технологія отримання лізину.** L-лізин в організмі вищих тварин і людини визначає біологічну цінність перетравного білка. Дана амінокислота виконує також багато інших найважливіших біохімічних функцій – сприяє секреції травних ферментів і транспортуванню кальцію в клітини, поліпшує загальний азотний баланс в організмі. Додавання лізину до складу комбікормів збільшує засвоюваність білка тваринами і знижує витрату кормів на виробництво тваринницької продукції.

Синтез L-лізину в мікроорганізмах здійснюється різними шляхами. Дріжджі, гриби і мікрободорості синтезують лізин з  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти. Вищі рослини і бактерії синтезують лізин за іншою схемою – через  $\alpha$ -діамінопімелінову кислоту. За цією розгалуженою схемою біосинтезу L-лізину синтез починається з аспарагінової кислоти. Окрім L-лізину, аспарагінова кислота є також попередником для L-метіоніну, L-треоніну і L-ізолейцину. Продукти обміну, що пригнічують різні ферменти і беруть участь у синтезі лізину, слід вивести з реакції. Саме тому для виробництва L-лізину використовують різні ауксотрофні мутанти. Отримано штами, що забезпечують 40% конверсію вуглецевого субстрату в амінокислоту і виходу лізину на цукрах до 40, оцтовій кислоті – до 70 г/л.

Мікробіологічний процес виробництва лізину аналогічний схемі

отримання глютамінової кислоти. Проте використання ауксотрофних мікроорганізмів потребує спеціального складу поживного середовища, яке підбирається індивідуально для кожного штаму. Кінцева концентрація кислоти досягає 40 г/л за залишкової концентрації цукрів близько 0,5...1,0 г/л. Ефективний процес отримання лізину реалізований на доступнішому субстраті – оцтовій кислоті. Кінцева концентрація лізину в середовищі досягає 40...50 г/л. Останніми роками отримано штами мутантів *B. flavum*, що забезпечують на ацетатному середовищі вихід лізину до 73 г/л.

Практично весь вироблюваний мікробіологічним способом L-лізин використовується в кормовиробництві для підвищення засвоюваності і поживності кормів. Тому випускається лізин, головним чином, у вигляді кормових препаратів – рідкого концентрату лізину (РКЛ) і кормового концентрату лізину (ККЛ).

ККЛ отримують на основі РКЛ, висушуючи рідкий концентрат у розпилювальних сушильних за температури не більше 90°C до залишкової вологості 4...8%. Препарат за складом близький до рідкого концентрату лізину і містить (у %): 7...10 лізину, 15...17 білка, до 14 інших амінокислот, 10...13 бетаїну і 20...25 зольних речовин. Препарат сипкий і негігроскопічний. Термін його зберігання збільшується до 1 року.

**Технологія отримання триптофану.** L-триптофан відноситься до незамінних амінокислот. Триптофан, поряд з іншими ароматичними амінокислотами, фенілаланіном і тирозином, останніми роками знаходить усе більше застосування. Відсутність або дефіцит триптофану в організмі призводить до ряду важких захворювань (діабет, туберкульоз, пелагра).

Мікробіологічний синтез L-триптофану здійснюють на основі штамів мутантів дріжджів (*Candida*) і бактерій (*E. coli*, *Bacillus subtilis*), дефіцитних за тирозином і фенілаланіном. Промисловий синтез L-триптофану здійснюється на основі цукрів. Для отримання очищеного кристалічного препарату працюють з культуральною рідиною. Для отримання кормового концентрату використовують і біомасу клітин.

### 7.1.3. Кормові вітамінні препарати

**Вітаміни** – це низькомолекулярні органічні речовини, здатні в дуже низьких концентраціях виявляти сильну і різноманітну дію.

Природним джерелом багатьох вітамінів є рослини і мікроорганізми. В даний час у виробництві багатьох вітамінів провідні позиції належать хімічному синтезу, проте при виробництві окремих вітамінів мікробний синтез має величезне значення, наприклад, при виробництві кормових препаратів вітамінів. Окремі вітаміни, кобаламіни, менахінони продукуються лише мікробними клітинами. Вітаміни беруть активну участь у багатьох процесах метаболізму людини і вищих тварин (процеси циклу трикарбонових кислот, розпад і синтез жирних кислот, синтез амінокислот й ін.), здійснюючи вплив на різноманітні фізіологічні процеси.

Мікробіологічним шляхом отримують деякі вітаміни групи В, а також ергостерин і каротин, що є, відповідно, попередниками вітамінів D<sub>2</sub> і провітаміну А.

**Отримання вітаміну B<sub>12</sub>.** Вітамін B<sub>12</sub> – ціанкобаламін – полімер складної будови, що є гематопоетичним і ростовим чинником для багатьох тварин і мікроорганізмів. Мікробіологічний синтез – єдиний спосіб отримання даного вітаміну.

Здатність до синтезу даного вітаміну поширена серед прокариотичних мікроорганізмів. Активно продукують вітамін B<sub>12</sub> *Propionibacterium*, а також *Pseudomonas* і змішані культури метанутворюючих бактерій.

Активними продуцентами B<sub>12</sub> є бактерії роду *Pseudomonas*. Розроблено ефективні технології на основі термофільних бацил *Bacillus circulans*, протягом 18 год. за температури 65...75°C в нестерильних умовах. Вихід вітаміну становить від 2,0 до 6,0 мг/л. Бактерії вирощують на збагаченому середовищі, що приготовлене на основі соєвого і рибного борошна, м'ясного і кукурудзяного екстракту. Продукція B<sub>12</sub> для медицини становить близько 12 т/рік; форма випуску – стерильний розчин CN-B<sub>12</sub> на основі 0,95 процентного розчину NaCl і пігулки вітаміну в суміші з фолієвою кислотою або іншими вітамінами. Для потреб тваринництва вітамін B<sub>12</sub> отримують на основі змішаної асоціації термофільних метаногенних бактерій, що взаємозв'язано розщеплюють органічний субстрат до CO<sub>2</sub> і CH<sub>4</sub>. Як субстрат використовують декантовану ацетонобутилову барду, що містить 2,0...2,5% сухих речовин. Бродіння проходить за температури 55...57°C в нестерильній культурі за дві фази: на першій утворюються жирні кислоти і метан, на другій – метан, вуглекислота і вітамін B<sub>12</sub>. Вміст B<sub>12</sub> в сухому препараті – до 100 мкг/г.

**Отримання вітаміну В<sub>2</sub>.** Вітамін В<sub>2</sub> (рибофлавін) дістав свою назву від цукру рибози, що входить до складу молекули вітаміну у вигляді багатоатомного спирту D-рибіту. Він поширений у природі і в значних кількостях синтезується рослинами, дріжджами, грибами, бактеріями. Тварини, що не синтезують цей вітамін, повинні отримувати його у складі комбікормів. За дефіциту рибофлавіну в організмі порушуються процеси білкового обміну, сповільнюється ріст. Препарати рибофлавіну використовують у медицині для лікування ряду захворювань, а в тваринництві – як добавку до кормів. Продуцентами вітаміну є бактерії (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дріжджі (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), мікроскопічні (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) і цвілеві гриби (*Aspergillus niger*).

Промислове отримання рибофлавіну здійснюється хімічним синтезом, мікробіологічним і комбінованим: при цьому синтезована мікроорганізмами рибоза хімічно трансформується у В<sub>2</sub>.

Для медичних цілей мікробіологічний рибофлавін отримують на основі гриба *Aspergillus*. Для високих виходів вітаміну (до 7 г/л) використовують удосконалені штами і оптимізоване середовище, що містить (у %): кукурудзяний екстракт – 2,25; пептон – 3,5; соєву олію – 4,5 і стимулятори (пептони, гліцин). Використовують активний інокулят, яким засівають стерильне середовище. Ферментацію здійснюють протягом 7 діб за температури 28°C і хорошої аерації (0,3 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>·хв.). Початковий рН становить близько 7,0, але під час ферментації у зв'язку з виділенням кислот середа підкислюється до рН 4,0...4,5. Після утилізації вуглецевого субстрату продуцент починає утилізувати кислоти; рН підвищується і після цього відбувається утворення вітаміну В<sub>2</sub>. При цьому кристали рибофлавіну накопичуються у гіфах і поза міцелієм. На постферментаційній стадії для виділення вітаміну міцелій нагрівають протягом 1 год. за температури 120°C.

У ряді країн для отримання кормових препаратів вітаміну В<sub>2</sub> використовують досить простий спосіб на основі мікроскопічного гриба *Eremothecium ashbyii*, який вирощують у глибинній культурі протягом 80...84 год. за температури 28...30°C на середовищі з глюкозою або мальтозою (2,5%), джерелом азоту у вигляді нітрату аміаку (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) і карбонідом кальцію (0,5%). Вихід рибофлавіну – є 1250 мкг/мл. Культуральна рідина концентрується вакуумним випаровуванням до вмісту сухих речовин 30...40% і висушується у

розпилювальній сушарці. Товарна форма продукту – порошок із вмістом рибофлавіну не менше 10 мг/г і 20% сирого протеїну; в препараті присутні нікотинова кислота та вітаміни В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub> і В<sub>12</sub>. Отриманий генно-інженерним методом штам *Bacillus subtilis* створює за 35 діб ферментації до 4 г/л рибофлавіну.

**Отримання ергостерину.** Ергостерин – початковий продукт виробництва вітаміну D<sub>2</sub> і кормових препаратів дріжджів, збагачених цим вітаміном. Вітамін D<sub>2</sub> (ергокальциферол) утворюється за опромінення ультрафіолетом ергостерину, який значну кількість синтезують бурі водорості, дріжджі, цвілеві гриби. Найбільш активні продуценти ергостерину – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*.

У промислових масштабах ергостерин отримують при культивуванні дріжджів і міцеліальних грибів на середовищі з надлишком цукрів за дефіциту азоту, високої температури і хорошої аерації. Інтенсивніше ергостерин утворюють дріжджі роду *Candida* на середовищі з вуглеводнями. За отримання кристалічного препарату вітаміну D<sub>2</sub> культивують цвілеві гриби (*Penicillium*, *Aspergillus*). Для отримання кормових препаратів опромінюють суспензію або сухі дріжджі (*Candida*). Опромінюють тонкий шар 5% суспензії дріжджів ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 280...300 нм. Кормові препарати дріжджів містять в 1 г АСР 5000 Е вітаміну D<sub>2</sub> і не менше 46% сирого білка. Для отримання кристалічного препарату вітаміну дріжджі або грибний міцелій піддають кислотному гідролізу за температури 110°C. Вітамін екстрагують спиртом, фільтрують, далі фільтрат упарюють, кілька разів промивають спиртом. Спиртовий екстракт згущують до 50% концентрації сухих речовин, омилують лугом. Отримані кристали вітаміну очищують перекристалізацією і сушать в ефірі, відганяючи останній. Кристалічний осад розчиняють в олії. Даний препарат використовують у медичних цілях. Ергостерин є також початковим продуктом для отримання ряду стероїдних гормонів, харчових і лікарських препаратів.

#### 7.1.4. Виробництво антибіотиків

**Антибіотики** (антибіотичні речовини) – це продукти обміну мікроорганізмів, вибірково пригнічують ріст і розвиток бактерій, мікроскопічних грибів, пухлинних клітин. Утворення антибіотиків – одна з форм прояву антагонізму. У наукову літературу термін уведений у 1942 р. З. Ваксманом, – антибіотик – проти життя. За

Н.С. Єгоровим: «Антибіотики – специфічні продукти життєдіяльності організмів, їх модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю по відношенню до певних груп мікроорганізмів (бактерій, грибів, водорості), вірусів або до злоякісних пухлин, затримуючи їхній ріст або повністю пригнічуючи розвиток».

Специфічність антибіотиків порівняно з іншими продуктами обміну (спиртами, органічними кислотами), що також пригнічують ріст окремих мікробних видів, полягає в надзвичайно високій біологічній активності.

Механізми пошкоджуючої дії антибіотиків на клітини різні. Окремі антибіотики (пеніциліни, новобіюцин, цефалоспорини) пригнічують процеси утворення клітинних стінок; інші (стрептоміцин, поліміксини) змінюють проникність мембран; треті (граміцидини) пригнічують окислювальне фосфорилювання; хлорамфенікол пригнічує окремі етапи синтезу білка на рибосомах; азасерін і сарколізин викликають порушення в процесах синтезу нуклеїнових кислот і так далі.

Існує декілька підходів до класифікації антибіотиків: за типом продуцента, будовою, характером дії. За хімічною будовою розрізняють антибіотики ациклічної і аlicиклічної будови; хінони; поліпептиди й ін.

За спектром біологічної дії антибіотики можна підрозділити на декілька груп:

- антибактеріальні – такі, що мають порівняно вузький спектр дії (пеніцилін, еритроміцин, грамідин, бацитрацин), пригнічують розвиток грампозитивних мікроорганізмів (стафілококи, стрептококи, пневмококи), і широкий спектр дії (стрептоміцин, тетрациклін, неоміцин, хлороміцетін), що пригнічують як грампозитивні, так і грамнегативні мікроорганізми (кишкову паличку, дифтерії, черевний тиф);
- протигрибкові, група полієнових антибіотиків (ністатин, гризеофульвін та ін.), що діють на мікроскопічні гриби;
- протипухлинні (актиноміцини, мітоміцин й ін.), такі, що діють на пухлинні клітини людини і тварин, а також на мікроорганізми.

У даний час описано понад 6000 антибіотиків, але на практиці застосовується близько 150, оскільки багато з них мають високу токсичність для людини, інші – інактивуються в організмі.

Антибіотики широко застосовуються в різних сферах людської



діяльності: медицині, харчовій і консервній промисловості, сільському господарстві. Відкриття антибіотиків викликало переворот у медицині. Широко відоме застосування антибіотиків з бактерицидною і бактеріостатичною дією; завдяки антибіотикам стали виліковними багато інфекційних захворювань (чума, туберкульоз, пневмонія, черевний тиф, холера й ін.). Протягом багатьох років антибіотики застосовують у сільському господарстві як стимулятори росту сільськогосподарських тварин, засоби боротьби з хворобами тварин і рослин. Антибіотичні речовини також широко застосовують для боротьби із сторонньою мікрофлорою у ряді бродильних виробництв і в консервній промисловості. Проте не можна не сказати про те, що тривале і неконтрольоване застосування антибіотиків призводить до виникнення і широкого розповсюдження в мікробних популяціях R-фактора стійкості до антибіотиків, що передається від однієї бактерійної клітини до іншої за допомогою плазмід у процесі кон'югації. Засобами боротьби з проявом лікарської прихильності до антибіотиків є обґрунтоване і суворо контрольоване їх застосування і отримання нових, модифікованих антибіотичних препаратів, що володіють біологічною активністю до резистентних форм.

Здатність синтезувати антибіотики поширена серед різних представників мікробного світу. Зв'язку між таксономічним станом мікроорганізмів і здатністю синтезувати той або інший антибіотик немає. Так, мікроорганізми, що належать до однієї групи, здатні синтезувати найрізноманітніші за хімічною будовою і дією антибіотики, та один і той самий антибіотик може продукуватися різними мікроорганізмами. Продуцентами антибіотиків є бактерії, актиноміцети, міцеліальні гриби.

Описано близько 600 антибіотиків, які синтезуються бактеріями. Ці антибіотики за хімічною будовою належать до поліпептидів і низькомолекулярних білків. Проте в промислових масштабах випускається незначна кількість антибіотиків бактеріального походження. Найважливішими з їх є: граміцидін (*Bacillus brevis*), поліміксини (*Bac. polymyxa*, *Bac. circulans*), бацитрацини (*Bacillus licheniformis*), низини (*Streptococcus lactis*).

Міцеліальні гриби також синтезують чималу кількість антибіотиків (близько 1200). Найбільш відомі серед них такі: пеніциліни (*Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *Aspergillus flavus*, *Asp. nidulans*), цефалоспоріни (*Cephalosporium acremonium*),

фумалгін (*Aspergillus fumigatus*), грізеофульвін (*Penicillium nigricans*, *P. griseofulvum*), трихоцетін (*Trichothecium roseum*).

Синтез антибіотиків мікробними клітинами – це специфічний процес обміну речовин, що виник і закріплений у процесі еволюції організму. Кожен мікробний вид здатний утворювати один або декілька певних антибіотичних речовин. Виділені з природних джерел, так звані дикі штами мають низьку антибіотичну активність. У промисловості застосовують як продуценти штами, що порівняно з вихідними штамами володіють підвищеною на 2...3 порядки антибіотичною активністю. Це досягається, як і в багатьох інших біотехнологічних процесах, двома способами:

- генетичними удосконаленнями організмів;
- оптимізацією умов ферментації.

Антибіотики – це вторинні продукти обміну мікроорганізмів (ідіоліти). Характерною особливістю розвитку продуцентів антибіотичних речовин є яскраво виражена двофазність: у першій фазі розвитку мікроорганізмів відбувається накопичення біомаси, в другій – синтез антибіотика. При цьому дуже важливо створити умови ферментації, адекватні цій двофазності з урахуванням дії антибіотика, що інгібує, як продукт обміну продуцент.

У процесах виробництва антибіотиків дуже велике значення має правильний вибір складу поживного середовища. Залежно від природи використаного мікроорганізму, як джерело вуглецю, можливе застосування різних субстратів. Наприклад, для отримання пеніциліну кращим джерелом вуглецю і енергії є глюкоза і лактоза; граміцидіну – гліцерин і солі янтарної кислоти; стрептоміцину і неоміцину – глюкоза. За розробки складу середовища для кожного окремого продуцента індивідуально підбирають не лише тип вуглецевого субстрату, а і його концентрацію. Як джерело азоту багато продуцентів антибіотиків використовують відновлені форми (амоній і амінокислоти), проте деякі віддають перевагу нітратам. Коли джерело азоту має бути присутнім у вигляді готових амінокислот, поліпептидів або білків, використовують пшеничне і кукурудзяне борошно, екстракти дріжджової біомаси. Велике значення має концентрація в середовищі фосфору, а також інших мінеральних елементів (сірки, марганцю, заліза, кобальту й ін.).

Окрім складу середовища, великий вплив на вихід антибіотиків здійснюють інші фізико-хімічні фактори середовища: рН, температура, забезпечення киснем, що підбираються і задаються

індивідуально для кожного продуцента.

Особливо високі вимоги висувають до антибіотиків медичного призначення. Тому виділення, очищення, концентрація, висушування, а також розфасовка і упаковка медичних антибіотиків здійснюються в асептичних умовах. Готовий продукт піддається ретельному біологічному і фармакологічному контролю. Біологічний контроль визначає ступінь стерильності препарату. В ході фармакологічного контролю проводять всебічні випробування препарату на токсичність, пірогенність, токсикогенність та ін.; встановлюють максимально переносиму дозу антибіотика; дози, що викликають повну і 50% загибель експериментальних тварин. Готова форма лікарського препарату антибіотичної речовини надходить до споживача з вказівкою біологічної активності й дати випуску.

Антибіотики немедичного призначення, що використовуються в сільському господарстві, отримують також в умовах суворої стерильної регламентованої культури, проте готовий продукт є висушеною біомасою продуцента або культуральним середовищем. У такому препараті, окрім антибіотика, містяться також інші біологічно активні речовини (вітаміни групи В, ферменти, вітаміни, амінокислоти).

Найбільш відомі серед уживаних як кормові антибіотичні препарати – біовит і біомицин, з ряду хлортетрацикліну, а також гризин, бацитрацин, гігроміцин й ін. Пригнічуючи розвиток хвороботворних мікроорганізмів, тим самим знижуючи захворюваність і смертність, антибіотики прискорюють ріст і розвиток тварин та птиці. Так, застосування антибіотиків в свинарстві забезпечує додатковий приріст від кожної тисячі тварин до 120 ц при скороченні витрати кормів на 5...10%. При додаванні антибіотиків у корм курей-несучок можна додатково отримати до 15 тис. яєць на рік від 1000 курей.

Пошук продуцентів нових антибіотиків триває. Величезні перспективи для отримання високопродуктивних штамів відкриваються у зв'язку з розвитком новітніх методів клітинної і генетичної інженерії. Окрім удосконалення природи мікроорганізмів-продуцентів антибіотичних речовин, оптимізації апаратури і технологій, велике значення для отримання нового спектру препаратів, що володіють цінними властивостями порівняно з початковими, має так звана модифікація антибіотиків і винайдення напівсинтетичних препаратів. Отримані мікробіологічним шляхом

антибіотики піддають хімічній модифікації, внаслідок якої можливе здобуття препаратів з більш вираженою фізіологічною дією.

### 7.1.5. Кормові ліпіди

Крім білків, вуглеводів і вітамінів невід'ємним компонентом кормів сільськогосподарських тварин є ліпіди, що містять поліненасичені жирні кислоти – лінолеву, ліноленову, арахідонову, які не можуть синтезуватися в організмі тварин і, отже, повинні надходити з їжею. Поліненасичені жирні кислоти, так звані незамінні, беруть участь у будові клітинних мембран, входячи до складу структурних ліпідів. За нестачі незамінних жирних кислот знижується інтенсивність росту сільськогосподарських тварин, опірність організму інфекції, пригнічується їх репродуктивна функція.

Основне джерело незамінних жирних кислот для сільськогосподарських тварин – різні рослинні продукти, що входять до складу кормів. Проте дуже часто в рослинних кормах міститься мало ліпідів або вони мають несприятливий склад жирних кислот, що погіршує поживну цінність кормів. Для балансування кормових раціонів сільськогосподарських тварин за вмістом незамінних жирних кислот здійснюється пошук нових джерел біологічно повноцінних ліпідів, які доречно було б використовувати як висококонцентровані кормові добавки. Досліди показують, що найбільш перспективними промисловими продуцентами ліпідів, близькими за складом до рослинних жирів і придатними для використання в кормових цілях, є дріжджі і мікроскопічні гриби, які найчастіше накопичують внутріклітинні ліпіди, проте відомі види, що здатні їх виділяти в культуральну рідину. У клітинах цих мікроорганізмів зазвичай міститься від 25% до 70% ліпідів з розрахунку на суху масу, які на 40...90% представлені триацилглицеринами і на 5...50% – фосфоглицеридами. У них також багато міститься стероїдних речовин (до 1,0...1,5% на суху масу), головним чином це – ергостерин, з якого в організмі тварин утворюється вітамін D<sub>2</sub>.

Ліпідні компоненти дріжджів і мікроскопічних грибів мають досить сприятливий склад жирних кислот, у них міститься багато олеїнової (20...50% від загальної кількості жирних кислот), лінолевої (до 50%) і ліноленової (до 17...19%) кислот і мало важкозасвоюваних

організмом тварин кислот (оксикислот, кислот з непарним числом вуглецевих атомів або розгалуженим ланцюгом). Багато ліпідів (50...60% від сухої маси) здатні накопичувати деякі штами дріжджів *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Клітини дріжджів роду *Candida* синтезують менше ліпідів (20...40%), проте відрізняються високою швидкістю росту і здатністю добре утилізувати різноманітні джерела сировини. Мікроскопічні гриби можуть синтезувати до 40...50% високоцінних ліпідів, схожих за складом жирних кислот із рослинними жирами.

Внаслідок того, що в клітинах мікроорганізмів утворюються активні комплекси гідролітичних ферментів, вони здатні утилізувати як джерела вуглецю різноманітні субстрати – гідролізати рослинних відходів, післяспиртову барду, молочну сироватку, мелясу, відходи зернопереробної промисловості, вуглеводні нафти, низькомолекулярні спирти (метанол, етанол). Як джерело азоту в поживне середовище додають дріжджовий або кукурудзяний екстракт, солі амонію, сечовину, та при цьому суворо контролюють співвідношення вуглецю і азоту, оскільки при надлишку азоту знижується утворення ліпідів у клітинах мікроорганізмів (оптимальне співвідношення C:N = 320...400).

Крім джерел вуглецю і азоту в поживне середовище також додають P, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, вітаміни групи B, токоферол. У процесі вирощування на поживному середовищі спочатку спостерігається інтенсивний ріст мікроорганізмів і відносно незначне накопичення ліпідів. Посилений синтез ліпідів спостерігається на початку стаціонарної фази розвитку мікроорганізмів.

За вирощування продуцентів кормових ліпідів підтримується температура 20...30°C, оскільки за вищої температури знижується вихід ліпідів, а в ліпідах зменшується частка поліненасичених жирних кислот. У процесі ферментації необхідно підтримувати режим інтенсивної аерації, оскільки для окислення вуглецевих субстратів необхідним є кисень. Він також потрібен для синтезу ненасичених жирних кислот, тому поліпшення аерації стимулює збільшення виходу незамінних жирних кислот.

Після закінчення ферментації мікробна маса відокремлюється від залишків субстрату і висушується майже за такою ж технологією як і кормові дріжджі. Для покращання фізичних властивостей до висушеного продукту додають висівки або кукурудзяне борошно.

Поряд з отриманням кормових ліпідів на основі ферментації

мікроорганізмів розробляються також технології виробництва комплексних мікробних препаратів, що містять білки, ліпіди, каротиноїди й інші цінні поживні речовини, які дозволяють балансувати корми одночасно за декількома компонентами. Так, наприклад, отримано значний ефект при введенні в кормовий раціон птиці білково-ліпідної біомаси дріжджів *Lipomyces lipoterus*, що містить 18...20% білків і 27...29% ліпідів, а також біомаси гриба *Blakeslea trispora* з вмістом білків 30% і ліпідів 28%. Слід зазначити, що ліпіди мікроорганізмів можуть бути використані не лише в кормовиробництві, а і як замітники рослинних харчових жирів для технічних потреб (лакофарбна, хімічна промисловість). Так приблизно 20% від вироблюваних у світі рослинних жирів витрачається на технічні, нехарчові цілі.

### 7.1.6. Ферментні кормові препарати

Одним із важливих напрямів сучасної біотехнології є отримання на основі культивування мікроорганізмів та використання в сільському господарстві різних ферментних препаратів, що можуть застосовуватися в процесі приготування кормів для сільськогосподарських тварин як добавки з метою покращання їх засвоюваності, а також у ветеринарії для профілактики і лікування шлункових та паразитарних захворювань.

Основний компонент кормів сільськогосподарських тварин – рослинна продукція (зерно, силос, грубі корми й ін.), що містить досить багато важкоперетравних речовин – клітковина, лігнін, геміцелюлоза. Навіть у жуйних тварин, що містять в передшлунку (рубці) активні штами целюлозоруйнуючих мікроорганізмів, клітковина перетравлюється на 40...65%. Не повністю перетравлюються також рослинні білки (60...80%), ліпіди (60...70%), крохмаль і поліфруктозиди (70...85%), пектинові речовини.

Для кращої перетравності та підвищення ефективності використання рослинних кормів у раціони сільськогосподарських тварин вводять ферментні препарати (0,1...1,5% від сухої маси корму), отримані з мікроорганізмів, що містять активні комплекси гідролітичних ферментів. Препарати мікробних ферментів зазвичай отримують з культур бактерій або мікроскопічних грибів. Деякі види бактерій (наприклад, *Bac. subtilis*) виділяють гідролітичні ферменти в культуральне середовище, тому їх ферментні препарати зазвичай

виробляють шляхом концентрування і висушування за певних умов (ліофілізацією) культуральної рідини. Якщо джерелом ферментів є мікроскопічні гриби (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*), то ферментний препарат готують шляхом висушування поверхневої культури цих мікроорганізмів. Очищені ферментні препарати отримують екстракцією ферментів з клітин мікроорганізмів відповідним розчинником і осадженням етанолом.

Кожен ферментний препарат позначається певним літерним і цифровим індексом. Літера «Г» в назві препарату вказує на те, що його отримано з культуральної рідини за глибинного способу вирощування мікроорганізмів, у той час як літера «П» свідчить про те, що ферментний препарат отримано з поверхневої культури мікроскопічних грибів. Індекс 2 в назві препарату показує, що це концентрований сироп, 3 – сухий ферментний препарат, 10 – очищений ферментний препарат. Індекс Пх означає, що ферментний препарат є висушеною поверхневою культурою грибів.

У раціоні великої рогатої худоби питому вагу займають соковиті та грубі корми, багаті клітковиною, пентозанами, пектиновими речовинами, що повільно перетравлюються мікроорганізмами рубця, знижуючи засвоюваність організмом інших поживних речовин. Значне покращання перетравлення цих речовин спостерігається при додаванні в корм ферментних препаратів з активним комплексом гідролітичних ферментів, таких, як пектофостидин Гзх і целовіридин Гзх (у співвідношенні 1:1), амилосубтилін Гзх і глюкаваморин Пх. При цьому не тільки підвищується загальна продуктивність тварин, а й суттєво знижуються витрати кормів на створення однієї одиниці тваринницької продукції (на 8...10%).

За відгодівлі свиней позитивну дію виявляють ферментні препарати з амилолітичною і протеолітичною активністю – амилосубтилін Гзх, протосубтилін Гзх, амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, протезим Гзх.

Особливо важливе значення має застосування ферментних препаратів при годівлі молодняку сільськогосподарських тварин. Так, наприклад, у телят формування рубця відбувається до 2...3-місячного віку, внаслідок чого спостерігається слабе перетравлення грубих і соковитих кормів. Тому для заміни молока рослинними кормами і кращого їх використання в раціони телят доцільно вводити ферментні препарати – пектофостидин Гзх, амилосубтилін Гзх, протосубтилін Гзх і глюкаваморин Пх, що містять комплекс амилолітичних і

протеолітичних ферментів.

У поросят-сисунів ферментні системи шлунково-кишкового тракту починають нормально функціонувати лише в 3...4-місячному віці і для покращання перетравлення поживних речовин корму їм рекомендується додавати в корм ферментний препарат протезим Гзх. У годівлі ягнят з метою покращання перетравлення білків і вуглеводів в їх кормові раціони вводять глюкаваморин Пх і амілоризин Пх, внаслідок чого прирости збільшуються на 11...15%.

Травні залози птиці не утворюють ферменти, що каталізують гідроліз клітковини і пектинових речовин, а мікрофлора кишечника у них нечисленна, тому в їх кормові раціони додають ферментні препарати з целюлолітичною, пектолітичною і протеолітичною активністю – пектофоєтидин Гзх, целовіридин Гзх, амілосубтидин Гзх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, протосубтилін Гзх, глюкозидаза Гзх, лізоцим Гзх, протезим Гзх. Внаслідок застосування вказаних препаратів яйценосність курей збільшується на 5%, прирости бройлерів збільшуються на 7...15%, але витрати корму на створення одиниці продукції зменшується на 4...7%.

Застосування ферментних препаратів також ефективно в годівлі риби. При додаванні в кормові раціони риби протосубтиліну Гзх, амілосубтиліну Гзх, пектаваморину Пх в кількості 0,1...0,15% значно поліпшується перетравлюваність білків й інших поживних речовин корму.

Ферментні препарати використовуються також у кормовиробництві найчастіше при силосуванні бобових трав, соломи, картоплі і приготуванні соломоконцентратів. Зелена маса бобових трав містить велику кількість буферних речовин (білки, амінокислоти, лужні солі), що запобігають пониженню рН в процесі молочнокислого бродіння, крім того, в ній недостатньо цукрів, що є субстратами молочнокислих бактерій. Якщо шляхом додавання ферментів забезпечити частковий гідроліз полісахаридів – клітковини, крохмалю, пектинових речовин, геміцелюлоз, то утворюється більше цукрів для життєдіяльності молочнокислих бактерій. У результаті в силосній масі збільшується концентрація молочної кислоти, що забезпечує зниження втрат поживних речовин і покращання поживних властивостей отриманого корму. Добру ефективність при силосуванні бобових трав показали такі ферментні препарати: целовіридин Гзх, пектофоєтидин Гзх, пектаваморин Пх, глюкаваморин Пх, целокандин Гзх, целолигнорин Пх. За силосування



картоплі рекомендується застосовувати амілоризин Пх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, при цьому кормова цінність отриманої силосної маси підвищується на 15...18%.

Особливо важливе значення при отриманні повноцінних кормів має використання соломи злакових культур, вихід якої в цілому по країні до 200 млн. т/рік. Солома характеризується високим вмістом важкозасвоюваних речовин – целюлози, ксиланів, лігніну – і низьким вмістом білків. У ній майже немає розчинних вуглеводів, необхідних для розвитку молочнокислих бактерій. Тому за силосування соломи застосовують целюлозоруйнуючі ферментні препарати – целовиридин Гзх, целолігнорин Пх, целокандин Гзх, пектаваморин Пх. Внаслідок дії цих препаратів у силосуємій масі підвищується концентрація розчинних цукрів, за рахунок синтезу мікроорганізмами збільшується вміст сирого протеїну (на 50%).

Для отримання соломоконцентратів зазвичай застосовують суміш двох ферментних препаратів пектофостидіна Гзх і глюкаваморина Пх, що забезпечують гідроліз полісахаридів. У подальшому на продуктах гідролізу здійснюють вирощування кормових дріжджів. Для кращого росту дріжджів у соломоконцентрат також додають мелясу, сечовину, кальціймонофосфат, хлорид натрію, необхідну кількість води. Отримуваний у такий спосіб корм має консистенцію силосу, а за поживною цінністю наближається до хорошого лугового сіна.

Соломоконцентрати отримують і в гранульованому вигляді, в цьому разі вони теж зберігають свої поживні властивості тривалий час – до 1 року. Перетравлюваність клітковини в такому кормі підвищується до 75...80%, вміст білків досягає 10...12% від сухої маси.

Ферментні препарати застосовують у процесі отримання заміників цільного молока для молодняка великої рогатої худоби з кормових дріжджів, що піддаються гідролізу. В результаті гідролізу руйнується клітинна оболонка дріжджових клітин і мікробна біомаса переходить у легкозасвоювану форму, підвищується вміст розчинних вуглеводів, незамінних амінокислот і поліненасичених жирних кислот. Для гідролізу кормових дріжджів зазвичай використовують препарати – пектофостидин Гзх, дріжджелітин Гзх, лізосубтидин Г10х.

Мікробні ферментні препарати знаходять також широке застосування у ветеринарії для лікування і діагностики багатьох

захворювань сільськогосподарських тварин і птиці. Так, наприклад, ферменти, здатні руйнувати клітинну оболонку і ті, що володіють лізуючою дією, використовуються в лікуванні бактеріальних й інших захворювань (сальмонельоз і популороз у птиць, ендометрити у корів та ін.). Для цих цілей використовують ферментні препарати, що випускаються промисловістю – лізоцим Гзх, глікозідаза Гзх, лізосубтилін Г10х, мальтаваморин Г10х, дріжджелітин Гзх.

Такі препарати, як амілосубтилін Гзх і протосубтилін Гзх впливають на редуційну здатність бактерій в шлунково-кишковому тракті тварин, кількість і рухливість інфузорій, перетравлення целюлози й інших важкозасвоєваних вуглеводів. Вони використовуються для профілактики і лікування шлункових захворювань, зокрема аліментних атоній передшлунків у жуйних тварин.

Ферменти, що містяться в цих препаратах, викликають також гідроліз оболонок яєць гельмінтів.

Поряд з виробництвом ферментних препаратів, вилучених з мікробних клітин, розроблено технології отримання біопрепаратів на основі живих мікроорганізмів – симбіонтів шлунково-кишкового тракту тварин, які в процесі своєї життєдіяльності синтезують різні ферменти, вітаміни, незамінні амінокислоти, антибіотики, речовини, які володіють гормональною дією, і таким чином активно беруть участь у процесах травлення і синтезу речовин, що не утворюються в клітинах тварин, та захисті від мікробної інфекції.

Ефективні мікробні препарати, що широко використовуються в тваринництві, виробляють на основі пропіоновокислих (пропіовіт) і ацидофільних (пропіацид) бактерій, а також азотобактерій (азотацид).

Пропіовіт – це порошок сірувато-піщаного кольору, що містить в 1 г препарату 4...6 млрд. бактерій і 80...100 мкг вітаміну В<sub>12</sub>. Застосовується для профілактики і лікування хвороб шлунково-кишкового тракту у телят, поросят, курчат. За його вживання нормалізується ріст і розвиток молодняку сільськогосподарських тварин, підвищується їхнього стійкість до інфекційних захворювань.

Пропіацид і азотацид – сухі препарати комбінованої дії, сприяють утворенню в шлунково-кишковому тракті тварин зрівноважених біоценозів, особливо вони ефективні проти дисбактеріозів.

Для боротьби з бактеріальними і вірусними шлунково-кишковими захворюваннями застосовуються бактеріальні препарати

на основі *Bac. subtilis*, *licheniformis*, *mucilaginosus*, які, ймовірно, діють як джерела біологічно-активних речовин – ферментів, вітамінів, антибіотиків, гормонів.

## 7.2. Біотехнологічні методи консервування кормів

Головне питання збереженості кормів – це здійснення процесу консервування з метою підвищення поживної цінності і засвоєння кормів.

Одним із найважливіших способів консервування кормів є силосування. При цьому рослинна маса зберігається у вологому стані в спеціальних ємностях. Корм, більш менш спресований, за ускладненого доступу повітря підлягає бродінню. Він набуває кислого присмаку, стає м'якшим, змінює колір, набуває бурого відтінку і зберігає соковитість. Контроль за процесами ферментації – основна умова зменшення витрат поживних речовин під час консервування.

При силосуванні накопичуються кислоти, що створюються в результаті бродіння вуглеводів рослин під дією мікробів. Цей процес можна поділити на декілька фаз. Перша – фаза розвитку змішаної мікрофлори – характеризується бурхливим розвитком різноманітних груп мікробів, що внесені з кормами у силосну ємність. Звичайно ця фаза короткочасна, і з її закінченням середовище підкислюється, створюються анаеробні умови, пригнічується діяльність більшої частини мікроорганізмів, у тому числі гнилісних. Під час другої фази – фази головного бродіння – основну роль відіграють молочнокислі бактерії, що продукують з вуглеводів молочну і оцтову кислоти. Третя фаза – кінцева – характеризується поступовим відмиранням збудників молочнокислого бродіння, молочна кислота, що накопичується в силосі, починає пригнічувати самі молочнокислі бактерії. Таким чином, силосування завершується.

У силосі можуть також розвиватися і кислотостійкі дріжджі, які суттєво не знижують якість корму. Однак, масове розмноження дріжджів у силосі небажане, оскільки вони забирають цукор і не створюють кислих продуктів.

Важливою завданням біотехнології в галузі кормовиробництва є регулювання мікробіологічних процесів, що здійснюються за приготування кормів. Найбільш ефективний спосіб підвищення

якості силосування – використання спеціальних заквасок з чистих культур молочнокислих бактерій. Внесена закваска інтенсифікує процес силосування, пригнічує розвиток гнилісної мікрофлори, підвищує якість силосу, сприяє зберіганню в ньому поживних речовин. На жаль, ця міра виявляється малоефективною в тому разі, коли рослинна культура містить недостатню кількість водорозчинних вуглеводів для підтримки росту бактерій і створення молочної кислоти.

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

Відомо, що збільшений вміст крохмалю у рослинній сировині, з якої готують силос, пригнічує процеси синтезу білка. Для подолання цієї проблеми було створено бактерію, яка здатна здійснювати ефективну ферментацію рослинного матеріалу. Для цього в хромосому бактерії *Lactobacillus plantarum* (бактерія молочнокислого бродіння) за допомогою кон'югативної плазмиди *E.coli* було вбудовано ген  $\alpha$ -амілази. Цей ген кодує фермент, який активується під час потрапляння бактерії у кишечник тварини, і таким чином, сприяє засвоєнню силосу з сільськогосподарських культур, що містять багато крохмалю, таких як люцерна.

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

Дослідники французького Бюро з вивчення науки і техніки заморських країн (*OSTROM*) і Національного дослідницького

інституту прикладної хімії (*IRCHA*) розробили метод збагачення білком харчових продуктів, що містять крохмаль, і використовуються як корм для тварин. У зварений харчовий продукт, що містить крохмаль (маніок), який фрагментований і має до 50% води та мінеральних солей, необхідних для росту штаму *Aspergillus niger*, додають гомогенний засів цього мікроорганізму. Гранулярна і пориста структура крохмалистого матеріалу забезпечує добру дифузію кисню в субстраті, що поступово заростає цвіллю.

Крохмаль руйнується і асимілюється, а субстрат залишається твердим, пористим, і в нього добре проникає повітря. Найкращі результати досягаються за вмісту в маніоковому борошні 55% води і температури ферментації 35...40°C. За подальшого розвитку гриба відбувається швидке окислення, що уповільнюється додаванням суміші солі амонію і сечовини, яка є також джерелом азоту. Оптимальна щільність засіву  $2 \times 10^7$  спор на 1 г борошна. Приблизно 20% вуглеводів перетворюються на білки. У 40-літровому експериментальному ферментері засвоюється 8 кг сухого субстрату. Після 30 год. ферментації, що здійснюється штамом *Aspergillus niger* за температури 38°C, вміст білка в крохмалевмісних відходах картоплі зростає з 5 до 18%, а вміст вуглеводів падає з 65 до 28%.

Простота і такі переваги даної технології, як відсутність необхідності стерилізувати субстрат, повнота виходу кінцевого продукту, низька витрата енергії і дуже невеликі капіталовкладення, дозволяють створювати дрібномасштабні установки, пристосовані до умов села або дрібних господарств.

Технологія може мати особливий інтерес у екваторіальних країн – виробників маніоки й інших крохмалевмісних бульбових рослин, поживна цінність яких внаслідок застосування такої технології може значно зрости.

На експериментальній установці для ферментації ємністю 1200 дм<sup>3</sup> було проведено дослідження з метою вивчення надійності процесу, вдосконалення режимів бродіння і аналізу поживної цінності кінцевих продуктів за згодовування свиням і свійській птиці.

У Гелфському університеті (провінція Онтаріо, Канада) було розроблено схожий процес переробки маніокового борошна штамом *Aspergillus niger* для 3000-літрового ферментера. Бродіння відбувалося за температури 40°C у дуже кислих умовах. Ця дослідна установка перевірялася в Міжнародному центрі тропічного сільського господарства (*CIAT*) в Колумбії на предмет отримання

збагачених білками харчових продуктів для годівлі великої рогатої худоби. Дослідницька програма була розпочата у 1972 р. Міжнародним дослідницьким центром з розвитку (*IDRC*) в Канаді спільно з *CIAT* і Гелфським університетом. Спочатку мікробіологи використовували штами *Aspergillus fumigatus* і мутанти цього виду цвілі, проте виявилось, що цей мікроорганізм викликає алергічні реакції у працівників, які зайняті у виробничому процесі. Потім почали використовувати *Rhizopus chinensis* і, нарешті, *Cephalosporium eichorniae*.

Кінцевий продукт, отриманий з маніюки під дією цього штаму, містив 49% білка і охоче поїдався експериментальними тваринами. Розроблений процес простий, не дорогий, надійний і добре пристосований до сільської місцевості. Проводилися також дослідження з генетичної модифікації гриба, щоб домогтися деградації целюлозного матеріалу для отримання білків, зокрема з відходів і залишків бананів.

### **7.3. Біотехнологічна інтенсифікація процесів травлення в рубці жуйних**

Важливим завданням учених та фахівців, що працюють у галузі сільськогосподарської біотехнології, є створення і впровадження в природні екосистеми шлунково-кишкового тракту тварин високоактивних штамів мікроорганізмів, що сприяють кращому засвоєнню рослинних білків, ліпідів, целюлози та інших вуглеводів, а також є джерелом незамінних амінокислот і вітамінів. Особливо важливе значення мають дослідження з вивчення мікробних популяцій рубця (передшлунка) жуйних тварин, в якому перетравлюється 70...85% всієї сухої речовини корму, що проходить через шлунково-кишковий тракт цих тварин.

Рубець є високоефективною природною системою безперервного культивування анаеробних мікроорганізмів – бактерій (*Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium* й ін.) і найпростіших (*Diplodinium*, *Entodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* й ін.).

Слизова оболонка рубця не утворює власних ферментів і процес перетравлення їжі цілком відбувається за допомогою ферментних

білків, що вироблюються мікроорганізмами. Внаслідок життєдіяльності мікрофлори в передшлунках жуйних тварин гідролізуються практично всі форми складних вуглеводів (крохмаль, пектинові речовини, геміцелюлози, клітковина, дисахариди), білки і ліпіди, моносахариди (глюкоза, фруктоза, маноза) підлягають бродінню, моносахариди, амінокислоти і жирні кислоти, що утворюються внаслідок гідролізу складних речовин, використовуються тваринами в біосинтетичних процесах і як джерела енергії. Самі мікроорганізми після їх відмирання також перетравлюються в рубці і стають для тварин важливим джерелом повноцінних білків, незамінних амінокислот, поліненасичених жирних кислот, вітамінів.

Ефективність використання тваринами кормів значною мірою залежить від діяльності мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Особливо важливу роль в перетравленні кормів великою рогатою худобою і вівцями відіграють мікробні популяції рубця. Для поліпшення мікробної екосистеми рубця можливо використовувати методи генної інженерії з метою підвищення коефіцієнта засвоєння корму, пригнічення небажаного метаболізму і патогенної мікрофлори, синтезу корисних речовин та ін. Методи синтезу ДНК і клонування генів дозволяють змінювати екосистему рубця і процеси ферментації в певному напрямі через генетичні модифікації. Вважають можливою може бути регуляція процесів деградації складних поживних речовин кормів, складу продуктів бродіння і, навіть, видового складу мікрофлори. Так, перетравлення целюлози – основного компоненту рослинних кормів – відбувається в рубці лише на 40...65%. Підвищити цей показник можна шляхом інтродукції бактерій, що володіють високою целюлозолітичною активністю. Такі бактерії можуть бути створені на базі генетичної модифікації типового представника мікрофлори рубця.

Розроблений новий підхід, за допомогою якого можна буде забезпечити велику рогату худобу білком, збагаченим незамінними амінокислотами. Звичайне додавання білків у корми – дорогий і не досить ефективний спосіб, оскільки білки й амінокислоти руйнуються бактеріями рубця ще до того, як тварина встигає їх використати. Крім того, основну кількість білка вони отримують не з кормами, його забезпечують мікроорганізми рубця. Раціон тварин можна збагатити, якщо спрямовано модифікувати ці бактерії. Для цього спочатку був синтезований білок з високим вмістом залишків

метіоніну, лізину і лейцину. Він складався з 100 амінокислот, 57 з яких були незамінними, і мав стабільну  $\alpha$ -спіральну конфігурацію. Потім, за допомогою 14 нуклеотидів, що частково перекриваються, синтезували його ген і зшили його з геном білка, який зв'язує мальтозу. Отриманий гібридний ген експресували у *E. coli* під контролем промотору транскрипції. На долю гібридного білка припадає до 12% сумарного внутріклітинного білка. В наш час ведуться дослідження щодо того, наскільки бактерії, які існують у рубці, здатні синтезувати цей білок.

Забезпечити жуйних достатньою кількістю білка і амінокислот можливо двома способами. По-перше, запобігти розпаду білків і амінокислот у рубці шляхом модифікації властивостей мікроорганізмів, що відповідають за розпад. По-друге, захистити кормові білки і амінокислоти від атак мікроорганізмів. У першому випадку необхідно блокувати або інгібувати системи мікробних ферментів, що руйнують амінокислоти. Труднощі цього підходу полягають у тому, що в рубці є сотні різних мікроорганізмів і найпростіших, кожен з яких має значну кількість ферментів.

Що стосується захисту білків і амінокислот від руйнування у рубці, то це можливо зробити механічним і хімічним шляхами. Механічний спосіб захисту амінокислот полягає в тому, що часточки амінокислот певного розміру можуть бути покриті конкретними матеріалами або залиті в них. Такі часточки здатні проходити через рубець у незмінному вигляді. У сичугу або в тонкому кишечнику, навпаки, амінокислота повинна звільнитися. Це перша вимога до матеріалу покриття. Часто використовується залежність розчинності або набрякання матеріалів від рН середовища. Другою вимогою до матеріалів покриття є їх нетоксичність і здатність забезпечувати тонкий покривний шар. До таких матеріалів в основному належать жирні кислоти з довгим ланцюгом, такі як стеаринова і пальмітинова, а також гідратовані жири.

Хімічний захист амінокислот на відміну від фізичних методів полягає в модифікації молекул. Вимоги залишаються такими самими: речовина, що захищена, повинно бути стійкою у рубці, але потім звільнювати амінокислоту в сичугу або тонкому кишечнику. Одним з таких продуктів є N-гідроксиметилметіонінкальцій. У цієї сполуки аміногрупа метіоніну захищена гідроксиметильною групою, на яку впливає рН середовища. Карбоксильна група стабілізована створенням солі кальцію. Захисна група забезпечує достатню



стабільність по відношенню до дії мікроорганізмів рубця, але миттєво відщеплюється з утворенням вільної амінокислоти у кислому середовищі сичуга. За використання названого препарату поліпшується молочна продуктивність корів в основному за рахунок збільшення величини надою, в середньому на 7,5% за добу.

Зростання цін на сільськогосподарську продукцію, відставання її виробництва від потреб людини в продуктах харчування, а також зростаючі вимоги до охорони навколишнього середовища потребують більш ефективної утилізації відходів у сфері виробництва кормів для тварин і харчових продуктів для людини.

### ***Контрольні запитання***

1. Які переваги мають мікроорганізми як джерела кормового білка порівняно з рослинними і тваринними організмами?
2. Які переваги має біотехнологічний підхід виробництва білка над традиційним?
3. Які види сировини використовуються як субстрати для отримання мікробіологічного білка?
4. Чому технологія отримання білка одноклітинних на вуглеводнях не отримала поширеного розвитку?
5. З чим пов'язана загроза неконтрольованого використання антибіотиків?
6. З якою метою використовують антибіотики у тваринництві?
7. Для чого в раціони сільськогосподарських тварин вводять ферментні препарати?
8. Які ферментні препарати рекомендуються для застосування в раціонах молодняку сільськогосподарських тварин і з якою метою?
9. Які проблеми травлення жуйних можливо вирішити завдяки покращанню мікробної екосистеми рубця?
10. Яким чином за допомогою генної інженерії можна буде забезпечити велику рогату худобу білком, збагаченим незамінними амінокислотами?

## РОЗДІЛ 8

### ІНЖЕНЕРНА ЕНЗИМОЛОГІЯ

Наприкінці 60-х – початку 70-х рр. на базі технічної біохімії, хімічної технології, хімічної ензимології і ряду інженерних дисциплін виник новий науково-технічний напрям біотехнології – інженерна ензимологія, до якої відносять систему методів отримання, очищення, стабілізації і застосування ферментів. Основним завданням інженерної ензимології є конструювання біоорганічних каталізаторів із заданими властивостями на основі ферментів або ферментних комплексів та розробка на їх базі різних ефективних і екологічно чистих біотехнологічних процесів. Висока субстратна специфічність ферментативного каталізу та унікальна здатність прискорювати реакції в десятки і сотні разів в умовах нормального тиску і фізіологічних температур дозволяють одержувати високі виходи продуктів та створювати практично безвідходні біотехнологічні процеси, що не забруднюють навколишнє середовище.

Ефективні біотехнологічні процеси на основі ферментативного каталізу використовуються все ширше в різних сферах людської діяльності: харчовій промисловості, енергетиці, медицині, біоелектрокаталізі і мікроелектроніці.

#### 8.1. Отримання і застосування ферментів

*Ферменти* – це специфічні каталізатори білкової природи, що виробляються клітинами і тканинами організмів. Вони здатні у багато разів прискорювати перебіг хімічних і біохімічних реакцій, не входячи до складу кінцевих продуктів. Практичні застосування ферментів засновані на їх високій каталітичній активності і вищою порівняно з небіологічними каталітичними системами субстратною специфічністю.

Джерелом ферментів є рослинні і тваринні тканини, мікроорганізми. Хімічний синтез ферментів у промислових масштабах дуже складний, дорогий і економічно недоцільний.

Мікробіологічний метод отримання ферментів – найбільш перспективний. Наведемо його переваги:

- 1) багатство асортименту ферментів, що синтезуються мікроорганізмами;
- 2) можливість управління ферментативними системами і складом вироблюваних препаратів;
- 3) висока швидкість розмноження мікроорганізмів і можливість використання різних, у тому числі доступних і недорогих субстратів.

Ферменти в мікробних клітинах можуть мати як внутріклітинну локалізацію, так і виділятися в навколишнє середовище. Останні доступніші для препаративного отримання, тому в промислових масштабах виготовляють головним чином позаклітинні ферменти. Із описаних до теперішнього часу понад 2000 ферментів практичне значення мають близько 50.

За сучасною класифікацією всі ферменти підрозділяються на 6 класів: оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомеразі і лінази (синтетази). Негідролітичні ферменти – оксидоредуктази, ліази, ізомеразі і лінази застосовуються порівняно рідко. Найбільш широке застосування дістали мікробні гідролази, що взаємодіють з пептидами, глікозидами й іншими сполуками за участю води. Серед гідролаз – глікозидази, протеїнази, ліпази. Глікозидази каталізують гідроліз глікозидних сполук. Так, крохмаль гідролізують амілази, продуцентами яких є різні мікроорганізми (*Bacillus*, *Aspergillus*); декстраназа, що взаємодіє з глікозидними зв'язками декстрана, синтезується *Penicillium purpurogenium*; пулоназа, гідролізуюча глікоген, декстрин, продукується бактеріями *Klebsiella*; інвертаза синтезується багатьма представниками роду *Aspergillus*; целюлолітичні ферменти, що є складним комплексом активних білків, впливають на різні ділянки молекули целюлози. Фітопатогенні гриби *Fusarium oxysporum*, *Erwinia* утворюють пектинолітичні ферменти; анаеробні бактерії *Clostridium felsineum* продукують полігалактуроназу, пектинестеразу. Дуже різноманітні протеїнази, що каталізують розрив пептидних зв'язків білків з утворенням пептидів і вільних амінокислот. Протеїнази різних мікроорганізмів суттєво розрізняються своїми властивостями; серед продуцентів протеїназ – *Aspergillus*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *E.coli*. Продуцентами ліпаз, що здійснюють гідроліз триацилгліцеролів з утворенням жирних кислот і гліцерину, є різні мікроорганізми (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*,

*Geotrichum, Candida*). Фосфокінази, що синтезуються бактеріями *Clostridium, Bacillus*, розщеплюють складні зв'язки між жирними кислотами, гліцерином і фосфатидною кислотою.

Історія застосування ферментів сягає корінням в далеке минуле. Деякі ферменти, що містяться в природних рослинних матеріалах, здавна використовувалися людиною для отримання пива, спиртних напоїв, виробництва хліба і кисломолочних продуктів. Практика, заснована на колективному досвіді людей, набагато випередила розробку наукових основ для створення даних технологічних процесів. Промислова галузь отримання ферментних препаратів з природної рослинної сировини почала зароджуватися лише наприкінці ХІХ ст., а ера сучасної інженерної ензимології налічує близько 40 років. Проте, ферменти настільки увійшли в наше життя і широко застосовуються в різних промислових галузях, що уявити без них наше існування сьогодні ми не можемо. Промислове отримання і застосування ферментів в різних технологічних процесах складає нині один з найважливіших розділів новітньої біотехнології.

Величезне значення ферменти мають у різних галузях харчової промисловості. У хлібопеченні амілази прискорюють процес дозрівання і покращують якість тіста; їх використовують також для отримання розчинного крохмалю, патоки, декстрину. Грибні амілази замінюють солод, лактазу використовують для видалення молочного цукру із молока; інвертази цукрів, що запобігають кристалізації сахарози, застосовують у кондитерській промисловості. Комплекс ферментів – цитаз, використовують для повнішої екстракції соків з плодів і овочів, а також отримання ефірних масел. Грибні глюкозидази, звільняють продукти від залишкових цукрів, подовжують терміни їх зберігання. За допомогою каталази з продуктів видаляють перекиси водню, целюлази застосовують для оцукрування крохмалю з картоплі і зерна, а також збільшення виходу агар-агару з водоростей. Протеолітичні ферменти мікробного походження замінюють ренін в сироварінні. Ліпази знаходять застосування у виробництві сухого молока і для прискорення дозрівання сирів. Пектинолітичні ферменти здавна застосовуються для обробки льоносоломи і одержання з неї волокна. Амілолітичні ферменти використовують для видалення клею з тканин; деякі протеїнази застосовують для вивільнення шовкових волокон з шовку-сирцю; для знежирення волокон використовують ліпази. У шкіряній промисловості за допомогою протеолітичних ферментів проводять

зневолошення шкур і розм'якшення голини, прискорюють також процеси отримання високоякісної шерсті. Ферментні препарати застосовують у сільському господарстві за виробництва кормів. Пектинази і геміцелюлази підвищують доступність і засвоюваність кормів, прискорюють процеси силосування зелених кормів, що важко або зовсім не силосуються.

Все більшого застосування ферменти знаходять в тонкому органічному синтезі, в процесах отримання різних складних сполук (амінокислот, пептидів, нуклеотидів, напівсинтетичних антибіотиків), а також в медицині. Ряд ферментів застосовують у так званій «замінній терапії» для заповнення наявного ферментативного дефіциту. Так, препарати протеїназ використовують для видалення некротичних тканин під час лікування гнійних ран і опіків. Бактерійну аспарагіназу, що розщеплює аспарагін, необхідний лейкозним клітинам, застосовують при деяких злоякісних захворюваннях. Препарати протеїназ (терилін і стрептокіназа) володіють тромболітичною дією і застосовуються для боротьби з тромбозами. Холестерінестераза гідролізує холестерин, локалізований на внутрішніх стінках кровоносних судин.

Таким чином, обсяги і спектр ферментів, що випускаються, а також сфери їх застосування розширюються з кожним роком. Мікроорганізми, що є джерелом для отримання різноманітних ферментів, істотно розрізняються між собою за здатністю синтезувати дані біологічно активні сполуки. Ці відмінності виявляються як в асортименті ферментів, що синтезуються тим або іншим видом мікробів, так і в їх активності та вихідних властивостях. Ферменти – речовини білкової природи, тому в суміші з іншими білками визначити їх неможливо. Наявність ферменту визначають за протіканням тієї реакції, яку каталізує фермент; кількісне визначення ферменту проводять за величиною продукту реакції, що утворився, або за витратами вихідного субстрату. Прийнята так звана стандартна одиниця активності (Е або U) – це кількість ферменту, що каталізує перетворення 1 мікромоля субстрату за хвилину при заданих стандартних умовах.

Вибір продуцента необхідного ферменту пов'язаний з перевіркою активності величезної кількості культур, що приводить до відбору найбільш активного продуцента. Природні штами зазвичай не синтезують ферменти у надлишкових кількостях, оскільки процес їхнього синтезу перебуває під суворим генетичним контролем.

Виняток становлять конститутивні ферменти, наприклад, ферменти гексозомонофосфатного шляху, що синтезуються у великих кількостях за будь-яких умов росту.

Вихід ферментів можливо збільшити також за допомогою новітніх методів біотехнології. За допомогою плазмід або фагів, здатних до трансдукції, дозволяється збільшити копійність генів, що кодують синтез цільових ферментів. Посилення експресії генів можливе також в результаті включення сильних промоторів у ДНК.

Окрім генетичного фактора, величезний вплив на продукцію ферментів мають склад середовища і умови культивування мікроорганізмів. При цьому не лише наявність індуктора в середовищі здатна збільшити вихід ферменту. Надзвичайно важливим є якісний і кількісний склад поживного середовища. Наприклад, більшість видів цвілевих грибів роду *Aspergillus* добре ростуть на досить простому синтетичному середовищі Чапека з сахарозою і нітратом. Для синтезу амілази, однак, сахарозу слід замінити крохмалем і збільшити концентрацію вуглецю і азоту в середовищі. Після цього активність ферменту зростає в 3 рази. Додавання амінокислот у вигляді екстракту солодових ростків підвищує вихід ферменту додатково в 4...5 разів. Оптимізуючи склад поживного середовища, можна підвищити активність амілази більш ніж у 500 разів.

Підбираючи склад середовища, враховують всі фактори: вид і концентрацію джерела вуглецю та енергії, фактори росту, мінеральні елементи, що індукують субстрати. Як джерела вуглецю і азоту найчастіше застосовують різну природну органічну сировину: крохмаль, кукурудзяний екстракт, соєве борошно, гідролізати дріжджових біомас. Окрім джерела вуглецю, азоту і факторів росту, великий вплив на синтез ферментів роблять мінеральні солі магнію, марганцю, кальцію, заліза, цинку, міді й ін., багато з яких входять до складу ферментів.

Біотехнологічне виробництво ферментів реалізується двома способами – поверхневим і глибинним. Твердофазна поверхнева ферментація полягає у вирощуванні продуцента на поверхні тонкого шару твердого сипкого середовища. Глибинна ферментація у рідкому середовищі може бути реалізована як в умовах періодичного процесу, так і із застосуванням проточних систем.

При **поверхневій ферментації** для отримання інокуляту споровий матеріал розмножують поверхневим способом або

вирощують музейну культуру в умовах глибинної рідкої культури. У подальшому посівний матеріал направляють у стадію ферментації, яка здійснюється на поверхні сипкого середовища в металевих лотках або вертикальних перфорованих з обох боків кюветах. Культура розвивається на поверхні твердого крихкого середовища, основу якого складають пшеничні висівки, зернове лушпиння, що є джерелом ростових речовин. Для розпушування середовища у висівки додають деревну тирсу (5...10%), вівсяне лушпиння. Суміш перед автоклавуванням зволожують до 20...40% вологості і підкисляють для поліпшення умов стерилізації. Прогрівання сипкого середовища здійснюють парою в спеціальних стерилізаторах за безперервного перемішування середовища; тривалість процесу – 60...90 хвилин за температури 105...140°C. У охолоджене до температури 30°C середовище вносять стерильні термолабільні компоненти, інокулят (0,02...0,10% від маси середовища), швидко перемішують ручним способом і розкладають у лотки шаром 2...3 см, які встановлюють в герметичні заздалегідь простерилізовані камери, що підлягають аерації. Початкова вологість середовища – 58...60%, температура культивування 28...32°C, тривалість ферментації близько 36...48 год.

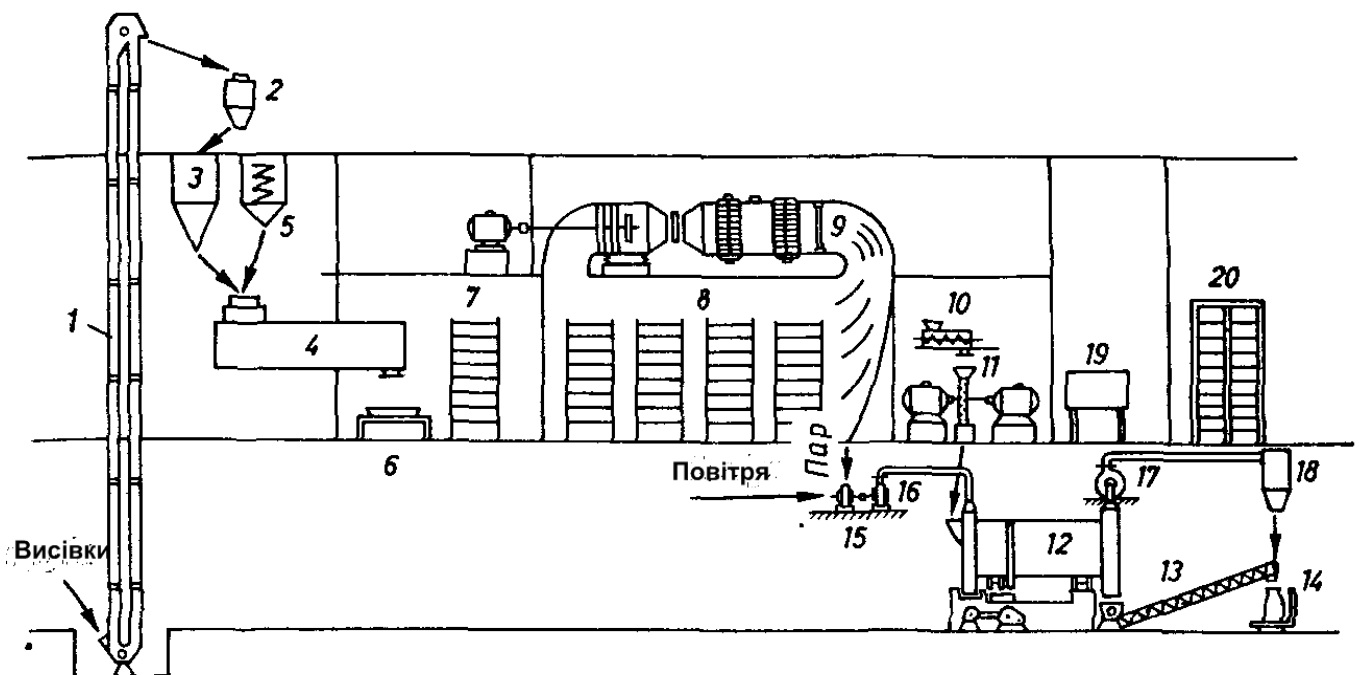
Поверхнева ферментація є екстенсивним методом з великою часткою ручної праці. При цьому, однак, він не енергоємний і забезпечує вищий вихід продукту на одиницю маси середовища порівняно з глибинною ферментацією.

Поверхнева ферментація з використанням замість лотків кювет досконаліша. Конструкція забезпечує ефективнішу аерацію і дозволяє частково механізувати процес (рис. 68). Використання в промисловості колонних апаратів об'ємної аерації ще більше вдосконалює процес твердофазної ферментації. Такий апарат розподілений на секції перфорованими пластинами, закріпленими на поворотних осях. Середовище в ході ферментації розпушується за допомогою перемішувачів. Це дозволяє збільшити висоту шару до 30 см. Режим перевантаження середовища на тарілках задається автоматично. Продуктивність апарату досягає 1 т культури за добу.

**Глибинний спосіб** мікробіологічного отримання ферментів має переваги порівняно з поверхневим, оскільки проходить у контрольованих умовах ферментації, виключає ручну працю, дозволяє автоматизувати процес. Поживне середовище для

ферментації готується, виходячи з фізіологічних потреб мікробної культури, що використовується, а також з типу цільового ферменту. Основною вуглецевою сировиною є різні сорти крохмалю (кукурудзяний, пшеничний, картопляний), кукурудзяний екстракт, буряковий жом, а також глюкоза, мальтоза, декстрин. Як джерело азоту застосовують органічні сполуки (гідролізати казеїну або мікробних біомас), а також мінеральні солі ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Для біосинтезу целюлолітичних ферментів джерелом вуглецю є бавовна, солома, целюлоза; ліполітичних – ліпіди.

Процес проводять у циліндрових апаратах об'ємом до  $100 \text{ м}^3$ . Синтез ферменту в глибинній культурі протікає протягом 3...4 діб за безперервної подачі стерильного повітря, стабілізації рН і температури середовища у суворо визначених рівнях. Незначні зміни значень даних параметрів можуть викликати багаторазове зниження ферментативної активності.



**Рис. 68. Схема отримання технічних ферментних препаратів методом поверхневого культивування:**

- 1 – елеватор – автоматичні ваги, 3 – бункер, 4 – стерилізатор, 5 – резервуар для стерильної води, 6 – пульт розподілу, 7 – полиці, 8 – камера, 9 – кондиціонер, 10 – дробарка, 11 – дезінтегратор, 12 – сушарка, 13 – шнек, 14 – ваги, 15 – калорифер, 16 і 17 – вентилятори, 18 – циклон, 19 – мийка для кювет, 20 – стерилізатор для кювет



Процес утворення біомаси продуцента не збігається в часі з максимумом продукції ферменту, при цьому умови для утворення ферменту можуть суттєво відрізнятися від умов для оптимального режиму синтезу біомаси. Тому умови середовища в процесі протікання ферментації контролюються і змінюються. Відомі стадійні процеси в двох послідовних апаратах. У першому створюють умови для розвитку міцелію; у другому – для синтезу і накопичення ферменту.

Ряд ферментних препаратів, що отримуються за поверхневої ферментації, випускають у вигляді висушених висівок із залишками міцелію, а також висушених осадів білків або висушених розчинів. Товарні форми таких препаратів відомі у вигляді сухих препаратів або розчинів ферментів. Останні зберігають за мінусової температури, із застосуванням стабілізаторів (солі кальцію або магнію, а також хлорид натрію, сорбіт й ін.). Для отримання очищених препаратів ферментів застосовують різні методи (осадження солями або органічними розчинниками, висолювання, сорбційне і хроматографічне очищення з використанням високоселективних іонітів). Процес завершується стадією висушування на розпилювальних або вакуумних апаратах в щадному температурному режимі, що не допускає великих втрат активності ферментів. Після стандартизації продукт надходить споживачеві.

## 8.2. Імобілізовані ферменти

Більш широке використання ферментів до останнього часу стримувалося низкою причин, з яких найважливішими є:

- трудомісткість відділення ферментів від початкових компонентів і продуктів реакції після завершення процесу, внаслідок чого ферменти використовуються, як правило, одноразово;
- нестійкість ферментів за зберігання, а також різних впливів (головним чином теплових);
- трудомісткість очищення ферментів і отримання їх в достатньо активному вигляді.

Широкі перспективи відкрилися перед інженерною ензимологією в результаті створення нового типу біоорганічних

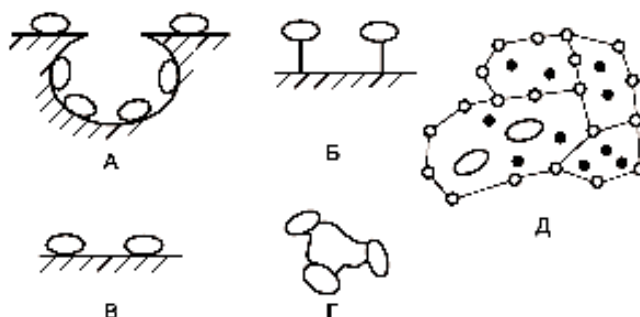
каталізаторів, так званих іммобілізованих ферментів. Термін іммобілізовані ферменти узаконений порівняно нещодавно, у 1974 р. Т. Сандеремом і Д. Реєм, хоча ще у 1916 р. Дж. Нельсон і Е. Гріффі показали, що інвертаза, адсорбована на вугіллі або алюмогелі, зберігає свою каталітичну активність. Проте початок цілеспрямованих досліджень, орієнтованих на створення такого роду стабілізованих ферментних каталізаторів, відноситься до середини ХХ ст., при цьому проводився широкий фронт робіт і за останні 30...35 років було досягнуто відчутних успіхів. **Іммобілізація** – це процес прикріплення ферментів до поверхні природних або синтетичних матеріалів, включення їх до полімерних матеріалів, порожнистих волокон і мембранних капсул, поперечного хімічного зшивання. Іммобілізацію також можна характеризувати як фізичне розподілення каталізатора і розчинника, під час якого молекули субстрату і продукту легко обмінюються між фазами.

Розподілення може бути досягнуто адсорбційним або ковалентним зв'язуванням ферменту з нерозчинними носіями або скріпленням окремих молекул ферменту з утворенням агрегатів. За іммобілізації ферментів відбувається стабілізація каталітичної активності, оскільки цей процес перешкоджає денатурації білків. Іммобілізований фермент, що має обмежену можливість для конформаційних перебудов, швидше ніж розчинний знаходить найкоротший шлях до функціонально активної конформації. Іммобілізовані ферменти набувають, окрім стабільності, окремих властивостей, не характерних для їх вільного стану, наприклад, можливість функціонувати в неводному середовищі, ширші зони оптимуму температури і рН. Іммобілізовані ферменти просторово роз'єднані на носієві. Це викликає утруднення міжмолекулярних взаємодій типу агрегації, які можуть привести до інактивації ферменту. При цьому фермент з розряду гомогенних каталізаторів переходить до розряду гетерогенних, тобто перебуває у фазі, не пов'язаній ні з початковим субстратом, ні з утворюваним продуктом. Це дозволяє організовувати на базі іммобілізованих ферментів різні ефективніші біотехнологічні процеси багаторазової періодичної, а також безперервної дії з використанням принципу взаємодії рухливої і нерухомої фаз.

Тривалість збереження каталітичної активності і ряд властивостей ферментів визначаються правильністю вибору носія, методу і умов проведення іммобілізації. Існує декілька принципово

різних підходів, що дозволяють об'єднати фермент з носієм:

- адсорбційні методи;
- методи хімічного скріплення на поверхні;
- методи механічного включення або захоплення;
- методи хімічного приєднання (рис. 69).



*Рис. 69. Основні методи іммобілізації ферментів:*

А – адсорбція на великопористому носії; Б – ковалентне зв'язування; В – адсорбція; Г – поперечне зшивання; Д – включення у гель

Методи іммобілізації шляхом адсорбції засновані на фіксації ферменту на поверхні різних матеріалів – неорганічних (силікагель, пористе скло, кераміка, пісок, обпалена глина, гідроокиси титану, цирконію, заліза) і органічних (хітин, целюлоза, поліетилен, іонообмінні смоли, спінена гума, поліуретан із пористою структурою). Наскільки різноманітні матеріали, що використовуються для адсорбції ферментів, настільки різні механізми і міцність зв'язування ферменту із носієм. Характеризуючи ці зв'язки, можна говорити про широкий їх спектр, від простого обростання носія до утворення полярних, йонних і ковалентних зв'язків. Адсорбція – це найпростіший метод іммобілізації ферментів на поверхні нерозчинних носіїв.

Процедура іммобілізації полягає в змішуванні за певних умов ферменту з носієм і інкубації суміші. У подальшому за допомогою фільтрування і центрифугування здійснюють відокремлення нерозчинного компоненту суміші від розчинного. У процесі адсорбції ферменту на носіїві за їхньої взаємодії виникають сольові зв'язки, а також інші слабкі взаємодії (водневі, ван-дер-ваальсові). *Адсорбція* – м'який метод іммобілізації, за якого вплив носія на активність ферменту мінімальний, тому, як правило, ферменти добре зберігають активність. Недолік даного методу – неміцність зв'язків. Тому за

незначною зміною умов середовища (рН, температури, йонної сили, концентрації продукту) можлива десорбція ферменту з поверхні носія. Більш міцними є зв'язки, засновані на йонній взаємодії, коли адсорбція підтримується за певних значень рН і йонної сили розчину, що омиває фермент.

Методи хімічного зв'язування мають довгу історію і реалізуються в різних модифікаціях. Практично всі функціональні групи білків можуть бути використані для зв'язування каталізатора з носієм. Широке застосування знайшли реакції, що здійснюються за наявності водопоглинаючого агента, і викликають утворення пептидних зв'язків між аміногрупами ферменту і карбоксильними групами носія або, навпаки, – між карбоксильними групами ферменту і аміногрупами носія.

Як водопоглинаючий агент використовується дициклогексилкарбодіімід, зшиваючим агентом може бути бромціан. Можливе проведення скріплення без участі зшиваючих агентів. Перспективним підходом у розвитку даного методу є використання прищеплених полімерів як носіїв. Прищеплюючи до поверхні полімерного матеріалу бокові гілки, вдається регулювати його властивості і впливати на реакційну здатність за рахунок створення на поверхні носія мікроспоруд, оптимальних для стабільного функціонування біокаталізатора. Приклад такого підходу – застосування поліетилену з прищепленими полівініловим спиртом або поліакриловою кислотою. З метою зниження дифузійного утруднення між субстратом і ферментом, а також для полегшення відтоку продуктів, що утворюються, за іммобілізації можна виводити фермент із мікроспоруди молекули носія. Фермент приєднують до поверхні носія через деяку хімічну послідовність певної довжини, так званий спейсер.

Іммобілізація шляхом хімічного зшивання ферменту з носієм характеризується високою ефективністю і міцністю зв'язку. Для запобігання зниженню каталітичної активності ферменту місце зшивання віддаляють від активного центру каталізатора і приєднання здійснюють не по білковій частині молекули, а по вуглеводній.

Одним із найбільш ефективних методів іммобілізації з утворенням хімічних зв'язків вважають утворення ковалентних зв'язків між молекулою носія і каталізатором. Як правило, для ковалентного приєднання носій необхідно заздалегідь активувати (активацію афінних носіїв проводять, наприклад, бромціаном).

Простішим, таким, що не потребує попередньої модифікації носія, і швидким за іммобілізації в простих умовах є металохелатний метод. Він полягає в іммобілізації ферментів на носіях з полімерів гідроксидів металів (титану, цирконію, олова, заліза). Гідроксильні групи витісняються з координаційної сфери того або іншого металу функціональними групами ферменту, в результаті між носієм і ферментом виникає координаційний або ковалентний зв'язок. Успіх методу визначається за таких умов: у молекулі ферменту повинні бути групи, що віграють роль лігандів і здатні стерично контактувати з атомами титану; дані групи повинні бути віддалені від активного центру. Метод застосовують у різних варіантах, з використанням органічних і неорганічних носіїв, включаючи йонообмінні носії. Природа комплексу може суттєво впливати на активність і операційну стабільність іммобілізованого ферменту.

Порівняно новим різновидом металохелатного методу є іммобілізація ферментів на основі гідроксидів перехідних металів, головним чином титану і цирконію. Молекули ферменту закріплюються на поверхні носія шляхом утворення хелатів. Для реалізації даного методу, окрім фермента, необхідна наявність лише одного реагента, власне гідроксиду металу. Недоліком методів іммобілізації на основі фізичної адсорбції або ковалентного приєднання є необхідність використання достатньо великих кількостей каталізатора. Більше того, хімічна модифікація, якої піддаються ферменти в процесі іммобілізації може суттєво знижувати їх каталітичну активність. Уникнути цього можливо за використання методів іммобілізації ферментів шляхом введення в полімерну структуру.

Як полімерні носії застосовують природні й синтетичні матеріали (альгінат, желатин, карагінан, колаген, хітин, целюлоза, поліакриламід, фоточутливі полімери). Розчин ферменту змішують з розчином мономерів носія. У подальшому створюють умови для процесу полімеризації, в ході якої відбувається механічне введення фермента до структури носія. Важливим моментом є рівномірність розподілу молекул ферменту за об'ємом носія і однорідність отримуваних агрегатів. Техніка введення залежить від природи і властивостей використаного матеріалу, а утворювані при цьому біосистеми мають вид гранул, волокон, полімерних сіток, плівок тощо.

Іммобілізація в поліакриламідний гель (ПААГ), який найчастіше

використовується для цих цілей, полягає у внесенні розчину ферменту до розчину мономера. У подальшому в підібраних умовах швидко формується гель у вигляді блоку. Монолітний гель подрібнюють, надаючи часткам форми кубиків бажаного розміру. За використання желатину або агар-агару спочатку підігрівають їх розчини, потім охолоджують і вносять до ферменту. У процесі подальшого охолодження відбувається формування гелю. Полімеризація альгінату відбувається за наявності деяких катіонів. Тому на першому етапі змішують розчини ферменту і мономерів цих полісахаридів, далі суміш за допомогою дозуючого пристрою вносять до розчину, що містить йони  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Ba}^{2+}$  (для альгінату) або  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$  або  $\text{Mo}^{2+}$  (для карагінану), при цьому утворюються сферичні полімерні частинки у вигляді гранул.

Зручною для використання є іммобілізація ферментів методом інкапсулювання. У цьому методі головним є не створення фізичних або хімічних сил, необхідних для зв'язування каталізатора з носієм, а утримання розчину, що оточує фермент. У процесі інкапсулювання іммобілізуються не окремі молекули ферменту, а початковий розчин, що містить фермент. При використанні методу іммобілізації стосовно ферментів найчастіше застосовують коацервацію і міжфазову полімеризацію. Перший прийом реалізується без хімічних реакцій і включає фазове розподілення колоїдних часток полімеру, що асоціюють навколо маленьких водних краплин і утворюють у подальшому безперервну мембрану. Як полімерні матеріали при цьому використовують нітрат або ацетат целюлози, бутадієновий каучук. При міжфазовій полімеризації для утворення напівпроникної мембрани один з реагентів є у водній, інший – в органічній фазі; на межі розділу фаз відбувається реакція полімеризації і навколо диспергованих в органічній фазі краплин утворюється шар полімеру. За допомогою цього методу можуть бути отримані мембрани з поліуретану або епоксидних смол. Напівпроникні мембрани, що покривають розчин з ферментом, можуть бути виготовлені з різних матеріалів (полістиролу, поліакрилату, поліуретану, поліефірів, ліпідів, полікарбонатів й ін.). Варіюючи матеріали для отримання напівпроникної мембрани, можна здійснювати контроль розмірів молекул. Наприклад, великі за розмірами молекули ферментів утримуються всередині капсули, а дрібніші молекули вихідних субстратів і продуктів, що синтезуються, можуть вільно дифундувати через мембрану.

Діаметр мікросфер буває від декількох мікрон до декількох тисяч мікрон за товщини мембран від сотень ангстрем до декількох мікрон. Безумовною перевагою мікрокапсулювання є велика площа поверхні, яка припадає на одиницю активності іммобілізованого ферменту, що дозволяє використовувати високі концентрації ферментів у початковому розчині й досягати високої ефективності їх дії. При цьому можливо також надавати ферменту здатність функціонування у неводному середовищі й отримувати великі виходи цільового продукту за високого ступеня чистоти.

До інкапсулювання близький метод обернених міцел. Фермент вводять у замкнуту структуру поверхнево-активної речовини (ліпід, детергент), що утримує мікроскопічну краплину води. Він функціонує на межі розподілу двох фаз: органічної, такої, що перебуває в біореакторі, й водної, що введена в обернену міцелу.

Суттєвий інтерес викликає спосіб введення ферментів у порожнисті волокна. Застосовують волокна, що виготовлені з природних або синтетичних полімерних матеріалів. Розчин ферменту вводять до внутрішнього об'єму порожнистих волокон і потім «запечатують» волокно з обох кінців. Фермент у порожнині волокон не зазнає будь-яких хімічних модифікацій, тому зберігає свою активність і властивості.

Іммобілізація методом поперечних зшивань (або хімічного приєднання) полягає в хімічному зв'язуванні молекул ферментів між собою шляхом утворення поперечних зшивань. Для цього застосовують різні агенти, що несуть дві і більше реакційноздатні групи, які здійснюють поперечне зшивання ферментів.

Метод відрізняється простотою реалізації і дозволяє проводити зшивання різних за структурою ферментів, а також ферментів з цілими клітинами. Однак, часто при зшиванні може відбуватися суттєва зміна зниження активності каталізатора.

Таким чином, методи іммобілізації досить різноманітні, причому є можливість використання їх у поєднанні. Наприклад, адсорбцію на носієві з інкапсулюванням, введення до структури гелю та адсорбцію і так далі. Методи, що розглядалися, застосовуються не лише для іммобілізації ферментів, а й і для інших біокаталізаторів – цілих клітин, клітинних органел, антитіл, антигенів та ін. Жоден з описаних методів не є універсальним, і для кожного типу каталізаторів існують свої переважні методи. Ферменти іммобілізують різними адсорбційними методами або методом

поперечних зшивань. Кращим методом для іммобілізації цілих клітин є введення до полімерних структур.

Окрім створення стійких біокаталітичних ферментних систем, найважливішим завданням інженерної ензимології є вивчення фізико-хімічних властивостей даних систем і розробка наукових основ їх функціонування та застосування.

### **8.2.1. Процеси на основі іммобілізованих ферментів**

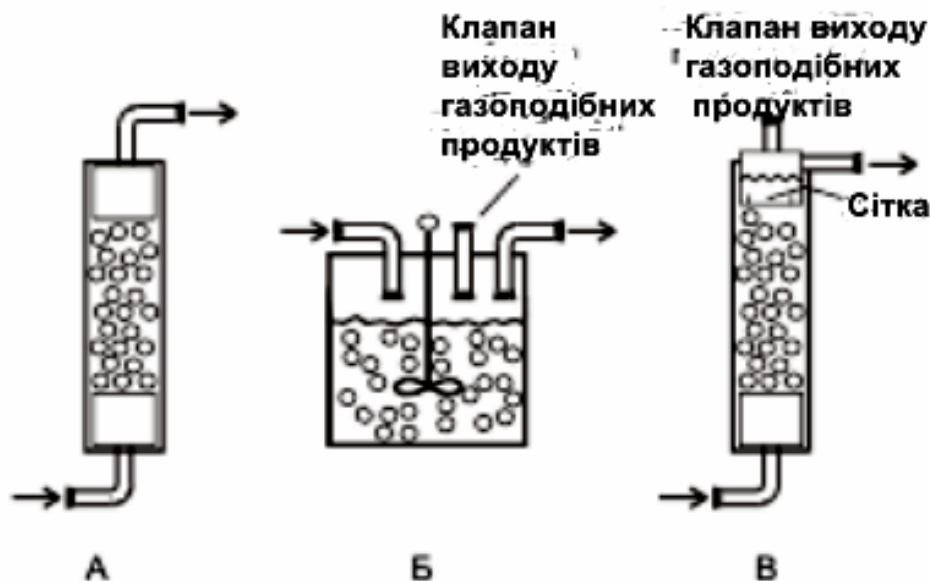
Сфери застосування іммобілізованих ферментів різноманітні – це тонкий органічний синтез і перетворення енергії, ферментна аналітика та отримання цільових продуктів, конверсія рослинної сировини і створення лікарських препаратів.

У сучасній біотехнології застосування іммобілізованих ферментів є одним з найважливіших розділів, що динамічно розвивається. Обсяги випуску ферментів, що використовуються в промислових процесах, безперервно зростають. При цьому західні країни, що лідирують у цій галузі, щорічно випускають ферменти на сотні мільйонів доларів. Виробництво протеаз, глюкозоізомераза, ацилтрансфераза досягає сотень і тисяч кг/рік.

Упровадження іммобілізованих ферментів у промислові галузі та організація на їх основі принципово нових, екологічно чистих і компактних біотехнологічних процесів дає відчутний економічний ефект. Для таких процесів розробляють спеціальні біореактори, що мають аналогію з реакторами для хімічних процесів з гетерогенним каталізом. Іммобілізований фермент у такому біореакторі є нерухомою фазою, через яку протікає субстрат, що підлягає біоперетворенню. Реактори бувають періодичної і безперервної дії. Найчастіше фермент, включений у полімерну структуру, являє собою малі сферичні частинки однакового розміру. Це забезпечує велику площу реакційної поверхні і, отже, покращання дифузії. Сферичні частинки або гранули з ферментом максимально щільно упаковують в апараті. В результаті цього концентрація каталітичного агента, що бере участь у біотехнологічному процесі, значно вища порівняно з системами ферментації на основі мікробних клітин. Підвищення концентрації біокаталізатора забезпечує велику продуктивність апарату і вищий вихід продукту. Одностадійне перетворення субстрату з використанням іммобілізованих ферментів здійснюється зазвичай у проточних реакторах з перемішуванням, з



псевдозрідженим шаром, а також у реакторах з порожнистими волокнами (рис. 70).



*Рис. 70. Типи реакторів з іммобілізованими ферментами*  
(за Дж. Вудвордом, 1988):

А – реактор колонного типу; Б – реактор з перемішуванням;  
В – модифікований реактор колонного типу

Усі представлені системи мають певні обмежування в частині нерівномірного розподілу каталізатора, а також перепадів тиску. Застосовують реактори колонного типу, реактори з перемішуванням на базі магнітної або підвісної мішалки. У реакторах з перемішуванням можливе руйнування досить м'яких частинок гелю. Оригінальна конструкція біореактора типу «корзина», в якому для запобігання руйнуванню гранул перемішування здійснюється за рахунок дротяної «корзини», що обертається, у вічках якої іммобілізовані гранули з уведеним ферментом. У даному варіанті реалізовано два типи іммобілізації: полімерні гранули з введеними молекулами ферменту самі іммобілізовані у вічках дротяної сітки. Застосовуються також біореактори періодичної дії, без потоку, в яких фермент, що введениц у гель у вигляді монолітного блоку, заповнює весь об'єм апарату. У товщі гелю в процесі іммобілізації і формування моноліту або після завершення цього процесу для здійснення газо- і масообміну формують вертикальні канали.

Ера біореакторів для іммобілізованих біокаталізаторів тільки починається; їх конструкції безперервно вдосконалюються стосовно різних біотехнологічних процесів, що реалізуються на їх базі. Ці

процеси відносяться до сфери органічного синтезу і медицини, конверсії рослинної сировини і перетворення енергії, виробництва харчових речовин і напоїв.

### 8.2.2. Імобілізовані ферменти у харчовій промисловості

Завдяки високій каталітичній активності і специфічності деякі ферменти вже давно використовуються в різних галузях виробництва, в першу чергу, це комплексні ферментні препарати для гідролізу природних полімерів – білків, крохмалю, пектинів (табл. 13).

Таблиця 13

#### Використання ферментів у харчовій промисловості

Ферменти	Галузь застосування
1	2
<i>Глюкозидози:</i> <i>α-амілаза</i>	Гідроліз крохмалю Виробництво кондитерських виробів Пивоваріння Випікання хліба
глюкоамілаза	Отримання глюкози Оцукрування лікерів і пива
інвертаза	Виробництво кондитерських виробів
пектиназа	Освітлення вин і фруктових соків
лактаза	Виробництво морозива
целюлаза	Обробка соломи Виробництво кофе Облагоджування рослинних кормів Виготовлення джемів Обробка цитрусових Силосування

1	2
<p><i>Протеази:</i> протеази мікробного походження</p>	<p>Випікання хліба Освітлення вин і пива Розм'якшення м'яса Стабілізація згущеного молока</p>
<p>бромелаїн</p>	<p>Виробництво поживних сумішей на підставі гідролізатів білків Стабілізація пива</p>
<p>папаїн</p>	<p>Освітлення пива Отримання білкових гідролізатів молока Розм'якшення м'яса</p>
<p>трипсин</p>	<p>Розм'якшення м'яса</p>
<p>ренін</p>	<p>Виготовлення сиру</p>
<p>пепсин</p>	<p>Стабілізація пива Виготовлення сиру</p>
<p><i>Ліпази:</i></p>	<p>Модифікація смаку молочних продуктів Виготовлення сиру</p>
<p><i>Оксидоредуктази:</i> глюкозооксидаза</p>	<p>Виробництво кондитерських виробів Видалення кисню з харчових продуктів Пивоваріння Виготовлення майонезів</p>
<p>каталаза</p>	<p>Видалення пероксиду водню після стерилізації молочних продуктів</p>
<p><i>Ізомерази:</i> глюкозоізомераза</p>	<p>Виробництво глюкозо-фруктозних сиропів</p>

В історії харчової технології, що налічує тисячоліття, іммобілізовані біокаталітичні системи (ферменти, клітини) за останніх 30...35 років вписали абсолютно нові сторінки, позначивши принципові зрушення в галузі самих технологій і в поліпшенні якості харчових продуктів. Усе більше застосовуються в розвинених країнах біотехнологічні процеси отримання глюкозо-фруктозних сиропів, оптично активних L-амінокислот із рацематних сумішей, дієтичного безлактозного молока, цукрів з молочної сироватки, синтезу L-аспарагінової і L-яблучної кислот з фумарової кислоти.

Отримання глюкозо-фруктозних сиропів є важливим з точки зору дієтології процесом, який вперше був реалізований у промисловості в 1973 р. американською компанією «Клінтон Корн». Нині це найкрупніший промисловий процес на основі іммобілізованих ферментів.

Фруктоза порівняно з глюкозою, має приємний смак, на 60...70% солодша, тобто її споживають менше звичайного цукру, крім того, метаболізм фруктози в організмі людини не пов'язаний з перетворенням інсуліну, вона менш шкідлива для зубів та ін. Технології отримання глюкозо-фруктозних сиропів за короткий термін було розроблено і освоєно в промислових масштабах багатьма західними країнами. У 1980 р. їх випуск становив 3,7 млн. тонн. Продукт з товарною назвою ізоглюкоза надходить на ринок у вигляді сиропів, що містять глюкозу і фруктозу в співвідношенні, близькому до 1:1; з використанням процесів розподілу типу рідкої хроматографії вміст фруктози може бути підвищений до 90%.

Біохімічна суть процесу зводиться до перетворення (ізомеризації) глюкози, заздалегідь отриманої внаслідок гідролізу кукурудзяного або картопляного крохмалю у фруктозу під впливом іммобілізованої глюкозоізомерази. Реакція протікає за одну стадію до тих пір, поки в реакційній суміші співвідношення глюкози і фруктози практично не зрівняється. Кінцевим продуктом може бути даний розчин; фруктозу можна відокремлювати від розчину, а глюкозу піддати подальшій ізомеризації. Процес протікає безперервно в реакційних колонах заввишки 5 м, заповнених шаром каталізатора – іммобілізованого ферменту у вигляді полімерних гранул, порожнистих волокон, шматочків гелю та ін. Продуктивність біореакторів варіює від 1 до 9 т глюкозо-фруктозного сиропу на 1 кг іммобілізованого ферменту. За економічними оцінками, виконаними в Угорщині на основі аналізу виробництва глюкозо-фруктозних

сиропів потужністю 120 тис. т кукурудзяного зерна на рік, виробництво такого типу економічніше в 1,5 разу порівняно з традиційним отриманням цукру з цукрового буряку.

Корпорацією «Цетус» (США) розроблено новий процес отримання 100% фруктози із глюкозних сиропів. На першому етапі глюкоза під дією іммобілізованої піранозо-2-оксидази окислюється в D-глюкозон, що на другому, хімічному етапі, на паладієвому каталізаторі практично з 100% виходом відновлюється до фруктози.

На початку XXI століття США планують замінити на 30...40% споживання цукру такими фруктозними сиропами, Японія – різко скоротити експорт цукру за рахунок біотехнологічного процесу ізомеризації глюкози у фруктозу.

Отримання L-амінокислот ферментативним розподілом хімічних рацематних сумішей D-, L-амінокислот реалізовано на промисловому рівні фірмою-виробником «Танабе Суйяку» в 1969 р. Як вихідну сировину використовують отримані хімічним синтезом ациліровані D-, L-амінокислоти (метіонін, валін, фенілаланін, триптофан), розчин яких пропускають через колонку об'ємом 1 м<sup>3</sup>, заповнену іммобілізованою аміноацилазою. Фермент гідролізує L-ацил-ізомери, після відщеплювання об'ємної ацил-групи дрібніші й розчинні молекули L-амінокислот виводяться із біореактора через мембрану. Зрештою в реакційній суміші залишаються лише ацил-D-амінокислоти, що за нагрівання знову рацемуються на D- і L-ізомери. Період напівінактивації ферменту, іммобілізованого на полімерній смолі, становить 65 днів. Періодично в колонку доливають свіжу порцію розчину ферменту, який знову адсорбується смолою. Час роботи колонки без зміни носія був більше 8 років.

В Італії фірмою-виробником «Сентрале дель Латте» у середині 80-х років реалізовано перший комерційний процес отримання безлактозного молока.

Лактоза, що є учималих кількостях у молоці і погано розчинна, викликає кристалізацію ряду молочних продуктів та кондитерських виробів, знижуючи їх якість. Окрім цього, деяка частина населення не може вживати нативне молоко внаслідок недостатності лактази, ферменту, що гідролізує молочний цукор з утворенням глюкози і галактози. Молоко після такої обробки набуває якостей дієтичного продукту. Масштаби виробництва безлактозного молока зростають в багатьох європейських країнах.

Отримання цукру з молочної сироватки в процесі

ферментативного гідролізу дозволяє отримувати додаткові кількості цукристих речовин з відходів молочної промисловості. Перші промислові процеси гідролізу лактози молочної сироватки з використанням іммобілізованої лактази здійснені у 1980 р. в Англії і Франції. Заздалегідь демінералізовану сироватку пастеризують і потім пропускають через колонку ферментації з іммобілізованою лактазою. Період напівінактивації ферменту вдається збільшити до 60 діб, потужність установок – 1000 л/год. за 80% конверсії лактози. Глюкоза і галактоза, що при цьому отримується, перевершують за мірою солодощів звичайні цукри в 1,5 разу за рівних економічних показників.

Отримання L-яблучної кислоти ферментативним способом з L-аспарагінової кислоти засновано на використанні фумарази, що іммобілізована у гелі. Яблучна кислота достатньо широко використовується в харчовій і фармацевтичній промисловості як замітник лимонної кислоти. Компанією «Танабе Суйяку» в результаті іммобілізації фумарази в караген вдалося підвищити її операційну стабільність за часом напівінактивації понад 100 діб, при цьому продуктивність процесу перетворення фумарової кислоти на яблучну зросла більш ніж у 5 разів.

Отримання L-аспарагінової кислоти за допомогою ферменту аспартази, що іммобілізована у гелі, за часом напівінактивації препарату до 30 діб можливе з фумарової кислоти. Фермент, приєднуючи аміак до подвійного зв'язку фумарової кислоти, за одну стадію утворює оптично активну форму L-аспарагінової кислоти. Процес реалізований також на основі іммобілізованих у гель мікробних клітин з додатковим хімічним зв'язуванням, час напівінактивації аспартази, що є в клітинах, зріс до 120 діб; технологічний процес практично повністю автоматизований і реалізується в безперервному режимі. Продуктивність установок – до  $1,7 \text{ т/м}^3$  на добу.

Окрім представлених і реалізованих у промислових масштабах процесів, іммобілізовані ферменти нині широко використовуються в наукових дослідженнях при розробці нових біотехнологічних процесів отримання цінних продуктів. Це процес отримання глюкози з крохмалю за участю амілази і глюкозоамілази; отримання інвертного цукру (аналог глюкозо-фруктозних сиропів) із сахарози з використанням інвертази. У рамках дієтології розробляються процеси отримання білкових гідролізатів заданого складу за участю

іммобілізованих протеаз. Освоюються установки для безперервного ферментативного отримання глюкози з різних целюлозовмісних відходів.

У недалекому майбутньому іммобілізовані ферменти можуть бути використані для таких цілей:

1. Холінестераза може застосовуватися для визначення пестицидів. Ступінь інгібування цього ферменту в присутності пестицидів оцінюють електрохімічними або колориметричними методами.
2. Аналогічним чином інші ферменти можуть використовуватися для визначення токсичних речовин. Так, карбоангідраза дуже чутлива навіть до малих концентрацій хлорпохідних вуглеводнів, гексокіназа – до хлордану, ліндану і токсафену.
3. Іммобілізована дізопропілфторфосфатаза нервових клітин кальмара може знайти застосування для знешкодження фосфоорганічних нервових газів (зоману, зарину).
4. Іммобілізована гепаріназа може застосовуватися для запобігання тромбоутворенню в апаратах штучного кровообігу.
5. Іммобілізована білірубіноксидаза може використовуватися для віддалення білірубину із крові новонароджених, що страждають на жовтуху.
6. Запропоновано новий спосіб застосування іммобілізованого гемоглобіну. Суть його полягає в тому, що введений у поліуретанову матрицю білок утворює гемогубку, здатну поглинати кисень прямо з води ефективністю 80%. Далі кисень вивільняється з полімеру під дією слабкого електричного розряду або у вакуумі. Припускається, що така система може забезпечувати киснем водолазів або двигуни, що працюють під водою.
7. Можливо, незабаром вдасться створити системи з декількох іммобілізованих ферментів. Так, якщо покласти в мікрокапсули три ферменти – уреазу, глутаматдегідрогеназу і глюкозодегідрогеназу, то їх можна буде використовувати для видалення сечовини із крові хворих на ниркову недостатність.
8. Іммобілізовані ферменти знайдуть подальше застосування в молочній промисловості. При виробництві сиру можуть використовуватися іммобілізовані білки, що сприяють зсіданню молока, – ренін і пепсин. Для гідролізу жиру в молоці можна використовувати іммобілізовані ліпази і естерази.

9. Різноманітні іммобілізовані ферменти згодом знайдуть застосування і в датчиках для швидкого аналізу. Сьогодні використовуються лише декілька ферментів, але коли буде вирішена проблема стабілізації, їх число збільшиться. Особливо корисними через свою високу стабільність можуть стати ферменти термофілів.

### **8.3. Біотехнологія отримання молочних продуктів**

За виробництва продуктів харчування широко застосовують процес ферментації. Цей процес здебільшого є переробкою сільськогосподарських продуктів і продуктів харчування за допомогою цвілі.

У харчовій промисловості ферментацію застосовують головним чином для отримання молочних продуктів. У квашенні молока зазвичай беруть участь стрептококи і молочнокислі бактерії; лактоза при цьому перетворюється на молочну кислоту.

Шляхом використання інших реакцій, які супроводжують головний процес або здійснюються при подальшій обробці, отримують й інші продукти переробки молока. Серед них – пахта, кефір, сметана, йогурт і сир. Властивості кінцевого продукту залежать при цьому від характеру і інтенсивності реакцій ферментації. Ті реакції, що здійснюються поряд із основним процесом утворення молочної кислоти, і визначають зазвичай особливі властивості продуктів. Так, саме вторинні реакції ферментації, що відбуваються при дозріванні сирів, визначають смак окремих їх сортів. У деяких таких реакціях беруть участь пептиди, амінокислоти і жирні кислоти, що присутні в продуктах.

У молоці за ферментації можуть протікати шість основних реакцій, в результаті яких утворюється: 1 – молочна, 2 – пропіонова або 3 – лимонна кислота, 4 – спирт, 5 – олійна кислота або ж, 6 – відбувається колиформне газоутворення. Головна з цих реакцій – утворення молочної кислоти. На ній засновані всі способи ферментації (квашення) молока. Лактоза молока гідролізується при цьому з утворенням галактози і глюкози. Зазвичай галактоза перетворюється на глюкозу ще до квашення. Наявні в молоці бактерії перетворюють глюкозу на молочну кислоту. Утворення згустка казеїну відбувається в ізоелектричній точці цього білка (рН 4,6) під



дією молочної кислоти. Цей процес лежить в основі сироваріння.

За виробництва швейцарського сиру ключову роль відіграє маслянокисле бродіння з утворенням вуглекислого газу. Саме воно обумовлює своєрідний смак (букет) цих сирів і утворення вічок. Характерний смак пахти, сметани і вершкового сиру формується в результаті лимоннокислого бродіння. Він поєднує складові смаки діацетилу, пропіонової і оцтової кислот та інших близьких до них сполук.

Молочні продукти, отримані на основі спиртового бродіння, мало відомі в Європі і Америці. Такий тип бродіння знайшов застосування при переробці молока в Росії, але у виробництві інших продуктів він вважається небажаним. Зазвичай зростання його дріжджів (*Torula*) прагнуть подавити. Небажані, також, маслянокисле бродіння і колиформне газоутворення.

Різні процеси ферментації молока проходять в контрольованих умовах. Протягом багатьох минулих тисячоліть вони здійснювалися за участю бактерій, початково присутніх у молоці. У наш час для цього використовують різноманітні закваски, що дозволяють отримувати молочні продукти необхідної якості і типу. Культури живих бактерій, що застосовуються при цьому, можуть представляти або один якийсь штам певного виду (культури моноштамів), або декілька штамів або видів (багато штамові або змішані культури). Комерційні культури-закваски складаються з бактерій, що утворюють молочну кислоту і пахучі речовини.

Вибір і склад комбінацій, що використовуються з цих штамів і видів бактерій визначаються бажаними властивостями і умовами отримання продуктів, наприклад, швидкістю утворення молочної кислоти.

***Використання ферментів у молочній промисловості.***  
Отримання сиру із молочних білків – приклад типової ферментації в твердому середовищі, яка є способом зберігання молока. Якщо не вжити особливих запобіжних засобів, у молоко швидко потрапляють бактерії й інші мікроорганізми, що заквашують його, зброджуючи лактозу на молочну кислоту. В наші дні за рівнем збуту виробництво молочнокислих продуктів посідає друге місце в світі серед видів промисловості, в яких використовуються мікробіологічні процеси (після виробництва алкогольних напоїв).

У молочній промисловості широко використовують ферменти з метою підвищення якості продукції і розширення асортименту. Для

коагуляції білків при виготовленні сиру застосовують сичужний фермент ренін (хімозин), що отримується із шлунку (сичуга) молодих телят. Нині більше 500 сортів сиру виготовляють із застосуванням реніну (хімозинові сорти). Він є ефективним згущувачем казеїну і розщеплює мінімальну кількість молочних білків до водорозчинних компонентів. Щоб задовольнити попит на ренін, розроблено декілька способів отримання аналогічного ферменту мікробного походження. Ще в 20-і роки було запропоновано використовувати в сироварінні протеази цвілевого гриба роду *Mucor*, проте ці гриби виявилися непридатними, головним чином через синтез неприйнятних побічних продуктів. У 60-і роки було виділено два термофільних штами мукоральних грибів *Mucor pusilus* і *M. miehei*, які синтезують відповідні ферменти, хоча виявилось, що мікробний ренін має вищу порівняно з тваринним протеолітичну активність.

Добрими згущувачами є також протеази інших мікроорганізмів (*Pseudomonas mixoides*, *Bacillus licheniformis*, *Edothea parasitica* та ін.). В даний час у сироварінні використовують близько 10% реніну мікробного походження. Є відомості про успішну трансплантацію в клітини бактерій гена, який відповідає за синтез реніну в організмі тварин, що суттєво збільшує можливості використання мікробного реніну.

У молочній промисловості застосовують каталазу, використання якої спільно з пероксидом водню дозволяє виключити процес пастеризації, що проводиться з метою інактивації патогенної і сторонньої мікрофлори. Внаслідок пастеризації частково втрачаються природні ферменти молока. Пероксид водню в концентрації 0,2...0,3% від об'єму молока виконує функції дезінфектора, що суттєво не впливає на ферменти молока (ліпазу, протеазу, фосфатазу). Додатки каталази інактивують залишки пероксиду водню в молоці.

**Молочнокислі продукти.** У кожного народу є хоча б одне національне блюдо, приготовлене шляхом бродіння. У Вірменії широко споживають мацоні, в Болгарії популярний кефір, у Франції – сири типу Рокфор, в Україні – ряжанка, російська кухня неможлива без житнього хліба і кислого молока. З національних блюд ці продукти перетворилися на загальновізанні, інтернаціональні.

Ще І.І. Мечников наприкінці минулого століття звернув увагу на важливість нормальної діяльності кишкової мікрофлори, а у разі порушення – необхідність її відновлення за допомогою молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus*, що запобігають

розвитку чужорідних мікробів. Чисті культури цих бактерій використовують для отримання ацидофіліну. Його виготовляють із стерильного молока (стерилізація 15 хв. за температури 120°C або 30 хв. за температури 110°C), додаючи чисту посівну культуру і витримуючи 20...48 год. за температури 35...37°C до отримання продукту необхідної кислотності. Кількість живих бактерій *L. acidophilus* в ацидофіліні повинна бути не менше 200 млн на 1 мл, вміст молочної кислоти в добре приготовленому ацидофіліні 0,65...0,75%. Під час бродіння ацидофільні бактерії синтезують органічні кислоти (в основному молочну), асимілюючи глюкозу, галактозу, лактозу та інші цукри.

Як популярний вітчизняний молочнокислий продукт можна вважати *кефір*. В глибоку старовину для приготування кефіру кобиляче, козине, овече або коров'яче молоко засівали так званими «зернами кефірів». Це була природна симбіотична мікрофлора, що включає молочнокислі бактерії *Lactobacillus casei*, дріжджі *Saccharomyces kefir* і деякі види супутніх стрептококів. Молоко зброджувалося в бурдюках; внаслідок виділення діоксиду вуглецю напій ставав шипучим. Сучасний кефір головним чином готують шляхом закваски коров'ячого молока.

Мікрофлора іншого молочнокислого продукту – *йогурту* – змішана, його отримують за зброджування цільного молока сумішшю двох симбіотичних молочнокислих бактерій: *Lactobacillus bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus*, але домінує болгарська паличка *Lactobacillus bulgaricus* що зброджує глюкозу, галактозу і лактозу. Для отримання бажаної консистенції продукту, смаку і запаху ці організми повинні міститися в культурі приблизно в рівних кількостях. Кислоту на початку закваски утворює в основному *S. thermophilus*. Змішані закваски потрібно часто оновлювати, оскільки повторні пересівання несприятливо позначаються на співвідношенні видів і штамів бактерій: у них починає домінувати *L. Bulgaricus*. Бродіння підтримується за температури близько 40°C. Індикатором для визначення закінчення бродіння є значення рН 4,7...4,6. Своїм характерним смаком йогурт зобов'язаний молочної кислоті, що отримується з лактози молока, і ацетальдегіду. Обидві ці речовини виробляються *L. bulgaricus*.

*Сироватка* – це побічний продукт сироваріння. Не так давно її відносили до відходів промисловості, але останнім часом у цій галузі намітилися зміни: все популярнішим стає використання сироватки

для виробництва підсолодошів за допомогою лактази. В Англії отримувані при цьому глюкозу і галактозу використовують у хлібопеченні, кондитерській промисловості і для виробництва морозива. Лактазу отримують із *Aspergillus niger*. Одержання цукрів із сироватки налагоджено як в США (*Corning/Kroger*), так і в Англії (*Corning/Dairy Crest*).

Із молочних продуктів найпростіше отримувати *масло*. Вершки використовують з концентрацією від 30...32 до 30...40% залежно від сорту масла, що виробляється. За їх збивання емульсія масла у воді перетворюється на емульсію води в маслі. При виробництві масла для поліпшення смаку і кращого збереження використовують особливі культури бактерій. Поліпшення смаку було досягнуто шляхом створення спеціальних штамів бактерій, що відібрані за здатністю синтезувати певні речовини, що впливають на смак. Першими для цієї мети були використані штами *Streptococcus lactis* і близьких видів, а потім – змішані культури, включаючи *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc citrovorum* і *L. dextranicum*.

Окрім поліпшення смаку, таким шляхом удається усунути деякі небажані присмаки. Перспективний спосіб доопрацювання масла заснований на додаванні ліпаз. Впровадження його дозволить пускати масло в продаж безпосередньо з маслоробки.

*Пахту* отримують за бродіння знятого або напівзнятого молока під дією суміші молочнокислих і споріднених ним бактерій. Зброджений продукт отримують зі свіжої пахти, а частіше зі знятого молока шляхом додавання закваски, що використовується за виробництва масла. Ця закваска є сумішшю молочнокислих стрептококів (*S. lactis* або *S. cremoris*) і утворюючих ароматичні речовини бактерій (*L. citrovorum* і *L. dextranicum*). Ті та інші бактерії необхідні для формування повноцінного смаку і запаху пахти; стрептококи при цьому домінують. Роль молочнокислих стрептококів у заквасці полягає в утворенні молочної кислоти (вона дає бажаний кислуватий смак), згортанні молока і зниженні рН до значень, за яких, створюючи ароматичні речовини, бактерії синтезують найбільшу кількість летких кислот.

*Сметана*. Її готують майже так само, як заброджену пахту. До вершків додають 0,5...1,0% заквасок, що використовуються за виробництва масла. Далі продукт витримують, поки концентрація кислоти не досягне 0,6%.

Серед інших ферментних молочних продуктів є *кумис*, який

отримують з кобилячого молока за допомогою молочнокислих бактерій (*Lactobacillus casei* й ін.), стрептококів і дріжджів, що зброджують лактозу, а також *вілія*, яку п'ють у Фінляндії.

**Приготування сиру.** Сир готують з отриманого в результаті згортання казеїну цільного або знежиреного молока. Згортання казеїну відбувається під впливом мікробних ферментів і молочної кислоти, або за допомогою сичужного ферменту. У згортанні беруть участь молочнокислі бактерії *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorus*. Внаслідок згортання білка кальцій відокремлюється від казеїну, останній випадає у вигляді пластівців водонерозчинної казеїнової кислоти. Для виготовлення різних видів сиру використовують овече, козине, коров'яче або кобиляче молоко. Залежно від технології сироваріння сироватку повністю або частково відокремлюють від сиру на фільтр-пресі. Сир засівають культурами мікроорганізмів відповідно до отриманого сорту. Процес приготування сиру починається з додавання до молока культури бактерій (одного або декількох видів). Щоб молоко згорнулося, до суміші додають протеолітичний фермент. Традиційно для цього використовували сичужний фермент, але останнім часом він все частіше замінюється мікробіологічними ферментами. Молоко, що згорнулося, відокремлюють від сироватки, пресують, щоб віджати частину води, і заготрають у тканину для висушування. У процесі твердіння продукту мікроорганізми ростуть на зовнішній поверхні сиру, забезпечуючи тим самим його смак і запах. Велика різноманітність сортів сиру пояснюється природою і властивостями мікробних культур, що є вихідними при згортанні молока, температурою виготовлення і наявністю або відсутністю вторинної мікробної флори, що зростає на сирі.

М'які сири містять 50...80% води і включають такі кінцеві продукти, як речовини, що з'являються у процесі дозрівання сиру за росту на його поверхні цвілі (*Penicillium*) і дріжджів. До таких сирів відносяться *бри* і *камамбер*. Напівм'які сири варять недовго, щоб зменшити вміст води до 45%. Деякі з них просочують розсолем, який індукує розмноження на поверхні дріжджів і бактерій. У твердих сирах не більше 40% води. Вони можуть містити лише бактеріальну флору (*чеддер*) або бути заражені спорами *Penicillium roquefortii*. Ріст цвілі в м'якоті сиру надає йому характерного смаку і аромату (*данський блакитний*, *горгонзола*, *рокфор*). За виготовлення сиру *грюєр* до молока додають пропіоновокислі бактерії: вони

виробляють двоокис вуглецю, через що утворюються дірки, характерні для сирів такого типу.

За дозрівання під впливом ферментів, що виділяються мікроорганізмами, хімічний склад і фізичні властивості сиру суттєво змінюються. Гострий присмак сиру Рокфор обумовлений дією мікробної ліпази – ферменту, що розщеплює жири молока з утворенням жирних кислот (капронової, каприлової, капринової й ін.) Дозрівання сиру триває від декількох тижнів до декількох місяців (для сиру Чеддер – 8 міс.). У перші тижні дозрівання кількість мікроорганізмів у масі сиру збільшується і досягає декількох сотень мільйонів на 1 г маси сиру, потім чисельність живих бактерій і дріжджів знижується. Сир повинен дозрівати за пониженої температури (для сиру Рокфор – не вище 9°C).

У виробництві молочнокислих продуктів важливим компонентом є закваска – чиста посівна культура. Цехові і заводські мікробіологічні лабораторії, а також галузеві науково-дослідні інститути безперервно стежать за чистотою і якістю заквасок.

**Молочний цукор.** За виробництва 1 т сиру утворюється 9 т сироватки і пахти. У кожній тонні сироватки міститься близько 5 кг високоякісного білка, вітаміни групи В, комплекс вільних амінокислот, усі найважливіші мінеральні елементи, у тому числі фосфор і кальцій. Але головною цінністю сироватки є лактоза. У 1 т сироватки міститься близько 50 кг молочного цукру – цінної сировини для харчової і мікробіологічної промисловості. Лактоза має низьку солодкість, але за дії на неї лактази розщеплюється на два моносахариди – глюкозу і галактозу.

У нас і за кордоном розроблено декілька біотехнологічних прийомів для раціонального використання сироватки і пахти. На вторинній молочній сировині можливо вирощувати культури кормових дріжджів, що володіють лактазною активністю (*Saccharomyces fragilis*, *Zygosaccharomyces lactis*, *Candida pseudotropicalis* й ін.). З цих дріжджів можна виділити лактазу. Дуже перспективним є виділення з депротейнізованої сироватки цукрів шляхом біогідролізу молочного цукру за допомогою іммобілізованої лактази. Ступінь конверсії молочного цукру становить 80%. Продукти гідролізу (глюкоза і галактоза) успішно застосовують у різних галузях харчової промисловості, наприклад, для приготування морозива. Додавання цих цукрів у морозиво перешкоджає кристалізації цукру, і його можна зберігати тривалий час (до 4 міс.).

## 8.4. Біотехнологія отримання змінених продуктів харчування

Мікроорганізми починали використовувати у виробництві білкових продуктів задовго до виникнення мікробіології. Досить згадати всілякі різновиди сиру, а також продукти, які отримуються шляхом ферментації соєвих бобів. І у першому, і в другому випадку поживною основою є білок. При виготовленні їх за участю мікробів відбувається глибока зміна властивостей білкововмісної сировини. У результаті отримують продукти харчування, які можна довше зберігати (сир) або зручніше споживати (соєвий сир). Мікроби потрібні й у виробництві деяких м'ясних продуктів, що призначені для зберігання. Так, при виготовленні деяких сортів ковбаси (*bologna, salami*) використовується кислотне бродіння, зазвичай за участю комплексу молочнокислих бактерій. Кислота, що утворилася, сприяє збереженню продукту і має вплив на формування його особливого смаку. Кислотоутворюючі бактерії використовуються і при засолюванні м'яса – ще одному способі консервації. Ряд блюд східної кухні отримують шляхом ферментації риби: для цього застосовують цвілеві гриби і дріжджі.

Починаючи з 1985 р. мікробний білок використовується також у харчовій промисловості для виготовлення різних блюд і напівфабрикатів. В Англії продають листові паштети з начинкою, схожою на вигляд і за смаком на яловичу. Новий продукт мікопротеїн виготовляють з гриба фузаріум. Він містить 45% білка і 13% рослинного жиру, тобто не поступається за поживністю деяким сортам м'яса. Міцелій так сплітається, що з'являється зовнішня аналогія з м'ясними волокнами. Фузаріум росте на всіх цукристих речовинах (відходи картоплі, фрукти, цукровий жом). Інші види харчового бродіння використовуються для поліпшення смаку і запаху продуктів харчування з одночасним підвищенням білкового вмісту в їжі. Вихідними продуктами для цих видів харчового бродіння є риба або соєві боби. Їх приготування і споживання особливо поширене в країнах Південно-східної Азії, де вони роблять суттєвий внесок до білкового компоненту харчування.

Наприклад, індонезійський темпех, що містить 55% білків, є щільним коржиком (шрот), виготовленим із соєвих бобів, арахісу або кокосових горіхів. З 1960 р. в США вивчалися різні стадії виробництва темпеху. Дослідження були спрямовані на підвищення

активності цвілі за цим бродінням і на поліпшення поживних якостей самого темпеха. Стейнкраус з агрономічного факультету Корнеллського університету і Хесселтайн з Сільськогосподарського дослідницького центру в Пеорії (шт. Іллінойс) першими почали дослідження в цьому напрямі. Потім відбулися інші експерименти, пов'язані з виробництвом дешевих і багатих на білок харчових продуктів, що засновані на місцевій сировині.

Виробництво темпеха потребує два-три дні. Спочатку соєві боби на 12 год. занурюють у воду і лушать (у Індонезії традиційно прийнято давити соєві боби в бамбукових кошиках, після чого їх промивають для видалення лушпиння). Соєві боби кип'ятять протягом півгодини, щоб зруйнувати інгібітори трипсину шлункового соку і гормону росту (ці два інгібітори роблять сирі соєві боби неїстівними для людини). Боби кілька разів промивають і висушують. Потім проводиться засів спорами цвілі *Rhizopus oligosporus*, які вводяться до маси, що розкладена на підносах або листах банана, або тикучу (коли темпех виготовляють у сільській місцевості). Засів, зазвичай, проводять залишками від попередньої порції темпеха. Бродіння триває 36...38 год. за температури 31°C. У результаті виходить компактний світло-коричневий шрот, що складається з бобового пюре і філаментів гриба *Rhizopus*. Темпех зазвичай споживають відразу після виготовлення або добре обсмажують у кокосовій олії. У процесі гідролізуються  $\alpha$ -галактозиди і 30% тригліцеридів; при цьому вивільняється цінна лінолева кислота у кількості 2,5 г/100 г, хоча сумарний вміст жирів у темпеху не відрізняється від соєвих бобів, тобто становить близько 20...26% сухої маси. Вміст білка збільшується, досягаючи 50..55% сухої маси порівняно з 40...43% в соєвих бобах (вміст розчинного азоту зростає з 0,5 до 2%, оскільки значна частина білків під дією протеолітичних ферментів цвілі розпадається на амінокислоти), рН зростає з 5 до 7,6.

Бродіння – високоякісний процес: із 100 г сирих соєвих бобів виходить лише трохи менше темпеха, який не без підставно вважають за високопоживну і легкозасвоювану їжу. До його складу входить рибофлавін, нікотинова кислота, причому їх концентрація в два і п'ять разів, відповідно, перевищує концентрацію цих вітамінів у соєвих бобах. Темпех, приготовлений традиційним шляхом, містить також цианокобаламін, що синтезується бактеріями, а не цвіллю. Ці бактерії відсутні в ході контрольованого в лабораторії виробничого процесу, в результаті там отримують темпех, позбавлений



цианокобаламіну.

Промислове або напівпромислове виробництво темпеха проходить ті ж стадії, що і традиційний процес. Це гарантує не лише максимальний вміст цінних харчових компонентів, а і видалення шкідливих або інгібуючих речовин із соєвих бобів.

У центральних районах Яви з копрових шротів за допомогою тієї ж цвілі, що використовується при отриманні темпеха (*R. oligosporus*), готують бонгкрек. У західній частині Яви для приготування двох видів продукту онтьєм використовуються шроти із земляного горіха. Один із цих продуктів темно-коричневий або чорний і містить *Rhizopus*, інший – червоного кольору і містить *Neurospora sitophila*. Забруднення бонгкрека або онтьєма бактеріями (*Pseudomona*) або цвіллю (*Aspergillus flavus*) викликає накопичення надзвичайно небезпечних токсинів (токсофлавіну і афлатоксину). Дослідження, що проводяться в Сільськогосподарському університеті і Дослідницькому інституті харчування міста Богор, спрямовані на вдосконалення виробничих процесів, що пов'язані з отриманням цих харчових продуктів, і на контроль мікробного забруднення.

Американські учені пристосували виробничий процес отримання індонезійського темпеху для хлібних злаків і маніоки. Вони звернули увагу на те, що пшениця, що ферментується тією ж цвіллю *R. oligosporus* протягом 20 год. за температури 31°C, перетворюється на продукт, що містить у 6...7 разів більше білка, в 5 разів більше рибофлавіну і в 2 рази більше нікотинової кислоти за звичайну пшеницю. *R. oligosporus* виробляє малоамілаз, тому пшеничний крохмаль не гідролізується і не відбувається спиртового бродіння.

Індонезійський темпех та його різновиди, що готуються з арахісу і кокосових горіхів, – це високопоживні продукти, що отримуються традиційними способами. Вони заслуговують на значне розповсюдження за межами своїх регіонів, оскільки в них містяться білки, вітаміни і необхідні жирні кислоти високої концентрації, натомість майже немає насичених жирів; крім того, вони прості в приготуванні й дешеві.

Серед інших східних блюд, що одержують ферментацією, можна виділити японське місо, що виготовляється з цілих соєвих бобів, які ферментуються *Aspergillus oryza*; китайське суфу – продукт, отриманий за вирощування на заквасці з соєвих бобів декількох видів цвілі, переважно *Mucor*, що нагадує сир; китайський ангкак, за

приготування якого рис уражується цвільлю *Monascus purpureus*, що додає йому червоного кольору.

Соевий соус готували багато століть назад у Китаї та пізніше завезли в інші країни Далекого Сходу, зокрема до Японії, яка в даний час є його основним виробником. Соевий соус отримують зброджуванням осолодженої суміші соєвих бобів і пшениці *Aspergillus oryzae*. Проміжний продукт, так званий койя, поміщають у посудину з рівним об'ємом розчину солі, щоб отримати масу – моромі. Моромі бродить у великих цистернах упродовж 8...12 місяців за низької температури при періодичному перемішуванні. У бродінні беруть участь бактерії *Pediococcus soyaе* і дріжджі *Saccharomyces rouxii*. Їх спеціально додають до моромі у вигляді вихідних культур або вони розмножуються в моромі з клітин, що вже є там. У результаті бродіння моромі збагачується молочною та іншими кислотами і етанолом. Після закінчення процесу моромі віджимають і екстрагований соєвий соус розфасовують. Шрот, що залишається при цьому, часто згодовують домашнім тваринам.

Використання харчових продуктів, отриманих методом бродіння, все більше поширюється. Значна кількість досліджень пов'язана з удосконаленням технології бродіння і поширенням її застосування.

Для виробництва харчових продуктів може бути використана целюлоза або відходи лігноцелюлози, такі як солома, пшеничні або рисові висівки. Одним з напрямків є вирощування грибів на рисовій та пшеничній соломі і відходах бововни. Вміст білка в грибах становить 30...47% сухої речовини. На одному кілограмі соломи вирощується до 1,25 кг грибів. Тобто бродіння використовується для перетворення відходів лігноцелюлози в продукти харчування людини.

Безпосередня утилізація відходів з метою отримання продуктів харчування для людини є найбільш ефективною, оскільки вимоги до охорони навколишнього середовища все підвищуються і використання побічних продуктів стає економічно корисним. У перспективі з'являється можливість створення безвідходного виробництва у цілому – ідеального сучасного способу переробки сільськогосподарської продукції.

Значні проблеми пов'язані з рідкими відходами молочних заводів, що містять 1...4% відпрацьованого молока. Багато уваги приділяється сироватці. Найпростіша техніка утилізації сироватки

полягає в отриманні порошку шляхом випарування у випарниках з наступним сушінням. Одним із шляхів утилізації сироватки є розподіл її на два основні компоненти: білок і лактозу за допомогою ультрафільтрації і зворотного осмосу, з подальшим використанням кожного з компонентів. З білків отримують дієтичні суміші для харчування, а лактозу за рахунок ферментації перетворюють на низькокалорійний підсолоджувач.

Регенерація поживних компонентів рідких відходів м'ясного і молочного виробництва за допомогою йонообмінників дає можливість не лише очистити стоки, а й отримати додатково 2..5% білку з сироватки, залишків з бойні, в тому числі й желатин. Використання сучасних методів біотехнології створює умови для перетворення відходів, що отримують при забої тварин, у харчові продукти з новими смаковими якостями. За їхнього виробництва застосовують протеази, в першу чергу папаїн, що розм'якшує волокна і створює певну консистенцію продукту. Постійно збільшується використання крові в харчових продуктах, як звичайних, наприклад, кров'яна ковбаса, так і як компонента менш цінних високобілкових поживних добавок. За допомогою біотехнологічних процесів відбувається утилізація колагеновмісних матеріалів (наприклад, залишки епідермісу і шкіри). Кісткове борошно використовують для виготовлення желатину, який є наповнювачем, зв'язуючою речовиною, що зберігає вологу і підтримує текстуру харчового продукту. Колаген, що отримують із шкір, з успіхом замінює кишки тварин у виробництві їстівної оболонки для ковбас.

## *Контрольні запитання*

1. У чому полягають переваги мікробіологічного методу отримання ферментів?
2. Які переваги та недоліки має поверхневий метод ферментації?
3. Які причини стримували поширене використання ферментів до останнього часу?
4. Які існують основні методи іммобілізації ферментів?
5. Які продукти отримують в харчовій промисловості завдяки іммобілізованим ферментам?
6. Які ферменти використовуються молочною промисловістю?
7. Які молочнокислі продукти виготовляють за допомогою біотехнологічного виробництва?
8. Які харчові продукти виробляють із мікробного білка?

## РОЗДІЛ 9

### ТЕХНОЛОГІЧНА БІОЕНЕРГЕТИКА

Необхідність розробки нових і ефективних способів виробництва енергетичних носіїв і заповнення сировинних ресурсів стала особливо актуальною в останні десятиліття через відчутний дефіцит сировини і енергії в глобальному масштабі та підвищення вимог до екологічної безпеки технологій.

Підвищений інтерес до технологічної біоенергетики – науки про шляхи і механізми трансформації енергії в біологічних системах, обумовлений багатьма причинами. Енергоозброєність є фактором, що визначає рівень розвитку суспільства. Останнім часом для порівняння ефективності тих або інших процесів і технологій все частіше вдаються до енергетичного аналізу, що набагато раніше використовується в екології. Основним завданням енергетичного аналізу є планування таких методів виробництва, які забезпечують найбільш ефективно споживання викопних і поновлюваних енергоресурсів, а також охорону навколишнього середовища. За історію розвитку людського суспільства споживання енергії, з розрахунку на одну людину, зросло більш ніж у 100 разів. Через кожних 10...15 років світовий рівень споживання енергії практично подвоюється. В той же час запаси традиційних джерел енергії – нафти, вугілля, газу виснажуються. Крім того, спалювання викопних видів палив призводить до наростаючого забруднення навколишнього середовища. Тому стає дуже важливим отримувати енергію екологічно чистими технологіями. Невичерпним джерелом енергії на Землі є Сонце. Щороку на поверхню Землі з сонячною енергією поступає  $3 \times 10^{24}$  Дж енергії. В той же час запаси нафти, вугілля, природного газу і урану, що розвідані, за оцінками еквівалентні  $2,5 \times 10^{22}$  Дж, тобто менш ніж за один тиждень Земля отримує від Сонця таку ж кількість енергії, що міститься у всіх запасах. Щороку у процесах фотосинтезу утворюється понад 170 млрд. т сухої речовини, а кількість енергії, що пов'язана з нею, більш ніж у 20 разів перевищує нинішнє річне енергоспоживання. Проте виникає питання, чи здатна енергетика, що заснована на використанні сонячного випромінювання, забезпечити всезростаючі енергетичні потреби

суспільства. У глобальному масштабі сонячна енергетика здатна забезпечити сучасний і майбутній рівень енерговитрат людства. Так, величина сонячної енергії, що падає на неосвоєні території, наприклад, пустелі (близько  $2 \times 10^7$  км<sup>2</sup>), становить близько  $5 \times 10^{18}$  кВт/ч. При освоєнні цієї енергії хоча б з 5% к.к.д. рівень світового виробництва її можливо збільшити у 200 разів. Таким чином, за можливого народонаселення в 10 млрд. чоловік отримання енергії лише з поверхні зони пустель у 10...12 разів перевищуватиме енергетичні потреби людства. При цьому передбачається зростання енергоспоживання з розрахунку на душу населення в 5 разів порівняно з існуючим рівнем.

Принципово важливе також освоєння сонячної енергії, що падає на поверхню морів і океанів. При цьому первинний процес перетворення сонячної енергії відбувається за рахунок синтезу біомаси фітопланктону; вторинний процес є конверсією біомаси в метан і метанол. Плантації мікроводоростей за оцінками фахівців є найбільш продуктивними системами: 50...100 т/га в рік. Рослинний покрив Землі становить понад 1800 млрд. т сухої речовини, що утворена в процесах фотосинтезу лісовими, трав'яними і сільськогосподарськими екосистемами. Суттєва частина енергетичного потенціалу біомаси використовується людиною. Для сухої речовини простим способом перетворення біомаси в енергію є згорання, в процесі якого виділяється тепло, яке далі перетворюється на механічну або електричну енергію. Сира біомаса також може бути перетворена на енергію в процесах біометаногенеза і отримання спирту.

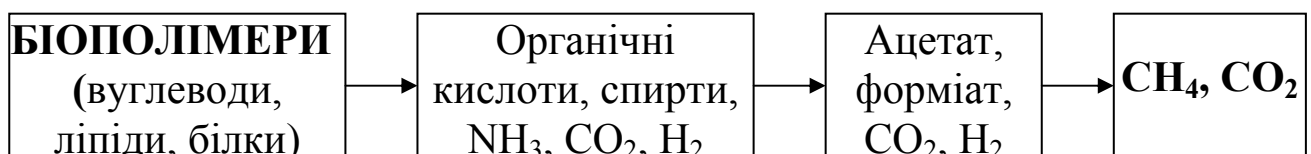
Наукові й аналітичні дослідження останніх десятиліть дозволяють зробити висновки, що найбільш ефективними і обнадійливими для великомасштабного перетворення сонячної енергії є методи, засновані на використанні біосистем. Серед цих методів – досить добре освоєні біологічні технології перетворення біомаси в енергоносії у процесах біометаногенеза.

## 9.1. Біометаногенез

Біометаногенез або метанове бродіння – давно відомий процес перетворення біомаси на енергію. Відкрив цей процес у 1776 р. А. Вольта, який установив наявність метану в болотному газі. Біогаз,

що отримується з органічної сировини у процесі біометаногенезу в результаті розкладання складних органічних субстратів різної природи за участю змішаної з різних видів мікробної асоціації, є сумішшю з 65...75% метану і 20...35% вуглекислого газу, а також незначної кількості сірководню, азоту, водню. Теплотворна здатність біогазу залежить від співвідношення метану та вуглекислого газу і становить 5...7 ккал/м<sup>3</sup>; 1 м<sup>3</sup> біогазу еквівалентний 4 квт/год. електроенергії, 0,6 л керосину, 1,5 кг вугілля і 3,5 кг дров. Неочищений біогаз використовують у побуті для обігрівання житла і приготування їжі, а також застосовують як паливо в стаціонарних установках, що виробляють електроенергію. Компримований (від лат. *comprimete* стискати) газ можна транспортувати і використовувати (після попереднього очищення) як пальне для двигунів внутрішнього згорання. Очищений біогаз аналогічний природному газу. У процесах біометаногенезу вирішується не лише проблема відтворення енергії, – ці процеси надзвичайно важливі в екологічному плані, оскільки дозволяють вирішувати проблему утилізації та переробки відходів різних виробництв і технологій, сільськогосподарських і промислових, а також побутових, включаючи стічні води і тверде сміття міських звалищ.

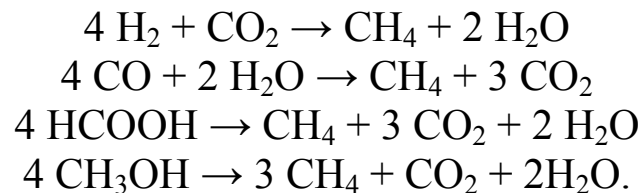
У складних процесах деструкції органічних субстратів і утворення метану бере участь мікробна асоціація різних мікроорганізмів. У асоціації присутні мікроорганізми-деструкції, що викликають гідроліз складної органічної маси з утворенням органічних кислот (масляної, пропіонової, молочної), а також нижчих спиртів, аміаку, водню; ацетогени, що перетворюють ці кислоти на оцтову кислоту, водень і оксиди вуглецю і, нарешті, власне, – метаногени – мікроорганізми, що відновлюють воднем кислоти, спирти і оксиди вуглецю в метан:



Деструкцію органічної маси і утворення кислот викликає асоціація облигатних і факультативних анаеробних організмів, серед яких гідролітики, кислотогени, ацетогени та ін.; це представники родів: *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilaceae*, *Sterptococcaceae*, *Clostridium*, *Butyrvibrio*. Активну роль у деструкції органічної маси відіграють целюлозоруйнуючі мікроорганізми, оскільки рослинні

біомаси, що залучаються до процесів біометаногенезу, характеризуються високим вмістом целюлози (лігнінцелюлози). У перетворенні органічних кислот на оцтову суттєву роль відіграють ацетогени – спеціалізована група анаеробних бактерій.

Метаноутворюючі бактерії (архебактерії), каталізують відновні реакції, що призводять до синтезу метану. Субстратами для реалізації цих реакцій є водень і вуглекислий газ, а також оксид вуглецю і вода, мурашина кислота, метанол та ін.:

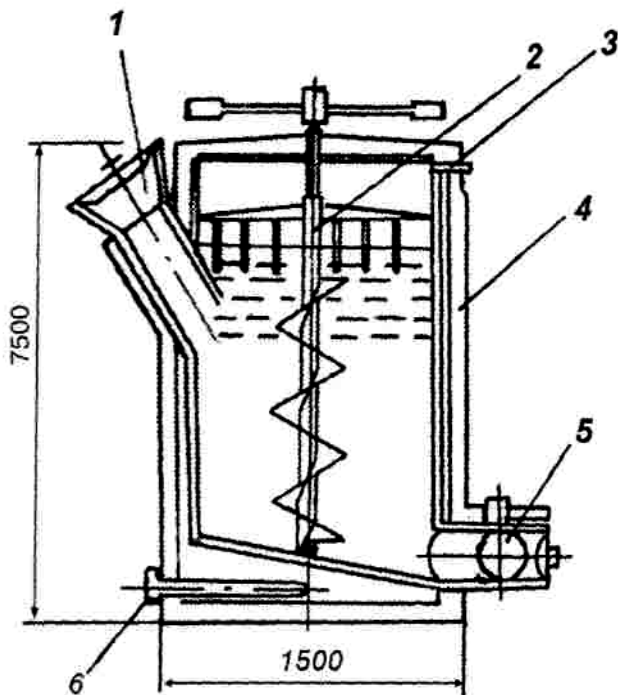


Незважаючи на те, що метаноутворюючі бактерії виділені й описані лише в середині 80-х рр. минулого століття, їх виникнення відносять до Архею і вік оцінюють в 3,0...3,5 млрд. років. Ці мікроорганізми досить широко розповсюджені в природі в анаеробних зонах, і разом з іншими мікроорганізмами активно беруть участь в деструкції органічних речовин з утворенням біогазу, в морських осіданнях, болотах, річкових і озерних мулах. До теперішнього часу в чистій культурі виділено і описано близько 30 метаноутворюючих бактерій; список цей безперервно поповнюється. Найбільш вивченими є: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkerii*, *Methanobrevibacter ruminantium*. Усі метаногени – суворі анаероби; серед них зустрічаються як мезофільні, так і термофільні форми; гетеротрофи і автотрофи. Особливістю метаноутворюючих бактерій є також здатність активно розвиватися в тісному симбіозі з іншими групами мікроорганізмів, що забезпечують метаногенам умови і субстрати для утворення метану.

У процесах метаногенезу можливо переробити найрізноманітнішу сировину – різну рослинну біомасу, включаючи відходи деревини, неїстівні частки сільськогосподарських рослин, відходи переробної промисловості, спеціально вирощені культури (водяний гіацинт, гігантські бурі водорості), рідкі відходи сільськогосподарських ферм, промислові і побутові стоки, мул очисних споруд, а також сміття міських звалищ. Важливо, що сировина з високим вмістом целюлози, що важко піддається методам переробки, також ефективно зброджується і трансформується в біогаз.



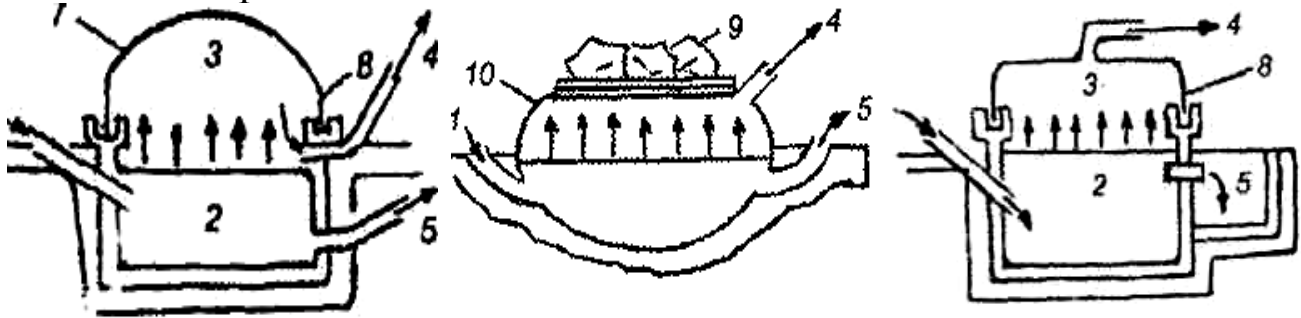
Установки для біометаногенезу з урахуванням їх об'ємів і продуктивності можна підрозділити на декілька категорій: реактори для невеликих ферм сільської місцевості (1...20 м<sup>3</sup>); реактори для ферм розвинених країн (50...500 м<sup>3</sup>); реактори для переробки промислових стоків – спиртової, цукрової промисловості (500...10000 м<sup>3</sup>) і реактори для переробки твердого сміття міських звалищ (1...20×10<sup>6</sup> м<sup>3</sup>). Метанотенки, що виготовлені з металу або залізобетону, можуть мати різноманітну форму, в тому числі кубічну і циліндрову. Конструкції і деталі цих установок дещо варіюють, головним чином, це пов'язано з типом сировини, що переробляється. Існує величезна різноманітність установок для реалізації процесу метаногенезу, конструкційні деталі і компонування яких визначається пріоритетністю завдання, що вирішується в конкретному процесі: або це утилізація відходів і очищення стоків, або отримання біогазу необхідної якості (рис. 71).



**Рис. 71. Схема індивідуальної біогазової установки ІБГУ-1 (за Герасименком В.Г., 2006):**  
 1 – заливна горловина;  
 2 – мішалка;  
 3 – патрубок для відбору газу;  
 4 – теплоізоляційний прошарок;  
 5 – патрубок з краном для вивантаження переробленої маси;  
 6 – термометр.

Простою конструкцією метанотенка є звичайна бродильна яма в ґрунті з фіксованим об'ємом газу (рис. 72). Метанотенк є герметичною ємністю, частково зануреною в ґрунт для теплоізоляції і забезпеченою пристроями для дозованої подачі та підігрівання сировини, а також газгольдером – ємністю змінного об'єму для збору газу. Дуже важливим у конструкції метанотенків є забезпечення необхідного рівня перемішування дуже гетерогенного вмісту апарату. Разом із тим відомо, що максимальне виділення метану

спостерігається в системах із слабким перемішуванням. Тому на відміну від процесів аеробів, що потребують інтенсивної аерації і перемішування, перемішування при метаногенезі, головним чином, має забезпечувати гомогенізацію маси, що зброджується, перешкоджати осіданню твердих часток і утворенню твердої плаваючої кірки.



**Рис. 72. Схеми простіших біогазових установок:**

1 – подача органічних відходів; 2 – ємність для органічних відходів; 3 – місце накопичення газу під куполом; 4 – патрубок для відведення газу; 5 – відведення мулу; 7 – купол з поліетиленової плівки; 8 – водяна ступка; 9 – вантаж; 10 – цільноскроєний поліетиленовий мішок (за Герасименком В.Г., 2006).

Залежно від типу вихідного матеріалу, що зброджується в метанотенку, інтенсивність процесу, включаючи швидкість подачі і повноту переробки, а також склад біогазу, що створений, суттєво варіюють. За переробки рідких відходів тваринницьких ферм співвідношення між твердими компонентами і водою в завантажуваній масі повинно бути приблизно 1:1, що відповідає концентрації твердих речовин від 8 до 11% за вагою. Суміш матеріалу зазвичай засівають ацетогенними і метаноутворюючими мікроорганізмами з відстою зброженої маси від попереднього циклу або іншого метанотенка. Температура і, отже, швидкість протікання процесу залежать від виду метаногенів, що використовуються. Для термофільних організмів процес реалізується за температури 50...60°C, для мезофільних – 30...40°C і близько 20°C – для психрофільних організмів. За підвищеної температури швидкість процесу в 2...3 рази вища порівняно з мезофільними умовами.

У ході зброжування органічної маси на першій, так званій кислотній, фазі внаслідок утворення органічних кислот рН середовища знижується. За різкого зрушення рН середовища в кислий бік можливо інгібування метаногенів. Тому процес проходить за рН 7,0...8,5. Проти закислення використовують вапно.

Зниження рН середовища є своєрідним сигналом, що свідчить про те, що процес деструкції органіки з утворенням кислот закінчений, тобто в апарат можна подавати нову партію сировини для переробки. Оптимальне співвідношення C:N в органічній масі, що переробляється, буде в діапазоні 11...16:1. Зміна співвідношення C:N у вихідному матеріалі у бік збільшення вмісту азоту призводить до виділення аміаку до середовища і залужуванню. Тому рідкі гнойові відходи, багаті азотовмісними компонентами, розбавляють різаною соломною або різними жомами.

Процеси, що протікають під час метанового бродіння, ендотермічні й потребують підведення енергії у вигляді тепла ззовні. Для підігрівання сировини, що завантажена, і стабілізації температури процесу на необхідному рівні зазвичай спалюють частку утворюваного біогазу. Залежно від температури процесу кількість біогазу, що йде на обігрівання процесу, може досягати 30% від об'єму отриманого.

Швидкість надходження сировини на переробку або час утримання сировини в апараті є важливими і контрольованими параметрами. Чим інтенсивніший процес бродіння, тим вища швидкість загрузування і менший час утримання. Однак, важливою умовою стабільності процесу біометаногенезу, як і будь-якої проточної системи культивування, є збалансованість потоків субстрату із швидкістю розмноження продуцента. Швидкість подачі субстрату в метанотенк має бути рівною швидкості росту бактерій метанового співтовариства, при цьому концентрація субстрату (за органічною речовиною) повинна стабілізуватися на рівні не нижче 2%. За зменшення концентрації субстрату щільність бактеріального співтовариства знижується, і процес метаногенезу сповільнюється. Найбільший вихід продукції забезпечується вищою швидкістю подачі субстрату, що у свою чергу потребує стабілізації в апараті достатньо високої концентрації мікроорганізмів. При цьому можливі ускладнення процесу, які залежать від характеру органіки, що переробляється. Якщо в матеріалі, що переробляється, міститься багато важкорозчинних речовин, у реакторі можливе накопичення незруйнованих твердих речовин (до 80% осідання). За великої кількості розчинної і легкодоступної органіки утворюється багато мікробної біомаси у вигляді активного мулу (до 90% осідання), який важко утримати в реакторі. Для вирішення цих питань існує декілька способів. Можливе застосування хімічного або ферментативного

гідролізу вихідної сировини, окрім її механічного подрібнення; організація в метанотенке оптимального перемішування сировини, що подається, з активним мулом; перемішування осаду та ін.

Норми загрузування сировини в існуючих процесах метаногенезу коливаються в межах 7...20% об'єму субстрату від об'єму біореактора за добу. Циклічність процесу – 5...14 діб. Звичайний час зброджування тваринницьких відходів становить біля 2-х тижнів. Рослинні відходи переробляються довше (20 діб і більш). Найважчі для переробки тверді відходи, тому цей процес триваліший.

Внаслідок модифікації й удосконалення його можливо суттєво змінити швидкість потоку сировини через метанотенк. Циклічність процесу може бути скорочена до 5...15 год. за збільшення швидкості загрузування до 150...400% від загального добового об'єму. Інтенсифікувати процес можна шляхом використання термофільних бактерій і підвищення температури процесу, але це потребує відповідних додаткових енерговитрат. Підвищити ефективність метаногенів у метанотенку можна за використання так званих анаеробних біофільтрів, або метанотенків другого покоління. В анаеробному біофільтрі мікроорганізми перебувають в іммобілізованому стані. Як носій можна використовувати галечник, керамзит, скловолокно й ін. У таких конструкціях стає можливим зброджування матеріалу при суттєво меншій величині поточної концентрації субстрату (0,5% сухих речовин) за великих швидкостей. Це дозволяє підвищити інтенсивність деструкції відходів за зменшення об'ємів реакторів. Ефективне також просторове розподілення процесу відповідно до характерної для нього, з точки зору хімізму, двофазності. Процес реалізується в двох, з'єднаних послідовно реакторах. У першому апараті відбувається процес анаеробного розкладання органіки з утворенням кислот, оксидів вуглецю і водню (кислотна стадія). Параметри процесу бродіння в апараті задаються на рівні, що забезпечує необхідний вихід кислот і рН культури не вище 6,5. Отримана маса надходить у другий апарат, в якому відбувається процес утворення метану. В такій системі можна незалежно варіювати умови ферментації (швидкість потоку, рН, температуру) в кожному апараті з урахуванням створення оптимальних умов для розвитку мікроорганізмів деструкцій у першому і метаногенів – у другому. В цілому застосування такої біосистеми дозволяє інтенсифікувати процес у 2...3 рази.

Інтенсифікувати процес стало можливим також в результаті застосування більш активних метаногенних мікроорганізмів. Наприклад, дослідниками японської фірми «Мацусита електрик індастріал К<sup>о</sup>» виведено масову культуру виявленої ними бактерії *Methanobacterium kadomensis* St. 23, яка завершує процес зброджування і метаногенезу не за 15...20, а за 8 діб.

Теоретично метаноутворюючі бактерії в процесах синтезу метану до 90...95% використововуваного вуглецю перетворюють на метан і лише близько 5...10% залучають до утворення біомаси. Завдяки такому високому ступеню конверсії метаногенами вуглецю в метані, до 80...90% вихідної органічної маси, що переробляється в процесах зброджування і метаногенезу, перетворюється на біогаз. Теоретично співвідношення вуглекислого газу і метану в біогазі має бути майже рівним. Однак, далеко не весь вуглекислий газ, що виділяється в процесах бродиння, міститься в газовій фазі, частка його розчиняється в рідкій фазі з утворенням бікарбонатів. Концентрація бікарбонату в свою чергу, як і об'єм вуглекислого газу, що утворився в цілому, значною мірою залежить від вмісту в сировині, що переробляється, більш менш окислених речовин: субстрати, що більше окислені, забезпечують більше утворення кислих продуктів і, отже, більший вихід CO<sub>2</sub> в біогазі; більш відновлені – H<sub>2</sub>, отже, і більший вихід CH<sub>4</sub>. Співвідношення CO<sub>2</sub> і CH<sub>4</sub>, що реально досягаються у виробничих процесах, в біогазі суттєво варіюють. Це визначає калорійність одержаного біогазу, яка також варіює від 5 до 7 ккал/м<sup>3</sup>. Залежно від типу сировини та інтенсивності процесу біометаногенезу вихід біогазу коливається від 300 до 600 м<sup>3</sup>/т органічної маси за виходом метану від 170 до 400 м<sup>3</sup>/т. Глибина переробки субстрату при цьому може бути від 20 до 70%. Рідкий або твердий шлам, що утворюється в процесах метаногенезу, вивозиться на поля і використовується як добрива. Дане застосування обумовлене процесами метаногенерації, за якої патогенні ентеробактерії, ентеровіруси, а також паразитарні популяції (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma*) практично повністю гинуть. Твердий залишок процесу (або активний мул) може бути використаний також як вихідна сировина для отримання ряду біологічно активних сполук у процесах хімічного гідролізу або мікробіологічного синтезу.

Екологічна безпека застосування і калорійність біогазу в поєднанні з простотою технології його отримання, а також величезна кількість відходів, що підлягають переробці, – все це є позитивним

фактором для подальшого розвитку і поширення біогазової промисловості. Поштовхом до створення даного ефективного біотехнологічного напрямку була енергетична криза, що вибухнула в середині 70-х рр. минулого століття. Виробництво біогазу стало одним з основних принципів енергетичної політики низки країн Тихоокеанського регіону. Уряд Китаю приділив багато уваги і вклав багато коштів у становлення біогазової промисловості, особливо в сільській місцевості. У рамках національної програми були створені умови для появи мережі заводів, що випускають біогазові установки. Уряд заохочував цей напрям і пішов навіть на створення системи регіональних і місцевих закладів, що відповідають за біогазову програму. Державні банки надавали населенню пільгові позики і матеріали для будівництва установок. І вже у 1978 р., через три роки після ухвалення програми, в країні функціонувало понад 7 млн. установок, що в 15 разів перевершувало рівень 1975 р. За рік вироблялося близько 2,6 млрд. м<sup>3</sup> біогазу, що еквівалентно 1,5 млн. т нафти. На початку 80-х рр. в Китаї вироблялося до 110 млрд. м<sup>3</sup> біогазу, що еквівалентно 60...80 млн. т сирової нафти, а в середині – створено до 70 млн. установок, які приблизно у 70% селянських сімей задовольняли побутові потреби в енергії. В Індії також велика увага була приділена отриманню енергії в процесах біометаногенезу за утилізації сільськогосподарських відходів.

Будівництво біогазових установок почалося на Філіппінах, в Ізраїлі, країнах Латинської Америки. Інтерес до даної технології в середині 80-х рр. посилювався також в країнах центральної Європи, особливо ФРН і Франції. Французьким Комісаріатом із сонячної енергії в середині 90-х рр. було виділено 240 млн. франків на створення і поширення біогазових установок у сільській місцевості. Французьким дослідницьким інститутом прикладної хімії було доведено, що за утилізації і переробки гною сільськогосподарських ферм можливо повністю забезпечити потреби в енергії комплексу із 30 голів великої рогатої худоби або 500 свиней. У середині 90-х рр. в країнах Європейської економічної спільноти функціонувало близько 600 установок з виробництва біогазу з рідких сільськогосподарських відходів і близько 20 таких, що переробляють тверде міське сміття. У передмістях Нью-Йорка установка з переробки вмісту міського звалища виробляє до 100 млн. м<sup>3</sup> біогазу за рік. Інтегровані національні програми багатьох країн Африки і Латинської Америки, що мають величезні кількості сільськогосподарських відходів (понад

90% світових відходів цитрусових, бананів і кави, близько 70% відходів цукрового жому і до 40% відходів світового поголів'я худоби), в даний час орієнтовані на отримання біогазу.

З метою збільшення внеску біопалив та інших поновлюваних джерел енергії у загальні потреби в паливі та енергії в Європейському Союзі прийнято Білу книгу «Енергія майбутнього поновлюваних джерел енергії». Вона остаточно підтверджує, що головною причиною інтенсивного використання поновлюваних джерел енергії в ЄС є зростання енергетичного споживання. Прогнозується до 10% поновлюваних джерел енергії в паливно-енергетичному балансі ЄС у 2020 році. До 2010 року частка поновлюваних джерел у виробництві електричної енергії в ЄС зросте з 14,3 до 23,5%.

В Україні обсяг можливого енергопотенціалу за рахунок використання відновлюваних ресурсів біомаси становить близько 22 млн.т/рік, з яких технічно доступний енергетичний потенціал оцінюється в 13,2 млн.т/рік; це приблизно 7% загального використання первинних енергоресурсів в Україні.

Свого часу в сфері створення біогазових установок в Україні було досягнуто значних успіхів, розроблено технологічні режими і способи отримання біогазу та добрив з відходів тваринництва, розроблено конструкції БГУ різного типу. Однак належного широкого розвитку ці розробки не дістали, за деяким винятком, зокрема, й перевищуючу на той час вітчизняні й зарубіжні аналоги за багатьма показниками установку «Біогаз» у м. Нікополі Дніпропетровській області.

Заплановано також будівництво великих біогазових установок (з об'ємом метантенка від 800 м<sup>3</sup> і вище), що входить до концепції розвитку біоенергетики в Україні.

Промислове виробництво біопалив в нашій країні стимулюють прийняті законодавчі акти (Указ Президента України № 1094/2003 від 23 вересня 2003 року та інші). Цьому повинні відповідати нові технології і техніка, що одночасно покликані скорочувати шкідливі впливи антропогенного походження на навколишнє середовище. Крім того, це сприятиме дотриманню Україною (яка 04.02.2004 року ратифікувала Кіотський протокол) вимог щодо екологічного стану довкілля відповідно до Рамкової Конвенції ООН про зміну клімату.

Практичне значення методу анаеробної переробки відходів на біогаз не можна оцінювати тільки за наявністю або відсутністю інших джерел енергії в даній країні. Можна погодитися з думкою, що біогаз

з відходів не здатний конкурувати з нафтою або природним газом у розвинених країнах. Однак в цих країнах є інші проблеми, які вирішуються за допомогою метанового бродіння.

Очищення і переробка будь-яких відходів тваринництва можливі лише за допомогою метанового бродіння. Тому питання використання метанового бродіння актуальне для всіх країн, незалежно від їх енергозабезпечення.

### ***Контрольні запитання***

1. Чому процес отримання біогазу вважають майже безвідходною технологією?
2. Які продукти, окрім біогазу, можна отримати наприкінці процесу?
3. Чому перетворення біогазу на електроенергію вважають ефективним способом його використання?
4. Які екологічні проблеми вирішуються за допомогою процесу отримання біогазу?
5. У чому полягає перевага анаеробних процесів, що здійснюються за допомогою термофільних метанутворюючих бактерій?



## РОЗДІЛ 10

# ГЕННО-МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ (ГМО) І БІОБЕЗПЕКА

Перші генно-інженерні сорти сільськогосподарських рослин з'явилися у виробництві у 1992 році. За минулий період вони показали свою високу ефективність, перевагу перед сортами, створеними за допомогою традиційної селекції. Площі під ними нестримно розширюються. Однак, слід розглянути потенціальні ризики для здоров'я людини і навколишнього середовища, що можуть бути з ними пов'язані, визначити, як їх можна оцінити і попередити створити безпеку генно-інженерній діяльності (біобезпеку).

В наш час генно-модифіковані (ГМ) сорти кукурудзи, сої, олійного ріпаку та бавовни активно культивують у ряді країн, а продукція, що при цьому одержується, поставляється на світовий ринок. Крім того, ГМ сорти папайї, картоплі, рису, гарбуза і цукрового буряку вже потрапили на ринок або є на різних стадіях випробувань. За оцінками експертів, у глобальному масштабі ГМ культури вирощуються приблизно на 4% всіх оброблюваних земель у світі.

Згідно з визначенням *Codex Alimentarius Commission (CAC)*, **сучасна біотехнологія** – це застосування таких *in vitro* методик:

- 1) робота з нуклеїновими кислотами, у тому числі отримання рекомбінантної ДНК і введення нуклеїнових кислот безпосередньо всередину клітин або органелл;
- 2) злиття клітин організмів, що належать до різних таксономічних груп, які дозволяють подолати природні фізіологічні репродуктивні або рекомбінаційні бар'єри і не є методиками, що традиційно використовуються за схрещування та селекції.

Особлива увага в роботі приділяється застосуванню підходів сучасної біотехнології (особливо методу рекомбінантних ДНК) до організмів, що використовуються для виробництва продуктів харчування.

Застосування сучасної біотехнології у виробництві продуктів харчування відкриває нові можливості й порушує питання, що

стосуються здоров'я та розвитку людини. Метод рекомбінантних ДНК – найбільш відомий підхід, що використовується сучасною біотехнологією, – дозволяє генетично модифікувати рослини, тварин і мікроорганізми, наділяючи їх якостями, отримати які неможливо за допомогою традиційних методів селекції. Крім генетичного модифікування до методів сучасної біотехнології відносять також клонування, культивування тканин та селекцію під контролем маркерів.

Нові якості ГМО можуть, однак, нести певний ризик для здоров'я та розвитку людини. Багато, хоча і не всі, генів і ознак, що використані при створенні сільськогосподарських ГМО, не мають рекомендацій щодо безпечного використання. Деякі країни розробили законодавчі акти, що передбачають проведення обов'язкового домаркетингового аналізу ризику використання ГМ продуктів харчування. Для вирішення таких питань на міжнародному рівні існують спеціальні угоди і норми.

ГМО можуть давати непрямі негативні ефекти на здоров'я людини, в тому числі за допомогою згубного впливу на навколишнє середовище або несприятливого впливу на економічні (такі як торгівля), соціальні та етичні фактори.

Такі ефекти слід оцінювати з урахуванням можливих переваг і ризиків, що пов'язані з не-ГМ продуктами. Наприклад, нові сорти сільськогосподарської рослини, що виведені за допомогою традиційних селекційних підходів, також можуть мати як позитивний, так і негативний вплив на здоров'я людини і навколишнє середовище.

На сьогоднішній день тільки декільком ГМ культурам дозволено бути використаними у виробництві продуктів харчування, і вони надходять на міжнародний продовольчий і кормовий ринки. До їх числа входять стійка до гербіцидів і комах кукурудза (стійкі до комах ГМ культури експресують різні варіанти інсектицидних токсинів бактерій *Bacillus thuringiensis* – Bt), толерантні до гербіцидів соя і олійний рапс (канола), а також стійка до гербіцидів бавовна (переважно для виробництва волокна, проте очищена бавовняна олія використовується і в їжу). Крім того, урядові органи деяких країн схвалили для культивування та використання в їжу ГМ сорти папайї, картоплі, рису, гарбуза, цукрових буряків і томатів.

## ***Агрономічно важливі характеристики***

### ***Стійкість до шкідників і захворювань.***

У найближчій перспективі буде продовжуватися комерціалізація сортів, що володіють агрономічно цінними ознаками, особливо стійкістю до гербіцидів і комах-шкідників, а також, побічно, підвищеною врожайністю. Метою досліджень і розробок у цій галузі є:

- розширення спектра сортів кукурудзи, сої та каноли, стійких до гербіцидів;
- розширення спектра гербіцидів, придатних для обробки стійких до гербіцидів трансгенних культур, наприклад, створення сортів, стійких до таких гербіцидів як бромоксиніл (*bromoxynil*), оксиніл (*oxynil*) і сульфонілсечовина (*sulfonylurea*);
- комбінування нових генів, що забезпечують стійкість рослин до комах-шкідників, таких як нові варіанти *Bt*-гена, що кодують різні токсини.

***Стійкість до вірусів.*** Стійкість до вірусів може стати дуже важливою для підвищення сільськогосподарської продуктивності. У даний час у різних країнах світу проводять польові випробування стійких до вірусів сортів батату (*SPFMV, sweet potato feathery mottle virus*), кукурудзи (*MSV, maize streak virus*) та африканської маніюки (мозаїчний вірус). Можливо, ці культури будуть комерціалізовані протягом найближчих 3–5 років. Розроблено також стійку до нематоди (кореневого черв'яка) ГМ картоплю.

### ***Змінені поживні властивості та склад ГМ продуктів***

***Рис, збагачений вітаміном А.*** Найбільш відомим прикладом ГМ культури, яка має поліпшені поживні якості, є рис, що містить високий рівень бета-каротину – попередника вітаміну А (так званий «золотий рис»). Вітамін А підвищує стійкість організму до захворювань, запобігає розвитку порушень зору і сліпоти, а також сприяє зростанню і розвитку організму. Дефіцит вітаміну А – це проблема закладів охорони здоров'я, що є причиною розвитку важких захворювань і дитячої смертності. Для боротьби з дефіцитом вітаміну А пропонувалося кілька стратегій, у тому числі зміна раціону (наприклад, збагачення продуктів харчування) і використання таблетованих добавок.

Збагачені вітаміном А сорти рису та кукурудзи розробляють для подальшого впровадження в сільське господарство країн, що розвиваються. Метою робіт, що ведуться в даний час, є забезпечення ефективного засвоєння вітаміну А, що міститься в рисі, у кишечнику людини. Якщо це завдання буде досягнуто, вживання 300 г трансгенного рису покриватиме значну частку щоденної потреби організму людини у вітаміні А.

*Рис з високим вмістом заліза.* Дефіцит заліза відчувається в регіонах, де основу щоденного раціону населення становить рис. Це обумовлено вкрай низьким вмістом у рисі заліза. Зерно трансгенного рису, до складу якого входить багатий залізом білок сої феритин, містить у два рази більше заліза, ніж зерно звичайних сортів. Такий рис трансформований за допомогою трьох генів, що підвищують вміст заліза в його зернах і поліпшують його абсорбцію у травному тракті.

*Поліпшення білкового складу.* Учені також працюють над методами поліпшення білкового складу овочів, таких як маніока, овочевий банан та картопля, що є основними продуктами харчування. Згідно з результатами парникових випробувань, бульби модифікованих культур містять на 35...40% більше білків і підвищену кількість незамінних амінокислот.

*Видалення алергенів та антинутрієнтів.* Звичайно корені маніоки містять велику кількість ціаніду. Їх використання як основного продукту харчування в тропічній Африці призвело до підвищення рівня ціаніду в крові населення до токсичних значень. Застосування методів сучасної біотехнології для зниження вмісту цієї токсичної сполуки в коренях маніоки дозволить зменшити час їх приготування. Введення в геном картоплі гена інвертази дріжджів знижує природний рівень токсичних глікоалкалоїдів.

Зменшення вмісту алергенного білка в зернах рису можливе шляхом модифікації механізму його біосинтезу. Експерименти не виявили алергенності такого модифікованого рису для людини. Ведеться також робота на зниження алергенності пшениці. Підхід полягає у впровадженні в геном пшениці гена, що відповідає за біосинтез тіоредоксину, який розщеплює дисульфідні зв'язки алергенного білка і не впливає при цьому на функціональність інших білків рослини.

*Зміна вмісту крохмалю та співвідношення жирних кислот.* У рамках одного з напрямків роботи зі створення корисних для здоров'я

продуктів харчування робляться спроби використання картоплі з підвищеним вмістом крохмалю, що зменшує кількість жиру, якій абсорбується картоплею під час смаження. Для створення менш шкідливих жирів фахівці змінюють співвідношення жирних кислот сої та канолі в бік зниження рівня насичених жирних кислот. Метою досліджень і розробки на сучасному етапі є створення соєвої, рапсової і пальмової олій поліпшеної якості. Дві таких культури дістали офіційне схвалення для вирощування та використання при виробництві харчових і кормових продуктів у США. Це соя з високим вмістом олеїнової кислоти та олійний ріпак з високим вмістом лаурінової кислоти. Соя з високим вмістом олеїнової кислоти також дозволена для використання в їжу в Австралії та Канаді. Дослідження та розробки в напрямку створення олій з поліпшеною поживною цінністю ще тільки розпочато.

*Підвищений вміст антиоксидантів.* Розроблено методи підвищення вмісту лікопену і лютеїну в плодах томатів, а також ізофлавоноїдів у бобах сої. Ці фітонутрієнти сприяють поліпшенню стану здоров'я і профілактики захворювань. Дослідження в цій галузі є ще на відносно ранньому етапі, що обумовлено недостатньою вивченістю фітонутрієнтів, а також тим, що не всі фітонутрієнти корисні для здоров'я людини.

*Екологічні стреси.* Забезпечення толерантності до екологічних факторів стресу за допомогою генетичних модифікацій теж є однією із проблем. Активно вивчаються стійкість рослин до підвищеної засоленості ґрунту і посухи. Відповідно до оцінок фахівців, підвищена засоленість ґрунту характерна для 20% всіх сільськогосподарських угідь і для 40% усіх зрошуваних земель у світі. Стійкість до засоленості та посух забезпечується безліччю генів, що складним чином взаємодіють між собою. Така поліфакторна природа зумовила вкрай низьку ефективність традиційних методів селекції за створення стійких до засоленості ґрунту і посухи сортів. Стійкості до засоленості можна домогтися за допомогою вбудовування в геном чутливої культури декількох генів, які забезпечують відповідний механізм, що використовується стійкою культурою. Реальний період часу, необхідний для комерціалізації таких ГМ культур, визначити неможливо.

Відбуваються також спроби поліпшення системи фотосинтезу за допомогою генетичного модифікування. Такі культури, як кукурудза і цукровий очерет, більш ефективно конвертують енергію сонця в

енергію хімічних зв'язків молекул вуглеводів, ніж широколистяні сільськогосподарські культури. Врожайність культури можна підвищити на 10% шляхом упровадження в її геном генів іншої культури, що забезпечують високу ефективність фотосинтезу. Період часу, необхідний для комерціалізації таких ГМ культур, також невідомий.

Ознаку чоловічої стерильності використовують для створення повністю гібридного посівного матеріалу для запобігання розповсюдження ГМ культур у природному середовищі (внаслідок так званого дрейфу генів). Ряд сортів кукурудзи, що характеризуються чоловічою стерильністю, дістав офіційне схвалення в США. Крім того, сорти олійного ріпаку та канолі, що володіють цією ознакою, отримали дістали дозвіл на вирощування і використання як продукти харчування в країнах ЄС, Канаді та США. Ще однією стратегією, спрямованою на запобігання дрейфу генів між рослинами, є генетичне модифікування, яке забезпечує вегетативне (що не потребує запилення) формування насіння сільськогосподарських культур. Експерименти показали, що жодна зі згаданих стратегій не є універсальною і, можливо, найбільш ефективним методом є комбінація підходів.

### *Худоба і риба*

У рамках виробництва продуктів харчування застосування сучасної біотехнології у тваринництві має два основних напрямки: вирощування тварин і харчування людини.

*Риба.* З урахуванням очікуваного підвищення потреби в рибопродуктах ГМ риби може набути великого значення як продукт харчування в розвинених країнах і країнах, що розвиваються. Найбільш ймовірно, що першою ГМ особиною на продовольчому ринку стане швидкозростаюча сьомга (*Salmo salar*), в геном якої вбудований ген гормону росту чавичі (*Oncorhynchus tshawytscha*). Така сьомга росте в 3-4 рази швидше нетрансгенних аналогів, що зменшує час вирощування і підвищує доступність продукту харчування. Ще, якнайменш вісім штучно вирощуваних видів риби генетично модифіковані з метою прискорення зростання. Ген гормону росту в порядку досвіду вбудували в геноми таких риб, як білий амур, райдужна форель, тіляпія і сом. У всіх випадках трансгени виділяли з геномів риб інших видів.

Для вирішення деяких проблем аквакультури вчені роблять

спроби підвищити стійкість риб до захворювань, наприклад, шляхом вбудовування в геном сьомги фрагмента ДНК, що кодує лізоцим райдужної форелі. Лізоцим має антибактеріальні властивості й ефективний по відношенню до багатьох збудників захворювань риб. Ведеться також робота з впровадження гена ще одного антибактеріального білка (секропіна тутового шовкопряда) в геном сома. Це може підвищити стійкість риби до захворювань, у тому числі до кишкової септицемії (*enteric septicemia*).

Вирощування хижих риб, таких як форель і лосось, призвело до надмірного промислу піщанки і мойви. Для вирішення цієї проблеми вчені вивчають можливість зміни метаболізму хижих риб шляхом поліпшення засвоєння вуглеводів і збільшення частки рослинної їжі у раціоні.

Чутливість до холоду тепловодних риб, таких як короп і тіляпія, може призводити до значних втрат у зимовий період. Пропонований напрямок роботи в цій галузі полягає в зміні молекулярної конформації ліпідів з метою підвищення плинності клітинних мембран. Для розширення географічної зони, придатної для вирощування риби, ген, що кодує білок-«антифриз», переноситься з генома одного виду риб у геном риб іншого виду. Незважаючи на те, що вже виведено декілька сортів морозостійкої сьомги, рівень білка-«антифризу», що секретується такими рибами, значно не змінює температуру замерзання їх крові.

Проблеми, що стосуються виявлення небезпеки і оцінки ризику, які можуть асоціюватися з вирощуванням ГМ риби, до цього часу обговорюються. Одним з таких аспектів є вирощування стерильних особин з метою мінімізації екологічного ризику за потрапляння ГМ риб у природні популяції.

*Худоба та птиця.* Продукти харчування, одержані з ГМ худоби та птиці, ще дуже далекі від комерційного використання. У геном свиней вдалося вбудувати кілька генів, що прискорюють ріст, що також впливають на якість м'яса, роблячи його більш пісним і ніжним. Цю роботу розпочато понад 15 років тому, однак через певні морфологічні і фізіологічні зміни, що спостерігалися у тварин, технології не були комерціалізовані.

Запропоновано також велику кількість модифікацій молока, які полягають у додаванні нових білків, або в маніпуляціях над ендогенними протеїнами. Нещодавно вчені з Нової Зеландії створили корів з підвищеним вмістом у молоці казеїну. Використання такого

молока має підвищити продуктивність сироварних виробництва. Ще кілька груп дослідників працюють над зниженням вмісту в молоці лактози. Кінцевою метою є створення молока, придатного для вживання в їжу людьми, які не здатні перетравлювати лактозу.

До інших напрямків застосування генетичного модифікування у тваринництві, що перебувають на ранніх стадіях досліджень і розробки, відносяться підвищення стійкості до захворювань, збільшення багатоплідності в овець, несучість птахів за рахунок створення двох активних яєчників і поліпшення переробки кормів «екосвинями» («*enviropig*» і свинями, що виділяють у навколишнє середовище меншу кількість токсичних сполук фосфору). На даний момент більшість цих напрямків є на стадії теоретичних розробок і, відповідно, тимчасові рамки їх комерційного впровадження прогнозувати неможливо.

### ***Мікроорганізми***

*Мікроорганізми як продукти харчування.* В даний час на ринку відсутні комерційні продукти, що містять живі генетично модифіковані мікроорганізми (ГММ). У 1993 році у Великобританії ГМ дріжджі отримали офіційне схвалення для використання в пивоварній промисловості, однак спроби комерціалізувати продукт не робилися. До інших мікроорганізмів, які використовуються для виробництва продуктів харчування (що перебувають на стадії досліджень і розробки), відносяться культури бродіння (для хлібопечення та пивоваріння) та молочнокислі бактерії, які використовуються за виробництва сиру. Метою досліджень і розробки також є мінімізація інфікування патогенними мікроорганізмами та підвищення поживної цінності та смакових якостей кінцевого продукту.

Робляться також спроби генетично модифікувати мікроорганізми травного тракту великої рогатої худоби з метою захисту тварин від отруйних компонентів корму. Сучасні методи біотехнології використовують для створення пробіотиків – мікроорганізмів, вживання певної кількості яких з їжею має позитивний вплив на здоров'я.

*Компоненти продуктів харчування, технологічні добавки, добавки до раціону і ветеринарні кошти, одержані за допомогою мікроорганізмів.* Багато ферментів, що використовуються в якості технологічних добавок у харчовій та кормовій промисловості,



виробляють за допомогою ГММ. Це означає, що ГМ мікроорганізми інактивовані, зруйновані або видалені з кінцевого продукту. ГМ дріжджі, грибки і бактерії використовують для цих цілей уже більше десятиліття. Як приклад можна навести альфа-амілазу, що використовується в хлібопеченні, глюкозоамілазу, що застосовується за виробництва фруктози, і необхідний для ферментації сиру фермент хімосин. Більшість ГММ, які використовуються в харчовій промисловості, є похідними мікроорганізмів, що застосовуються в традиційній харчовій біотехнології.

У ряді країн ГММ дозволені також для виробництва мікронутрієнтів, таких як вітаміни і амінокислоти, що використовуються як продукти харчування або добавки до раціону. Прикладом є виробництво каротиноїдів (використовуються як харчові добавки, барвники та добавки до раціону) в ГМ бактеріальних системах. У майбутньому в ГМ мікроорганізми можна буде інтегрувати цілі метаболічні шляхи, що дозволить синтезувати нові сполуки.

Для потреб тваринництва за допомогою генної інженерії розроблено такі ветеринарні продукти, як соматотропін бугаїв, що застосовується для підвищення ефективності виробництва молока.

Завданням білкової інженерії є зміна генетичної і, відповідно, амінокислотної послідовності ферментів. У наш час білкова інженерія не знайшла широкого застосування за виробництва ферментів. Метою досліджень і розробок у цій галузі є зміна характеристик ферментів, наприклад, підвищення термічної і рН-стабільності. Ферментативну обробку часто використовують як альтернативу відомим хімічним реакціям. Здебільшого це призводить до зниження енерговитрат та обсягу хімічних відходів.

Створення ГМО дозволяє підвищити продуктивність сільськогосподарського виробництва і поліпшити поживну цінність продуктів харчування, а також надає опосередковані позитивні ефекти, такі як зниження обсягів розпилюваних пестицидів, збільшення доходів ферм, підвищення стабільності врожаю та безпеки продуктів харчування, що особливо актуально для країн, які розвиваються. Суперечливість даних, що стосуються цих переваг, відображає різні регіональні чи агротехнічні особливості.

В наш час розроблено ефективну систему оцінки безпеки ГМО для здоров'я людини і навколишнього середовища. Вона включає низку підходів і методів, які застосовують, починаючи з етапу

планування передбаченої генетичної модифікації, і закінчуючи державною реєстрацією ГМО, що дає право, використовувати його в господарській діяльності.

### **10.1. Методи оцінки і прогнозування впливу ГМО на організм людини і навколишнє середовище**

Експертиза безпеки ГМО здійснюється науково-обґрунтованим методом. Під час її проведення слід враховувати інформацію, що опублікована в науково-технічній літературі й міститься в спеціалізованих базах даних, результати випробувань і зведення з попереднього використання ГМО, висновки експертів, методичні рекомендації, розроблені національними і міжнародними організаціями.

Оцінка ризиків має здійснюватися на індивідуальній основі. Інформація, необхідна для ухвалення висновку про безпечність ГМО, може варіювати за характером і рівнем деталізації у кожному конкретному разі залежно від відповідного ГМО, характеру його передбачуваного використання і потенційного приймаючого середовища.

Ризики, пов'язані з ГМО або продуктами, що їх містять, повинні розглядатися в контексті ризиків, що існують за використання інтактних реципієнтних організмів у потенційному приймаючому середовищі. Адже потенційно небезпечними для здоров'я людини і навколишнього середовища можуть бути і сорти, породи, штами організмів, виведені за допомогою традиційної селекції. Для того, щоб вичленувати ефект саме генетичної модифікації, необхідно порівнювати генетично модифікований організм з вихідним, звичайним сортом.

Загальна методика оцінки ризиків можливих несприятливих ефектів ГМО передбачає такі етапи:

- виявлення будь-яких нових генотипових і фенотипових характеристик, пов'язаних з присутністю трансгенів, які можуть викликати несприятливу дію ГМО на здоров'я людини і навколишнє середовище;
- оцінювання ймовірності виникнення несприятливих наслідків виходячи з інтенсивності, тривалості і характеру впливу

- генетично модифікованого організму на людину або на потенційно приймаюче середовище;
- оцінювання наслідків у разі, коли така несприятлива дія дійсно матиме місце;
  - оцінювання сукупного ризику, що викликається ГМО, на основі визначення ймовірності виникнення і наслідків виявлених несприятливих ефектів;
  - здійснення рекомендацій щодо визначення, чи є ризики припустимими або регулюємими, включаючи, якщо це необхідно, визначення стратегій для регулювання таких ризиків.

## **10.2. Природа ризиків для здоров'я людини і навколишнього середовища, пов'язаних з генно-інженерними організмами**

Для кращого розуміння природи ризиків, що пов'язані з генно-інженерними організмами, доречно коротко нагадати, що являють собою генетично модифіковані організми і чим вони відрізняються від звичайних, немодифікованих. У Картахенському протоколі з біобезпеки міститься таке їх визначення: «живий змінений організм» означає будь-який живий організм, що володіє новою комбінацією генетичного матеріалу, яку отримано завдяки використанню сучасної біотехнології (Картахенський протокол з біобезпеки, стаття 3).

Таким чином, будь-який трансгенний сорт рослини відрізняється від початкового лише тим, що в його генетичному матеріалі до 25-30 тисяч існуючих генів додано відносно невеликий фрагмент ДНК, в якому записано інформацію про один-два нових гени та їх регулюючі елементи. Активність цих доданих генів в організмі виражається в біосинтезі одного-двох нових для організму протеїнів (ферментів або структурних білків). Оскільки генетична інженерія може оперувати будь-якими генами, що існують в природі, а не лише генами від організмів, які є в еволюційній спорідненості з окремими видами культурних рослин, як це здійснюється в традиційній селекції, то продукти привнесених генів (ферменти, протеїни) можуть мати вигляд у генетично модифікованому організмі як незвичайні, невласиві, чужорідні для даного виду, що в природі у ньому не трапляються. Відповідно, саме *продукти трансгенів* є

найбільш суттєвими, відчутними **факторами ризиків**, що пов'язані з генно-інженерними організмами.

З упевненістю можна стверджувати, що це не стосується доданого фрагмента ДНК, оскільки будова спадкового матеріалу всіх організмів на нашій планеті універсальна. Сама по собі ДНК в чистому вигляді є абсолютно безпечним для людини продуктом. Упродовж усього життя людина щодня споживає його без шкоди для свого здоров'я.

Що стосується рекомбінантних протеїнів, то не у всіх ГМО вони є абсолютно чужорідними, невластивими для певного виду сполуками.

По-перше, існує досить велика група трансгенних сортів рослин, які отримані завдяки генетичним маніпуляціям з їх власними генами (томати з подовженим періодом зберігання, соя, рапс з покращеним складом олії, картопля з поліпшеною якістю крохмалю, кава без кофеїну, тютюн без нікотину та інші).

По-друге, багато дуже віддалених в еволюційному плані організмів мають велику кількість ідентичних шляхів метаболізму і, відповідно, склад та будова ферментів, що забезпечують їх реалізацію, також ідентичні. Проте за оцінки безпеки таких близьких за функціональною активністю генів слід звертати увагу не стільки на сам білок – продукт трансгена, скільки на можливу зміну окремих шляхів метаболізму трансгенної рослини через підвищення концентрації одного з їх компонентів.

По-третє, останні наукові дані, отримані в результаті вивчення будови генетичного матеріалу людини, деяких тварин і рослин, суттєво розширили наші уявлення про схожість і відмінності генів різних систематичних груп та ймовірність їх перенесення від однієї віддаленої систематичної групи до іншої (горизонтальне перенесення генів). Виявилося, що в геномі рослини арабидопсис є близько сотні генів людини, у тому числі таких, як ген пухлини молочної залози. Ґрунтова бактерія *Agrobacterium tumefaciens* регулярно переносить частину своїх генів у рослини, викликаючи у них утворення пухлини – корончастого галла. Це абсолютно природний процес, який з успіхом використовують і генні інженери. Таким чином, те, що здійснюють генетики, аж ніяк не суперечить законам природи. Обмін генетичною інформацією між віддаленими видами в ній відбувається постійно.

Друга основна *група ризиків* пов'язана з самим *фактом вставлення трансгенів* у генетичний матеріал організму. Є підстави вважати, що вбудовування трансгенів відбувається випадково, тобто вони можуть вбудуватися практично в будь-яку ділянку молекул ДНК, що міститься в трансформованій клітині: в будь-яку хромосому, будь-яку частину хромосоми, якщо йдеться про вищих організмів. Чим це небезпечно? Перш за все тим, що привнесений ген може торкнутися сайтів ДНК, які кодують структуру або регулюючі елементи будь-якого гена організму, що модифікується. Ймовірність цієї події в цілому не така велика, оскільки генетичний матеріал вищих організмів влаштований таким чином, що власне генами і їх регулюючими елементами зайнято менше 10% довжини молекули ДНК, що, як вважають, підвищує стабільність, стійкість молекули ДНК до зовнішніх дій. Це означає, що гени у молекулі ДНК розташовані не щільно один за іншим, а через великі проміжки, зайняті некодуючими послідовностями нуклеотидів. Більше того, навіть у межах кодуєчих послідовностей генів (тобто у тієї частини молекули ДНК, в якій записана інформація про послідовність амінокислот у білку – продукти гена) є інтрони, які також не несуть ніякої генетичної інформації.

Проте ймовірність того, що трансген може вбудуватися в ділянку ДНК, уже зайняту іншим геном, все ж існує. Якщо це стосується частини, що кодує структуру пошкодженого гена, то продукт даного гена утворюватися не буде. Цей ген ніби розпадається на дві неповноцінні частини: одна, передня, має елементи, необхідні для початку транскрипції (утворення інформаційної РНК), але не має термінальної послідовності, інша, задня, має лише термінальні елементи. До того ж обидві частини кодуєчої області є неповними. Очевидно, що аналогічний результат матиме місце і у разі ушкодження промотора або термінальних послідовностей. Якщо ген, якого торкнулися, виконує будь-яку важливу функцію в організмі, то відсутність його продукту може призвести до втрати життєздатності. Таким чином, до рівня комерційного сорту генотипи з пошкодженими генами дійти не можуть.

Якщо в процесі вбудовування торкнутися інших регуляторних елементів – енансерів (підсилювачі активності генів) або сайленсерів (уповільнювачі), то це може призвести до зміни активності генів, яких торкнулися вставкою. Сорти рослин, створюючи будь-які токсичні з'єднання (наприклад, соланіни

картоплі) в концентраціях, нешкідливих для здоров'я людини, внаслідок генетичної модифікації здатні підсилити їх синтез до рівня, що перевищує гранично допустимі значення. Такі генотипи вже стають небезпечними для здоров'я.

Нарешті, третя основна *група ризиків*, пов'язаних з генно-інженерними організмами, заснована на несприятливих ефектах, викликаних *перенесенням трансгенів іншим організмам*: вертикальним перенесенням генів від ГМО диким родичам культурного вигляду або горизонтальним перенесенням генів, наприклад, селективних генів стійкості до антибіотиків від генетично модифікованої рослини мікроорганізмам травного тракту. Тут все зрозуміло: гени і їх продукти, нешкідливі в ГМО, можуть виявитися дуже небезпечними в іншому генетичному і екологічному середовищі. Так, набуття хвороботворними бактеріями травного тракту стійкості до антибіотиків може суттєво ускладнювати лікування хвороб, які вони здатні викликати.

### **10.3. Можливі несприятливі впливи генно-інженерних організмів на здоров'я людини, методи їх оцінювання і способи запобігання**

Серед потенційних ризиків для здоров'я людини, пов'язаних з використанням генно-інженерних організмів, розглядають такі:

- синтез нових для реципієнтного організму білків – продуктів трансгенів, що можуть бути токсичними або алергенними;
- зміна активності окремих генів живих організмів під впливом вставлення чужорідної ДНК, внаслідок чого може статися погіршення споживчих властивостей продуктів харчування, що одержують з цих організмів. Наприклад, у генетично модифікованих продуктах може бути підвищений порівняно з реципієнтними організмами рівень якихось токсичних, алергенних речовин, що перевищує встановлені межі безпеки;
- горизонтальна передача трансгенів іншим організмам, зокрема маркерних генів стійкості до антибіотиків від ГМО мікроорганізмам травного тракту.

Зрозуміло, що коли йдеться про ризики для здоров'я людини, що пов'язані з ГМО, мають на увазі перш за все ті, що виникають при

споживанні продуктів, отриманих з них або вироблених ними (наприклад, молока від генетично модифікованих корів). Стратегія оцінки безпеки генетично модифікованих продуктів харчування заснована на принципі суттєвої еквівалентності, що розроблений OECD (Організацією економічного співробітництва і розвитку).

Згідно з чим принципом, оцінюється не рівень безпеки нових продуктів харчування як такий, а його зміна порівняно із традиційними харчовими аналогами, що мають тривалу історію безпечного використання.

Для ідентифікації в нових продуктах і вихідній сировині відмінних від аналогів ознак, що впливають на рівень безпеки і поживну цінність продуктів харчування, ретельному аналізу піддається інформація, що стосується характеру генетичної модифікації, а також характеристик вихідного організму, від якого взято ген, призначений для трансгеноза. Далі проводять порівняльний аналіз генетично модифікованого організму і вихідного (немодифікованого) організму. Для цього порівнюють агрономічні показники, продукти вбудованих генів, склад ключових хімічних компонентів (у тому числі поживних і антипоживних), профіль основних метаболітів, ефекти переробки вихідної сировини.

Новий продукт (сорт рослин) може бути:

- еквівалентним за суттєвими ознаками вибраному аналогу;
- еквівалентним аналогу, за винятком однієї (декількох) суттєвої, добре визначуваної ознаки;
- не еквівалентним аналогу за суттєвими ознаками.

У 2-му і 3-му випадках проводиться ретельна оцінка безпеки відмінних від вихідного аналога ознак ГМО за такими показниками, як потенційна токсичність, потенційна алергенність, можливість перенесення генів стійкості до антибіотиків мікроорганізмам травного тракту, ймовірність потенційного погіршення харчової цінності та засвоєння поживних речовин.

Стратегія оцінки потенційної токсичності нових продуктів харчування визначається за таким фактором. Якщо речовина, що досліджується, відмінна від аналога, є відомим компонентом рослинної їжі, що має тривалу історію безпечного використання, дослідження токсичності нових продуктів не є обов'язковим. У інших випадках здійснюються:

- визначення концентрації потенційних токсинів у їстівних частинах рослин;

- установлення питомої ваги даного продукту в харчовому раціоні певних груп населення;
- порівняння (для білків) їх амінокислотної послідовності з такою у відомих токсинів і харчових антагоністів (наприклад, інгібіторів протеаз) за електронними базами даних;
- оцінювання стабільності нових речовин до термічної обробки;
- визначення швидкості руйнування потенційних токсинів у шлунково-кишковому тракті (у модельних системах);
- аналіз рівня токсичності нових речовин у модельних системах (культура клітин *in vitro*);
- аналіз токсичності в експериментах з примусового згодовування лабораторними або домашніми тваринами їжі, яка містить продукти, отримані з генетично модифікованого організму, що вивчається, або її нових компонентів протягом тривалого часу (хронічний експеримент – тривалість 1-2 роки) або протягом короткого часу, але з використанням високих концентрацій продуктів, що контролюються (гострий експеримент, тривалість близько двох тижнів, концентрація продукту трансгена, що вивчається, до 5 грамів на кілограм ваги тварини).

Для оцінки алергенного потенціалу продуктів трансгенів використовується схема (набір і послідовність аналітичних експериментів), що розроблена експертами ВОЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я) і ФАО (Організація ООН з продовольства і сільського господарства).

*Оцінка вірогідності потенційного погіршення харчової цінності та засвоєння поживних речовин.* На практиці зазвичай отримують велику кількість трансгенних форм, з яких під час подальшої традиційної селекції відбирають зразки без видимих мутацій. У подальшому ретельним чином вивчають безпеку відібраних форм для здоров'я людини і навколишнього середовища. Зокрема, аналізують вміст у рослинній сировині як поживних (білки, жири, вуглеводи, мінеральні елементи, вітаміни і т.п.), так і потенційно небезпечних для здоров'я речовин. Щоб трансгенний сорт був допущений до господарського використання, він не повинен істотно відрізнятися від вихідного сорту, окрім як за привнесеного в результаті трансгенеза ознакою або за ознаками, що були метою генетичної модифікації (концепція суттєвої еквівалентності). Аналіз суттєвої еквівалентності ГМО і початкової лінії найбільш актуальний для видів рослин, які в принципі можуть бути небезпечними для здоров'я людини: картопля,



томати (через токсичні глікоалкалоїди), бавовна (через токсичний госсипол) і деякі інші.

Наступним фактором, що розглядається як потенційно несприятливий ефект генетично модифікованих організмів на здоров'я людини, є горизонтальне перенесення трансгенів (перш за все генів стійкості до антибіотиків) від ГМО мікрофлори травного тракту людини і тварин. До складу будь-якої трансгенної конструкції, як правило, входить окрім власне трансгена і його регулюючих елементів і так званий селективний (або маркерний) ген, необхідний для відбору трансформованих клітин. Як селективні гени зазвичай використовують гени стійкості до антибіотиків (канаміцину, ампіциліну, стрептоміцину), що вже втратили своє значення як антимікробні препарати через широку розповсюдженість стійкості мікроорганізмів до цих антибіотиків.

Крім того, вірогідність перенесення селективних генів з ДНК продуктів харчування, отриманих з генетично модифікованих організмів, до мікроорганізмів травного тракту дуже низька (вона оцінюється близько  $10^{-17}$ ). Для цього необхідно декілька дуже мало ймовірних подій: 1 – ділянка ДНК, що містить селективний ген, не має бути пошкодженою в процесі травлення; 2 – потрібна гомологія селективного гена або прилеглих до нього районів ДНК з ДНК хромосоми або плазмиди хвороботворної бактерії травного тракту; 3 – для того, щоб відбулася експресія селективного гена в ній після перенесення, він повинен вбудуватися під відповідним прокариотичним промотором. Розгляд наслідків перенесення трансгенів або селективних генів до ДНК клітин людини також неможливий: тривалість життя клітин епітелію травного тракту близько семи днів, жодного контакту їжі зі статевими клітинами людини не може бути в принципі.

Хоча, як було показано вище, наявність в трансгенних конструкціях селективних генів антибіотикостійкості не є небезпечним для здоров'я людини і навколишнього середовища, але, враховуючи занепокоєність, а часто і неприйняття громадськістю цього факту, вчені докладають зусилля щодо розробки альтернативних селективних систем. Розроблено методи видалення селективних генів з трансформантів після проведення селективної процедури або отримання безмаркерних трансгенних ліній за допомогою ко-трансформації з подальшим негативним відбором за селективними генами.

## 10.4. Несприятливі наслідки вивільнення ГМО в навколишнє середовище і методи їх оцінювання

Суттєвими є ризики для навколишнього середовища. Першу групу ризиків (для здоров'я людини) можна оцінити достатньо точно, щоб їх упередити і практично повністю виключити. Щодо ризиків для навколишнього середовища, ситуація набагато складніша. Необхідно враховувати різноманітні взаємодії організму і середовища, більшість яких важко піддається точній оцінці або навіть непередбачувана. Особливо складно буває спрогнозувати віддалені наслідки, різні каскадні ефекти: адже в дикій природі все взаємопов'язано.

Можливі такі несприятливі ефекти ГМО на навколишнє середовище:

- руйнівна дія на біологічні співтовариства і втрата цінних біологічних ресурсів внаслідок засмічення місцевих видів генами, що перенесені від генетично модифікованих організмів;
- створення нових паразитів, перш за все бур'янів, і посилення шкідливості тих видів, що вже існують, на основі самих ГМО або в результаті перенесення трансгенів іншим видам;
- утворення речовин – продуктів трансгенів, які можуть бути токсичними для організмів, що живуть або харчуються на генетично модифікованих організмах, і не є мішенями трансгенних ознак (наприклад, бджіл, інших корисних видів, що охороняються);
- несприятлива дія на екосистеми токсичних речовин, похідних неповного руйнування небезпечних хімікатів, наприклад, гербіцидів (значна кількість ГМО, що створюють на даний час – форми, стійкі до гербіцидів).

***Руйнівна дія генетично модифікованих організмів на біологічні співтовариства.*** Як відомо, в природі немає нічого зайвого: існує певний баланс між окремими видами у межах будь-якого біологічного співтовариства. Живі організми знаходяться між собою в тісному контакті та взаємозалежності. Ймовірність зміни біологічного різноманіття без втручання людини незначна. Збільшення чисельності популяції будь-якого виду в окремі проміжки часу, наприклад, через коливання кліматичних умов, негайно включається механізм, що обмежує це зростання, і баланс між видами відновлюється. Тому, говорячи про першу групу ризиків з числа, що

наведені вище (руйнівна дія трансгенів на біологічні співтовариства), мають на увазі те, що при перенесенні окремих трансгенних ознак, які перш за все мають адаптивне значення в навколишньому середовищі (стійкість до холоду, спеки, засухи, засолення), від культурних сортів до їх диких родичів можлива ситуація, за якою останні можуть набути додаткових переваг в боротьбі за існування. А це може призвести до заміни того самого балансу між видами, що існує в природі. Наслідки можуть бути сумні: збільшення чисельності одних видів може супроводжуватися зниженням чисельності інших і навіть їх втратою.

**Створення нових паразитів.** Проблема появи супербур'янів і супершкідників також є однією з основних, коли розглядають екологічні ризики, що пов'язані з ГМО. Бур'яни – це група рослин з певним набором адаптивних ознак, які допомагають існувати в навколишньому середовищі, у тому числі серед посівів культурних рослин, незважаючи на жорстку конкуренцію з боку інших організмів, а також на постійний вплив з боку людини.

Генетично модифіковані організми розглядають в контексті проблеми, що досліджується, маючи на увазі потенційну можливість посилення агресивності існуючих бур'янів за рахунок набуття ними будь-якої додаткової ознаки, що кодується привнесеним геном (трансгеном). Йдеться перш за все про адаптивні гени стійкості до різних стресових факторів. З одного боку, завдяки таким трансгенам небезпечними бур'янами можуть стати деякі культурні рослини, що за своєю природою не дуже відрізняються від диких видів (пасовищні трави, рапс, люцерна й ін.). З іншого боку, існує ймовірність перенесення трансгенів від культурних видів до їх диких родичів, що можуть бути бур'янами. Тому не випадково за оцінювання ризиків несприятливих екологічних ефектів ГМО обов'язково аналізується сама трансгенна ознака щодо адаптивності, а також ймовірність її перенесення диким родичам.

**Несприятливі ефекти ГМО на організми, що не є «мішенями» трансгенних ознак.** Використання трансгенних сортів з інсектицидними властивостями (завдяки Bt-гена) відразу ж породило питання: чи не вплинуть негативно ці сорти на біологічну різноманітність комах, які не є «мішенню» трансгенної ознаки? Маємо на увазі перш за все такі корисні комахи, як бджоли, сонечки, златоглазки. На щастя для природи, Bt-протеїни відрізняються високою вибірковістю своєї дії. Проте можливі негативні ефекти, що

пов'язані з нецільовою дією ГМО на інші організми, обов'язково ретельно зважуються при оцінюванні їхньої біобезпеки.

*Збільшення об'ємів використання гербіцидів.* У зв'язку з тим, що перші ГМО мали в основному, ознаки толерантності до гербіцидів, виникло побоювання, що їх використання може привести до несприятливої дії на екосистеми токсичних речовин, похідних неповного руйнування небезпечних хімікатів, наприклад, гербіцидів. Проте практика використання гербіцидостійких генетично модифікованих сортів показала протилежну тенденцію. Оскільки ефективність контролю над бур'янами за допомогою комбінації ГМО і відповідного гербіциду вища від звичайної практики використання хімікатів, то спільний об'єм гербіцидів, внесених на поля з генетично модифікованими сортами, є нижчим звичайного.

### **10.5. Оцінка ризиків можливих несприятливих ефектів ГМО на навколишнє середовище**

Для визначення ризиків можливих несприятливих ефектів, пов'язаних з вивільненням ГМО в навколишнє середовище, розроблено спеціальну методику, що дозволяє проводити комплексну всебічну оцінку їх безпеки. Ця методика застосовується у всіх країнах, де вирощують ГМО. Основні її положення закріплені у ряді міжнародних угод, що робить її використання обов'язковою процедурою для країн, які до них приєдналися. Методика добре зарекомендувала себе на практиці. По суті невідомо жодного випадку негативної дії генетично модифікованих організмів на навколишнє середовище. Багато в чому це залежить від ретельної оцінки безпеки всіх ГМО, що вивільняються в навколишнє середовище.

За оцінки ризиків можливих несприятливих екологічних наслідків вивільнення ГМО в навколишнє середовище насамперед беруть до уваги інформацію, що стосується біологічних особливостей організмів реципієнта і донора:

- систематичне положення, спосіб розмноження і розсіювання, виживання в навколишньому середовищі;
- географічне поширення, описування місць природного зростання;
- потенційна значуща взаємодія з організмами, що відмінні від

рослин (токсичність).

Особлива увага приділяється інформації, що відноситься до характеру генно-інженерної модифікації:

- опису вбудованого в геном (плазмон) реципієнтного організму фрагмента ДНК (розмір і джерело, передбачувана функція кожного складового елемента або району вбудованої ДНК, із включенням регулюючих й інших елементів, що впливають на функціонування трансгенів);
- даним про структуру і функціональну відповідність вбудованого фрагмента ДНК, присутності в ньому відомих потенційно небезпечних послідовностей, локалізації вставки і стабільності інкорпорації, кількості копій трансгенів.

Всебічному розгляду піддається інформація, стосовно біологічних особливостей ГМО і характеру взаємодії його з навколишнім середовищем, а саме:

- дані про нові ознаки і характеристики, що почали виявлятися або перестали виявлятися в генетично модифікованому організмі порівняно з реципієнтним організмом, особливо ті, які можуть здійснювати вплив на виживання, розмноження і поширення в потенційному приймаючому середовищі;
- відомості про генетичну стабільність ГМО, ступінь і рівень експресії трансгена(ів);
- активність і властивості протеїну(ів), що кодується трансгеном (нами);
- здібність до перенесення генетичної інформації (наявність у потенційному приймаючому середовищі диких або культурних родинних видів, здібних до гібридизації з ГМО, ймовірність перенесення трансгенів від ГМО до таких організмів);
- ймовірність конкурентної переваги генетично модифікованого організму порівняно з інтактним реципієнтним організмом, різкого збільшення чисельності популяції ГМО в потенційному приймаючому середовищі;
- відомості про організми-мішені й організми-немішені, передбачуваний механізм і результат взаємодії ГМО з ними.

Остаточний висновок про безпеку ГМО для навколишнього середовища здійснюється з урахуванням інформації, поданої вище, і характеристики потенційного приймаючого середовища:

- географічного положення ділянки, де здійснюватиметься вивільнення, близькості його до заповідників, заказників й

- інших природоохоронних об'єктів і територій;
- його розмірів, кліматичної, геологічної і ґрунтознавчої характеристики, флори і фауни.

## **10.6. Державне регулювання безпеки генно-інженерної діяльності**

До тих пір, поки є елемент наукової невизначеності відносно можливих несприятливих наслідків генно-інженерної діяльності для здоров'я людини і навколишнього середовища, вона, відповідно до принципу обережності, повинна регулюватися на державному рівні. Завдання ефективного державного регулювання полягає в тому, щоб забезпечити, з одного боку, максимально сприятливі умови для розвитку генетичної інженерії як одного з пріоритетних наукових напрямів і, з іншого боку, гарантувати безпеку при здійсненні і використанні результатів і продуктів генно-інженерної діяльності.

У більшості розвинених країн світу прийнято і ефективно функціонує спеціальне законодавство, що стосується біобезпеки, а також створені відповідні компетентні органи, які втілюють його в життя.

У системі міжнародних відносин питання біобезпеки вийшли останнім часом на перший план. У 2000 році країнами – Сторонами Конвенції про біологічну різноманітність (Україна є Стороною цієї Конвенції) прийнятий Картахенський протокол з біобезпеки, основна мета якого – «сприяння забезпеченню належного рівня захисту в області безпечної передачі, обороту і використання живих змінених організмів, що є результатом сучасної біотехнології, здатних виявляти несприятливу дію на зберігання і стійке використання біологічної різноманітності, з урахуванням також ризиків для здоров'я людини і з приділенням особливої уваги трансграничному переміщенню» (Картахенський протокол, стаття 1). Картахенський протокол набрав чинності 11 вересня 2003 року.

Основне положення Протоколу полягає у вимозі використовувати процедуру завчасної обґрунтованої згоди до першого трансграничного переміщення ГМО, що призначене для навмисного вивільнення в навколишнє середовище країни-імпортеру. Це означає, що будь-яка юридична або фізична особа, що має намір

ввезти в країну генетично модифікований організм (наприклад, насіння сільськогосподарських культур, що призначене для посіву), повинна завчасно інформувати про це компетентні органи країни-імпортеру, надавши відповідну інформацію про ГМО, місце і час його вивільнення. Ввезення ГМО здійснюється лише у разі отримання експортером дозволу країни-імпортеру, що видається після ретельного аналізу ризиків можливих несприятливих наслідків вивільнення ГМО для здоров'я людини і навколишнього середовища.

Живі організми, що потрапили в навколишнє середовище, не визнають кордонів між державами. Тому є можливість для ненавмисного трансграничного переміщення ГМО. У зв'язку з цим Сторони Протоколу беруть на себе зобов'язання вживання заходів щодо регулювання ризиків можливих несприятливих наслідків вивільнення ГМО в навколишнє середовище. У число таких заходів входить, перш за все, висунення вимоги щодо проведення оцінок ризиків до першого вивільнення в навколишнє середовище ГМО, створених у країні. Крім того, в Протоколі детально описані дії Сторін у разі ненавмисного вивільнення ГМО, які можуть виявляти значні несприятливі впливи на здоров'я людини і навколишнє середовище як у самій країні, так і в сусідніх країнах при переміщенні в них таких ГМО.

Кожна Сторона приймає необхідні правові, адміністративні й інші заходи для виконання своїх зобов'язань, передбачених рамками Протоколу. Йдеться, зокрема, про розробку і ухвалення відповідного законодавства, що регулює безпеку генно-інженерної діяльності, створення адміністративних структур (або наділення відповідними повноваженнями тих, що вже існують), відповідальних за реалізацію цього законодавства. Таким чином, приєднання до Картахенського протоколу будь-якої країни не лише забезпечує можливість врегулювання питань, пов'язаних з експортом та імпортом ГМО, а й створює передумови для національної системи біобезпеки, яка є найважливішим атрибутом ефективного і безпечного використання досягнень сучасних біотехнологій, розвитку генетичної інженерії як одного з найбільш перспективних наукових напрямів.

В Україні прийнято в новій редакції Закон «Про безпечність санітарного та епідеміологічного благополуччя населення» № 3037-III від 07.02.2002 р., в якому визначено фактори середовища життєдіяльності людини, в тому числі генетично модифіковані організми і продукти біотехнології.

Постановою Кабінету Міністрів України № 1217 від 19.08.2002р. затверджено «Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд». Одним з пріоритетних завдань санітарно-епідеміологічної служби є видача дозволів на розроблення та виробництво нових видів продуктів харчування, а також на право роботи із рекомбінантними молекулами ДНК і на виробництво, зберігання, транспортування, використання, захоронення, знищення і утилізацію продуктів біотехнології та інших біологічних агентів.

Закон України «Про внесення змін до Закону України «Про якість та безпеку харчових продуктів і продовольчої сировини» № 191-IV від 24.10.2002 р. дає визначення нового продукту і нової продовольчої сировини, в тому числі виготовлених методами генної інженерії. У цьому законі зазначається, що обіг нового харчового продукту, що вміщує генетично модифіковані організми, складається або виробляється з них, регулюється положеннями спеціального законодавства.

31 травня 2007 р. Президент України підписав Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», регулюванню яким підлягають:

- генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у замкненій системі (замкнена система – це здійснення генетично-інженерної діяльності, що запобігає контакту з населенням та навколишнім середовищем, наприклад, дослідження організмів з науковою метою);
- генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у відкритій системі (відкрита система – це здійснення генетично-інженерної діяльності, що передбачає контакт генетично модифікованих організмів з населенням та навколишнім середовищем, при запланованому вивільненні їх у навколишнє середовище, застосуванні у сільськогосподарській практиці, промисловості, медицині та в природоохоронних цілях, передачі технологій та інших сфер обігу генетично модифікованих організмів;
- державна реєстрація генетично модифікованих організмів та продукції, виробленої з її використанням;
- уведення в обіг генетично модифікованих організмів та продукції, виробленої з їх використанням;
- експорт, імпорт та транзит генетично модифікованих організмів.

З метою забезпечення виконання закону визначено



повноваження Кабінету Міністрів України, центральних органів виконавчої влади з питань освіти і науки, екології та природних ресурсів, охорони здоров'я, аграрної політики.

Увезення та транзит генетично модифікованих організмів повинно суворо контролюватися; дозвіл на ввезення, порядок увезення встановлюється Кабінетом Міністрів України, а дозвіл на транзитне переміщення незареєстрованих в Україні генетично модифікованих організмів надається центральним органом виконавчої влади з питань екології та природних ресурсів у порядку, встановленому Кабінетом Міністрів України.

Чималий асортимент продуктів харчування в даний час отримують, застосовуючи методику генної інженерії. У Додатку 9 до СанПіН 2.3.2.1078-01 «Гігієнічні вимоги безпеки і харчової цінності продуктів харчування» (Росія) наведено трактування терміну «генетично модифіковані джерела їжі». Так називають продукти харчування (компоненти), що використовуються людиною в їжу у натуральному або переробленому виді, що отримані з генетично модифікованих організмів. У таблиці 14 надано продукти харчування, отримані з генетично модифікованих джерел (використано дані Додатка 4 СанПіН 2.3.2.1078-01).

А генетично модифіковані організми, згідно з Додатком 9, – це організм або декілька організмів, будь-які неклітинні, одноклітинні або багатоклітинні утворення, здібні до відтворення або передачі спадкового генетичного матеріалу, відмінні від природних організмів, одержані із застосуванням методів генної інженерії й такі, що містять генно-інженерний матеріал, у т.ч. гени, їх фрагменти або комбінація генів.

Продукти харчування, вироблені за допомогою сучасної біотехнології, можна віднести до таких категорій:

1. Продукти харчування, що складаються з живих життєздатних організмів або містять хімічні речовини, наприклад, кукурудза.
2. Продукти харчування, що виділяються з ГМО, або містять інгредієнти, що виділяються з ГМО, наприклад, борошно, харчові білки або олія, що отримується з ГМ сої.
3. Продукти харчування, що містять окремі інгредієнти або добавки, синтезовані ГМ мікроорганізмами (ГММ), наприклад, барвники, вітаміни та незамінні амінокислоти.
4. Продукти харчування, що містять інгредієнти, оброблені ферментами, що синтезуються ГММ, наприклад, кукурудзяний

сироп з високим вмістом фруктози, що виготовляється з крохмалю за допомогою фермента глюкозоізомерази.

Таблиця 14

### Продукти харчування, що отримані з ГМО

№	Назва продуктів харчування
<b><i>Продукти харчування, що підлягають етикетуванню</i></b>	
1	Соєві боби
2	Концентрат соєвого білка та його текстурати
3	Ізолят соєвого білка
4	Гідролізат соєвого білка
5	Соєве борошно і його текстурати
6	Соєве молоко, в тому числі сухе
7	Ферментовані продукти із сої
8	Соєвий соус
9	Тофу
10	Кукурудза для безпосереднього використання в їжі (борошно, крупа)
11	Кукурудза заморожена і консервована
12	Попкорн
13	Картопля для споживання
14	Пюре картопляне сухе
15	Картопляні чіпси
16	Томати для безпосереднього споживання
17	Томатна паста
18	Томатний сік
19	Томатні соуси, кетчупи
20	Кабачки і продукти з них або з їх використанням
21	Дині і продукти з них або з їх використанням
22	Продукти, що містять цикорій
23	Харчові добавки, що вироблені з ГМО
24	Біологічно-активні харчові добавки, що містять ГМО
<b><i>Продукти харчування, що не підлягають етикетуванню</i></b>	
1	Соєва і кукурудзяна олія рафінована
2	Соєвий лецитин
3	Фруктоза, отримана із сої, кукурудзи, цукрового буряку
4	Кукурудзяний крохмаль
5	Глюкоза, отримана з кукурудзи, цукрового буряку, картоплі
6	Патока, отримана з кукурудзи, картоплі
7	Рапсове, льняне і бавовняна олія

У СанПіН 2.3.2.1078-01 вказано: «Для продуктів харчування з генетично модифікованих джерел обов'язкова інформація: «генетично модифікована продукція», або «продукція, отримана з генетично модифікованих джерел», або «продукція містить компоненти з генетично модифікованих джерел» (для продуктів, що містять більше 5% компонентів ГМО). Продукти харчування, що отримані з ГМО і не містять дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і білок, в додатковому етикетуванні не мають потреби у разі повної еквівалентності харчової цінності продукту традиційному аналогу.

### ***Контрольні запитання***

1. Якими агрономічно важливими характеристиками володіють сучасні генно-модифіковані сорти рослин?
2. Якими поліпшеними поживними якістьями володіють ГМ культури?
3. Які напрями створення ГМ риб розробляються в наш час?
4. Які етапи включає методика оцінки ризиків можливих несприятливих ефектів ГМО?
5. Які можливі несприятливі ефекти ГМО на навколишнє середовище?

## СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

**Аберация хромосомна** (або хромосомна аномалія) – узагальнена назва будь-якого з типів хромосомних мутацій: делеції, транслокацій, інверсій, дуплікації. Іноді також позначають і геномні мутації (анеуплодії, трисомії й т.ін.).

**Авторадіографія** – спосіб виявлення речовини, міченої радіоактивним ізотопом, шляхом накладення на чутливу плівку.

**Адгезія** – з'єднання клітин між собою і субстратом, що пригнічує процеси росту клітин.

**Ад'юванти** – це сполуки, які при введенні в організм викликають неспецифічне збільшення імунної відповіді і тим самим підвищують здатність організму реагувати на будь-який імуноген.

**Аеробні мікроорганізми** – мікроорганізми, що ростуть лише за наявності кисню.

**Алель** – одна з двох або більше альтернативних форм гена, кожна з яких характеризується унікальною послідовністю нуклеотидів; алелі, як правило, відрізняються послідовностями нуклеотидів.

**Алель дикого типу** (нормальний) – мутація гена, не зачіпає його функції.

**Алель домігантний** – алель, одна доза якого достатня для його фенотипового прояву.

**Алель мутантний** – мутація гена, що порушує його функцію.

**Алель рецесивний** – алель, фенотипічно проявляється тільки у гомозиготному стані й маскується в присутності домігантного алеля.

**Алополіплоїдія** – мутація, в результаті якої відбувається об'єднання за гібридизації цілих неспоріднених геномів.

**Альтернативний сплайсинг** – з'єднання екзонів певного гена в різних комбінаціях з утворенням зрілих молекул іРНК, що розрізняються між собою.

**Аміноацил-тРНК** – молекула РНК, до 3'-кінця якої приєднана специфічна амінокислота.

**Амплікони** – позахромосомна одиниця ампліфікації.

**Ампліфікатор ДНК** (термоциклер) – прилад, необхідний для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); дозволяє задавати потрібну кількість циклів і вибирати оптимальні тимчасові

та температурні параметри для кожної процедури циклу.

**Ампліфікація** – збільшення числа копій генів (кількості ДНК).

**Ампліфікація ДНК** – вибіркове копіювання певної ділянки ДНК.

**Амфідиплоїди** – еукаріотичні клітини, що містять два подвійних набори хромосом внаслідок об'єднання двох геномів.

**Анаеробні мікроорганізми** – мікроорганізми, що ростуть без кисню.

**Андрогенез** – на відміну від справжнього партеногенезу (див. партеногенез), після активації жіночої гаметі спермієм весь жіночий генетичний матеріал заплідненої яйцеклітини елімінується, і тому ембріон містить лише батьківський набір хромосом. У цьому разі зигота, а потім і ембріон розвиваються тільки за участю набору хромосом чоловічого ядра.

**Анеуплоїдія** – змінений набір хромосом, в якому одна або кілька хромосом із звичайного набору або відсутні, або представлені додатковими копіями.

**Антибіотик** – речовина, що пригнічує ріст клітин або вбиває їх. Зазвичай антибіотики блокують одну зі стадій синтезу білків або нуклеїнових кислот.

**Антиген** – речовина (зазвичай білки, рідше полісахариди), що викликає у тварин імунну відповідь (утворення антитіл).

**Антигенна детермінанта** (епітоп) – ділянка білкової або полісахаридної молекули, що володіє здатністю викликати утворення антитіл певної специфічності.

**Антикодон** – послідовність з трьох суміжно розташованих нуклеотидів у молекулі транспортної РНК, комплементарна триплету (кодону) в молекулі іРНК, що кодує амінокислоту.

**Антимутагенез** – процес запобігання закріплення (становлення) мутації, тобто повернення первинно пошкодженої хромосоми або гена в початковий стан.

**Антисмислова РНК** – РНК-послідовність, що комплементарна будь-якій ділянці або всій молекулі специфічній мРНК.

**Антитіло** – білок (імуноглобулін), утворений імунною системою організму тварин у відповідь на введення антигена і здатний вступати з ним у специфічну взаємодію.

**Апоптоз** – процес саморуйнування клітин. Апоптоз є одним із проявів принципу самоочищення організму, коли для становлення та збереження цілісності багатоклітинний організм жертвує невеликою

частиною своїх соматичних клітин.

**Асцитна пухлина** – злоякісна пухлина черевної порожнини у мишей у вигляді клітин, що є в звісі у внутрішньочеревній рідині.

**Атенуація** – утворення за певних умов термінуючого сигналу.

**Атенуїзовані вакцини** – вакцини, що створюють на основі вбитих (інактивованих) або живих, але невірулентних штамів патогенних мікроорганізмів.

**Ауксотрофні клітини** – клітини, що позбавлені можливості синтезувати певну речовину, яка необхідна для їх росту, але за наявності цієї речовини у середовищі такі клітини можуть рости і розвиватися.

**Аутополіплоїдія** – мутація, для якої характерне адекватне збільшення числа хромосом власного геному, кратне  $2n$ .

**Аутосома** – будь-яка нестатева хромосома. Наприклад, у людини є 22 пари аутосом, а в *bos taurus* – 29.

**Аутосомно-домінантне успадкування** – тип успадкування, за якого одного мутантного алеля, локалізованого в аутосомі, достатньо, щоб хвороба (або ознака) могла бути виражена.

**Аутосомно-рецесивне успадкування** – тип успадкування ознаки або хвороби, за якого мутантний алель, локалізований в аутосомі, повинен бути успадкований від обох батьків.

**Бактеріофаг (фаг)** – вірус бактерій: складається з ДНК або РНК, упакованої в білкову оболонку.

**Балістична трансфекція** – введення ДНК у клітину рослинного або тваринного походження за допомогою вольфрамових або золотих кульок. ДНК осаджують, наносять на кульки і «обстрілюють» ними клітини.

**Банк (бібліотека) генів** – повний набір генів даного організму, отриманий у складі рекомбінантних ДНК.

**Білкова інженерія** – створення штучних білків із заданими властивостями шляхом спрямованих змін (мутацій) у генах або шляхом обміну локусами між гетерологічними генами.

**Білок одноклітинних організмів, БОО** – білкові продукти, що синтезуються монокультурою мікроорганізмів і використовуються як кормові добавки до раціону тварин.

**Білок-репресор** – білок, що здатний зв'язуватися із оператором на ДНК або РНК, запобігаючи, відповідно, транскрипції або трансляції.

**Біобезпека** – безпека генно-інженерної діяльності.

**Біогаз** – суміш горючого газу метану (70-80%), оксиду вуглецю (до 30%) та незначної кількості домішок – водню, сірководню, азоту.

**Біогумус** – органічне високоефективне добриво, отримане під час обробки органічних відходів дощовими черв'яками.

**Біодеградація** – процес розкладання матеріалів на більш прості, звичайно хімічні складові під дією живих організмів (наприклад, руйнування речовин, що забруднюють навколишнє середовище, за допомогою живих мікроорганізмів).

**Біоконверсія** – трансформація речовин із однієї форми в іншу біологічними агентами (живими організмами або ферментами).

**Біоконтроль** – процес, в якому використовуються живі організми для обмеження росту і розвитку патогенних мікроорганізмів.

**Біомаса** – 1) клітинна маса, що створюється в результаті життєдіяльності живих організмів; 2) органічна речовина, що може використовуватися як джерело енергії або хімічних сполук.

**Біореактор, ферментер** – пристрій, в якому здійснюються біохімічні реакції за участю живих організмів, клітинних екстрактів або ферментів.

**Біосинтез** – утворення складних сполук із більш простих за допомогою ферментів.

**Біофармінг** – процес одержання з молока трансгенних домашніх тварин білків людини або фармацевтичних препаратів.

**Блот-гібридизація за Саузерном** – метод ідентифікації ділянок ДНК, що містять комплементарні ДНК-зонду послідовності, серед електрофоретичних розподілених фрагментів ДНК, фіксованих на твердому матриці (нітроцелюлозних або нейлонових фільтрах).

**Блотинг** – перенесення розподілених молекул ДНК, РНК або білка з одного середовища (наприклад, з гелю), в якому проходив електрофорез, на твердий носій (папір, нітроцелюлозний фільтр).

**Вакцина** – препарат ослабленого або вбитого інфекційного агента (вірусу, бактерії й ін.) або його окремих компонентів, що несуть антигенні детермінанти, здатний викликати утворення імунітету до даної інфекції у тварин (людини).

**Вектор** – молекула ДНК, здатна до включення чужорідної ДНК і до автономної реплікації, що є інструментом для введення генетичної інформації в клітку.

**Вектор для клонування** – будь-яка невелика плазміда, фаг або ДНК вірусу тварин, у які може бути вбудована чужорідна вірусна ДНК.

**Виродженість генетичного коду** – особливість, яка означає, що одну і й ту саму амінокислоту кодують кілька кодонів.

**Відпал** – процес утворення дволанцюгових молекул (ДНК-ДНК або ДНК-РНК) з поодиноких полінуклеотидних комплементарних ланцюгів.

**Віріон** – вірусна часточка.

**Вірулентність** – характеристика патогенності мікроорганізму.

**Віруси** – інфекційні агенти неклітинної природи, здатні в процесі реалізації генетичної інформації, закодованої в їх геномі, перебудувати метаболізм клітини, спрямувавши його у бік синтезу вірусних часточок.

**Вітрифікація** – кріоконсервації ембріонів ссавців з використанням суміші є високою концентрацією проникаючих (внутрішніх) кріопротекторів, які за низьких температур стають желеподібними і в результаті застигають у склоподібній формі.

**β-галактозидаза** – фермент, що гідролізує β-галактозиди, зокрема лактозу, з утворенням вільної галактози.

**Гамета** – зріла статеві клітина.

**Гаплоїд** – клітина, що містить одинарний набір генів або хромосом.

**Ген** – послідовність нуклеотидів в ДНК, що обумовлює певну функцію в організмі або забезпечує транскрипцію іншого гена.

**Генетична карта** – схема розташування структурних генів і регуляторних елементів у хромосомі.

**Генетичний код** – відповідність між триплетами в ДНК (або РНК) і амінокислотами білків.

**Генна інженерія** – сукупність прийомів, методів і технологій одержання рекомбінантних РНК і ДНК, виділення генів з організму (клітин), здійснення маніпуляцій з генами і введення їх в інші організми.

**Генна терапія** – введення генетичного матеріалу (ДНК або РНК) в клітку, функцію якої він змінює (або функцію організму).

**Геном** – загальна генетична інформація, що міститься в генах організму, або генетичний склад клітини. Термін геном іноді використовується для позначення гаплоїдного набору хромосом.



**Генотип** – 1) вся генетична інформація організму; 2) генетична характеристика організму за одним або декількам локусами, що вивчаються.

**Ген-регулятор** – ген, що кодує регуляторний білок, який активує або пригнічує транскрипцію інших генів.

**Ген-репортер** (див. маркерний ген) – ген, продукт якого визначається за допомогою простих і чутливих методів, а його активність у клітинах, що тестуються, в нормі відсутня. Використовується в генно-інженерних конструкціях для маркування цільового продукту.

**Ген-підсилювач (енхансер)** – короткий сегмент ДНК, що впливає на рівень експресії генів, що примикають до нього, збільшуючи частоту ініціації і транскрипції.

**Гетерозигота** – клітина (або організм), що містить два різних алеля в конкретному локусі гомологічних хромосом.

**Гетерозиготність** – наявність різних алелей в диплоїдній клітині.

**Гетерозиготний організм** – організм, що має дві різні форми даного гена (різні алелі) у гомологічних хромосомах.

**Гетерокаріозис** – існування різнорідних ядер в одній клітині.

**Гетерокаріони** – багатоядерні клітини, до складу яких входять ядра різних батьківських типів.

**Гетерохроматин** – частина хромосоми (іноді ціла хромосома), що має щільну структуру компактну в інтерфазі.

**Гібриди внутрішньовидові** – гібриди, що створилися за злиття клітин одного виду (наприклад, мишачі фібробласти і мишачі лімфобласти), розрізняються між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями.

**Гібриди міжвидові** – гібриди, що створилися за злиття клітин тварин різних видів (наприклад, миша/людина, хом'як/курка, комар/людина), відрізняються від початкових батьківських клітин, у першу чергу, генотипово.

**Гібридизація *in situ*** – гібридизація міжденатурованої ДНК клітин на предметному склі та міченої радіоактивними ізотопами або імуофлуоресцентними сполуками одноланцюговими РНК або ДНК.

**Гібридизація ДНК** – утворення в процесі дослідження дволанцюгової ДНК або дуплексів ДНК:РНК в результаті взаємодії комплементарних нуклеотидів.

**Гібридизація соматичних клітин** – злиття нестатевих клітин, спосіб отримання соматичних гібридів (див.).

**Гібридний білок, химерний білок (поліпептид)** – продукт клонованих сумісно двох або більше послідовностей різних генів, що здатні кодувати білок. Синтезується у вигляді одного поліпептидного ланцюга.

**Гібридоми** – гібридні лімфоїдні клітини, отримані шляхом злиття пухлинної мієломної клітини (див.) з нормальними лімфоїдними клітинами імунізованих тварини або людини. Володіє здатністю до необмеженого росту і синтезу моноклональних антитіл.

**Гіногенез** – розвиток ембріона без участі хромосом спермія. Спермій проникає в яйцеклітину, але функція його полягає лише в її активації.

**Глікозилювання** – приєднання до білка вуглеводного залишку.

**ГМО (генетично модифіковані організми)** – це організм або декілька організмів, будь-які неклітинні, одноклітинні або багатоклітинні утворення, здатні до відтворення або передачі спадкового генетичного матеріалу, відмінні від природних організмів, одержані із застосуванням методів генної інженерії і такі, що містять генно-інженерний матеріал, у т.ч. гени, їх фрагменти або комбінацію генів.

**Гомозигота** – клітина (або організм), що містить два однакових алеля в конкретному локусі гомологічних хромосом.

**Гомозиготність** – наявність однакових алелей у диплоїдній клітині.

**Гомозиготний організм** – організм, що має дві ідентичні копії даного гена в гомологічних хромосомах.

**Гомокаріони** – багатоядерні клітини, що містять ядра тільки одного клітинного типу.

**Гомологічні хромосоми** – хромосоми, однакові за набором генів, з яких складаються.

**Група зчеплення** – всі гени, локалізовані в одній хромосомі.

**Дактилоскопія гена** – виявлення варіацій у числі та довжині тандемних повторів ДНК.

**Дальтон** – одиниця виміру молекулярної маси (м.м.) ДНК або поліпептиду;  $1\text{Д} = 1,66 \times 10^{-27}$  кг, середня м.м. однієї пари нуклеотидних залишків у ДНК має м.м. 650Д, 1 т.п.н. ДНК кодує поліпептид з м.м. 37000Д; поліпептид з м.м. 10000Д кодується 270 п.н.

**Делеція** – тип хромосомної мутації, за якою втрачається ділянка хромосоми; тип генної мутації, за якою випадає ділянка молекули ДНК.

**Денатурація** – 1) роз'єднання ланцюгів дволанцюгової молекули ДНК або РНК; 2) порушення просторової структури молекули внаслідок розриву внутрішньо- або міжмолекулярних нековалентних зв'язків.

**Дидезоксинуклеотид, ddNTP** – отриманий штучним шляхом нуклеотид, позбавлений 2'- і 3'-гідроксильних груп при вуглеводних атомах цукрового кільця. Приєднання цього нуклеотиду до ланцюга ДНК, що росте, зупиняє синтез ДНК.

**Дикаріозис** – окреме існування двох ядер в одній клітині, здатних до одночасного подвоєння та імітування диплоїдного ядра.

**Диплоїд** – організм, клітини якого містять два гомологічних набори хромосом.

**ДНК-полімераза** – фермент, що здійснює матричний синтез ДНК.

**ДНК-зонд** – фрагмент ДНК, що має певну мітку і використовується для гібридизації із специфічною ділянкою в молекулі ДНК. Дозволяє ідентифікувати нуклеотидні послідовності, що комплементарні до нього.

**ДНК-лігаза** – фермент, що каталізує утворення фосфодиефірного зв'язку між 3'-гідроксильною групою і 5'-фосфатом сусідніх нуклеотидів у місці одноланцюгового розриву молекули ДНК.

**ДНК-полімераза** – фермент, що каталізує синтез полінуклеотидного ланцюга з окремих нуклеотидів з використанням іншого ланцюга як матриці і ДНК-затравки із вільною 3'-ОН-групою.

**Довгі кінцеві повтори, LTR (long terminal repeats)** – послідовності, що повторюються на кінцях ДНК-копії генома ретровірусів.

**Домен** – ділянка поліпептидного ланцюга, що виконує певну функцію (наприклад, цитоплазматичний домен, трансмембранний домен).

**Домінантність** – переважне участь тільки одного алелю у формуванні ознаки в гетерозиготній клітині.

**Домінантний** – ознака або відповідний алель, що проявляється у гетерозигот.

**Дрейф генів** – зміна частот генів у ряду поколінь, що обумовлена випадковими подіями мітозу, запліднення та розмноження.

**Дуплікація генів** – тип хромосомної мутації, за якої здійснюється подвоєння будь-якої ділянки хромосоми; тип генної мутації, коли здійснюється подвоєння будь-якої ділянки ДНК.

**Еквілібрація** – процес поступового насичення ембріонів розчином кріопротектора.

**Екзон** – ділянка гена, що входить до складу первинного транскрипту, яка зберігається після процесингу (вирізування інтронів). Поряд з іншими екзонами створює зрілу іРНК.

**Екзонуклеаза** – фермент, що гідролізує фосфодієфірні зв'язки з кінців ДНК.

**Експресія гена** – процес реалізації інформації, закодованої в гені. Складається з двох основних стадій – транскрипції та трансляції.

**Електропорація** – утворення пор у клітинних мембранах під впливом електричного струму. Через ці пори у клітини потрапляє чужорідна ДНК.

**Електрофорез** – розподіл електрично заряджених полімерів в електричному полі. Зазвичай ведеться в гелях (гель-електрофорез), щоб зони молекул, що розподіляються, не розмивалися тепловим рухом.

**Елімінація** – вибіркове знищення окремих організмів (клітин) або груп організмів (клітин).

**Елонгація** – послідовне приєднання мономерів до полімерного ланцюга.

**Ембріобанк** – банк для збереження генофонду локальних порід. У банку створюють запас ембріонів як мінімум від 25 неспоріднених між собою бугаїв і 150-200 корів.

**Ембріональні стовбурові клітини, ES-клітини** – клітини ембріонів на стадії бластоцисти, що здатні до диференціювання в будь-які типи клітин, у тому числі й у клітини зародкової лінії, під час уведення в інший ембріон на стадії бластоцисти.

**Ендонуклеази** – фермент, що гідролізує фосфодієфірні зв'язки всередині ланцюга ДНК. Ендонуклеази беруть участь в рекомбінації, репарації, рестрикції: в останньому випадку мають назву рестриктази.

**Енхансер** – регуляторна ділянка ДНК, що підсилює рівень транскрипції генів, розташованих на тій самій молекулі ДНК.

**Епітоп** – див. антигенні детермінанти.

**Еукаріоти** – організми, клітини яких містять ядра; у цитоплазмі присутні різні органели – мітохондрії, хлоропласти та ін. До еукаріот належать тварини, рослини, гриби, деякі водорості.

**Ефектор** – невелика молекула, що зв'язується із репресором або ферментом і викликає їх пригнічення або активацію.

**Ємність вектора** – максимальний розмір ділянки ДНК, яка може бути клонована у даному векторі.

**Зворотна транскриптаза (ревертаза)** – РНК-залежна ДНК-полімераза, що використовує молекулу РНК як матрицю для синтезу комплементарного ланцюга ДНК.

**Зона пелюциду** – прозора оболонка, що вкриває ооцит, на поверхні якої розташовані рецептори для розпізнавання сперміями; після запліднення сприяє процесу прикріплення у статевих шляхах самки.

**Зонд генетичний** – короткий відрізок ДНК або РНК відомої структури або функції, позначений якою-небудь радіоактивною або флуоресцентною сполукою, використовується для виявлення комплементарних послідовностей за допомогою гібридизації.

**Імобілізація** – фіксація низькомолекулярних сполук, макромолекул, клітинних органел або клітин на певному носії.

**Імобілізований фермент** – фермент, приєднаний тим чи іншим способом (фізичним або хімічним) до інертної, звичайно нерозчинної підкладки або носія.

**Імунітет** – несприйнятливність організму до інфекційних агентів типу вірусів і мікробів.

**Імунна відповідь** – сукупність фізіологічних процесів в організмі, що здійснюються у відповідь на потрапляння чужорідних антигенів.

**Імуногенність** – здатність індукувати в організмі біосинтез антитіл.

**Імуноглобуліни** – білки (антитіла), синтез яких індукований дією на організм певним антигеном, здатні специфічно поєднуватися з чужорідними речовинами (антигенами).

**Імунологічний аналіз** – метод, заснований на здатності антитіла розпізнавати специфічний компонент у біологічному зразку.

**Імунологічний скринінг** – скринінг геномної бібліотеки, заснований на виявленні продукту гена-мішені імунологічними методами. Здійснюється за відсутності відповідного ДНК-зонду.

**Імуносупресія** – втрата здатності імунної системи організму до імунної відповіді на дію певного антигена.

**Імунотоксин** – химерний білок, що складається з двох доменів, один з яких володіє властивостями антитіла, а інший – токсину. Перший домен забезпечує зв'язування химерного білка із специфічною молекулою або клітиною, а другий інактивує молекулу-мішень або вбиває клітину.

**Імуноферментний аналіз (ІФА)** – процес утворення кон'югату (сполуки) відомого антитіла і ферменту та наступного приєднання отриманої комплексної сполуки до антигена.

**Імунофлуоресцентний зонд** – див. зонд генетичний.

**Інверсія** – зміна орієнтації сегментів хромосом в окремих хромосомах.

**Інгібітор** – хімічна сполука, взаємодія якої з ферментами супроводжується блокуванням певного етапу біохімічного перетворення.

**Індуктор** – невелика молекула, що зв'язується з регуляторним білком-репресором і запобігає його з'єднанню з геном-оператором, внаслідок чого відбувається поновлення процесу транскрипції.

**Індукція профага** – ініціювання вегетативного розвитку фага в лізогенних клітинах.

**Інженерна ензимологія** – система методів отримання, очищення, стабілізації і застосування ферментів.

**Ініціація** – початок синтезу біополімера.

**Ініціюючий кодон** – кодон AUG у складі іРНК, що кодує метионін, з якого починається (ініціюється) синтез поліпептидних ланцюгів. Інша назва – сигнал ініціації трансляції.

**Інтеграза** – фермент, що здійснює впровадження будь-якого генетичного елемента в геном через специфічний сайт.

**Інтеграція** – вбудування чужорідної ДНК (звичайно за допомогою гомологічної рекомбінації) в хромосому клітини-господаря.

**Інтегрони** – генетичні елементи, які містять у собі ген інтегрази, специфічний сайт і поруч з ним промотор, що надає їм здатність інтегрувати в собі мобільні генні касети і експресувати присутні в них безпромоторні гени.

**Інтерферони** – білки, що синтезуються клітинами хребетних у відповідь на вірусну інфекцію і пригнічують її розвиток.

**Інtron** – некодуєча ділянка гена, яка транскрибується, а потім видаляється з попередника іРНК при сплайсингу (див. сплайсинг).

**Інтронований ген** – ген, що містить інтрони.

**Кавітація** – процес утворення порожнини, тобто формування бластоцисти.

**Калюс** – маса недиференційованих клітин, що утворюється за пошкодження рослини. Може утворюватися з поодиноких клітин за їх культивування на штучних середовищах.

**Капацитація** – деякі фізіологічні зміни, що повинні відбутися в спермії до того, як він набуде здатності до запліднення. Капацитація включає початкову зміну мембрани спермія, що дозволяє йому пройти другу фазу (акросомну реакцію).

**Капсид** – білкова оболонка вірусу.

**Каріопласт** – ядро, оточене вузькою облямівкою цитоплазми і плазматичною мембраною.

**Каріотип** – набір хромосом, що є характерним для виду, особини або клітини.

**Картирування генів** – визначення положення певного гена на хромосомі відносно інших генів.

**Клітини зародкової лінії** – клітини, що поступово перетворюються на гамети (від первинних статевих клітин до певно гамет).

**Клітинна інженерія** – метод конструювання, спрямований на добування нової генетичної інформації за допомогою гібридизації і реконструкції клітин, що є у культурі.

**Клітинна лінія** – група клітин, що підтримується у культурі шляхом пересівання.

**Клітинна популяція** – група однорідних за певним показником клітин (у культурі або в тканинах).

**Клітинний розподіл** – форма розмноження (подвоєння) клітин, яка перебігає у вигляді перешнуровування (у бактерій) або мітозу.

**Клон** – група генетично ідентичних клітин, що виникли нестатевим шляхом від загального предка.

**Клонування** – сукупність процедур, які використовують для отримання клонів. Клонування полягає у принципово новому методі відтворення тварин, коли ембріон утворюється не шляхом запліднення жіночої статевої клітини чоловічою, а внаслідок пересадки ядра з диплоїдним набором хромосом у яйцеклітину, з якої вилучено власний генетичний матеріал.

**Клонування генів** – система методів, що використовується для отримання клонованої ДНК: виділення потрібного гена з певного організму, вбудування його в плазмину (вектор), введення в клітину організму-господаря, чисельна реплікація.

**Клонування ембріональне** – донорами ядер для пересадки в яйцеклітину є ранні зародки. До ембріонального клонування можна віднести і таке, коли донорами ядер є ембріональні стовбурні клітини (ЕСК).

**Клонування клітин** – їх поділ шляхом розсівання на поживному агарі та отримання колоній, що містять потомство від ізольованої клітини.

**Клонування соматичне** – донорами ядер для пересадки в запліднену яйцеклітину з видаленим власним пронуклеусом є соматичні клітини дорослого організму.

**Кодон** – трійка розташованих підряд нуклеотидів у молекулі іРНК, що кодує певну амінокислоту, або є сигналом початку, закінчення трансляції.

**Колінеарність** – відповідність між послідовністю нуклеотидів у молекулі ДНК і послідовністю амінокислот у молекулі білка.

**Компактизація** – процес, коли половинки ембріонів набувають кулькоподібної форми за культивування на поживному середовищі.

**Компетентність** – здатність клітин до трансформації (адсорбувати і поглинати чужорідну ДНК).

**Комплементарна ДНК, кДНК** – одноланцюгова ДНК, синтезована *in vivo* на основі РНК-матриці за допомогою зворотної транскриптази.

**Компліментарність (у генетиці)** – властивість азотистих основ утворювати за допомогою водневих зв'язків парні комплекси аденін-тимін (або урацил) і гуанін-цитозин за взаємодії ланцюгів нуклеїнових кислот.

**Конститутивні мутанти** – утворюються при здійсненні мутацій в гені-регуляторі або гені-операторі внаслідок чого в клітині або організмі відбувається постійний синтез РНК чи будт-якого білка.

**Контактне гальмування** – регуляція клітинного росту, що залежить від кількості клітин на одиниці площі.

**Кон'югат** – комплекс із декількох ковалентно пов'язаних молекул.

**Кон'югативні плазмиди** – плазмиди, що здатні переходити від однієї клітини до іншої в процесі кон'югації.



**Кон'югація** – спосіб обміну генетичною інформацією у бактерій, під час якої внаслідок фізичного контакту між клітинами відбувається перенесення клітинної, плазмідної ДНК або ДНК транспозона від донорської клітини до реципієнтної.

**Косміда** – вектор, що поєднує властивості плазмідного вектора і вектора на основі фага  $\lambda$ . Містить *cos*-сайти.

**Кріоконсервація ембріонів** – глибоке заморожування ембріонів у рідкому азоті з метою тривалого зберігання.

**Кріопротектори** – речовини, використання яких дозволяє запобігти утворенню кристаликів льоду і виникненню осмотичного шоку – проблем, що спостерігаються в процесі заморожування ембріонів.

**Кріотрансформація** – метод індукції компетентності клітин за рахунок глибокого заморожування з наступним відтаюванням клітин, що забезпечує збільшення проникності для фагової, плазмідної і хромосомної ДНК.

**Культура** – популяція клітин або мікроорганізмів, що вирощуються *in vitro* в умовах постійного контролю.

**Культура клітин** – (суспензійна культура) – вирощування окремих клітин та невеликих їх груп у суспендованому стані в рідкому середовищі та при застосуванні апаратури, що забезпечує їх аерацію та перемішування.

**Культура тканин** – метод збереження життєздатності тканин або цілих органів (культура органу), чи окремих клітин (культура клітин) поза організмом *in vitro*.

**Липкі кінці** – комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, розташовані на кінцях молекули ДНК.

**Лігаза** – фермент, що усуває розриви в молекулі ДНК утворенням фосфодієфірних зв'язків між двома полінуклеотидами.

**Лігирування** – з'єднання двох молекул ДНК за допомогою фосфодієфірних зв'язків. *In vitro* каталітичний вплив має фермент ДНК-лігаза фага T4.

**Лігноцелюлоза** – комплекс лігніну, геміцелюлози і целюлози, що створює структурний каркас клітинної стінки рослин.

**Лізис** – розпад клітини, викликаний руйнуванням її оболонки.

**Лізогенія** – інтеграція генома бактеріофага в геном клітини-господаря. Фаг може зберігатися бактеріальними клітинами у вигляді профага (див. профаг). У результаті індукції вірусна ДНК може відщеплюватися з утворення зрілих фагових часточок.

**Лінія клітин** – генетично однорідні клітини тварин чи рослин, які можливо вирощувати *in vitro* протягом необмежено тривалого часу.

**Лінкер** – короткий синтетичний олігонуклеотид, що застосовується для з'єднання фрагментів ДНК *in vitro*; звичайно містить ділянку розпізнавання певною рестриктазою (див. сайт рестрикції).

**Ліпкі кінці** – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, що виступають на кінцях дволанцюгової молекули; утворюються внаслідок розрізання дволанцюгової ДНК зсувом.

**Літичний цикл розвитку фага** – фаза життєвого циклу фага, що починається інфекцією клітини і завершується її лізисом.

**Локус** – ділянка ДНК (хромосоми), де розташований певний ген.

**Макромолекула** – полімер з молекулярною масою від декількох тисяч до сотні млн. дальтон (див.) (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди та ін.).

**Макрофаг** – великий лейкоцит, здатний до фагоцитозу (захоплення, поглинання і наступного розщеплення бактерій, уламків клітин та інших чужорідних або токсичних для організму частинок).

**Маркерний ген** – ген з відомою хромосомною локалізацією, що кодує селективну ознаку (стійкість до антибіотиків, ферментативну активність та ін.).

**Матрична РНК, іРНК** – молекула РНК, що містить інформацію щодо амінокислотної послідовності певної білкової молекули.

**Матричний ланцюг** – ланцюг ДНК або інший полінуклеотид, що використовується ДНК-полімеразою як матриця для синтезу комплементарного ланцюга.

**Мезофільні мікроорганізми** – організми, що здатні рости за температури від 20 до 50°C; оптимальна температура росту – 37°C.

**Метаболізм** – обмін речовин, який включає всю сукупність фізичних і хімічних процесів, що відбуваються в організмі протягом життя і забезпечують існування і відтворення клітини.

**Метаболіт** – речовина, що утворюється в хімічних реакціях живої клітини.

**Метанове бродіння** – процес перетворення органічних сполук біомаси на біогаз за участю метаноутворюючих анаеробних мікроорганізмів.

**Метаногенез** – процес, що відбувається в анаеробних умовах за утилізації біомаси. Супроводжується виробництвом біогазу за участю метанутворюючих бактерій (метаногенів).

**Метод відбитків (реплік)** – перенесення колоній мікроорганізмів з однієї чашки Петрі до іншої за допомогою бархатної «печатки» з повним зберіганням взаємного розташування колоній.

**Метод молекулярної гібридизації (ММГ)** – заснований на принципі взаємодії вірусних геномів з комплементарними до них ділянками ДНК, що помічені радіоізотопами, ферментами або фарбами.

**Міелома (мієломна клітина, плазмоцитома)** – клітина пухлини лімфоцитарної системи.

**Міжвидові гібриди** – гібриди, отримані від злиття клітин, що належать до різних видів.

**Мікроін'єкція** – введення в ізолювану еукаріотичну клітину ДНК або інших молекул за допомогою тонкої голки.

**Міссенс-мутація** – зміна суті кодона, що призводить до заміни амінокислоти у відповідному місці поліпептидного ланцюга.

**Мітогени** – речовини, що прискорюють подвоєння клітин.

**Мобілізація** – це процес, при якому здійснюється перенесення від однієї бактеріальної клітини до інших хромосомних генів або некон'югативних плазмід за рахунок кон'югативних плазмід.

**Моноклональні антитіла** – однотипні антитіла з певною специфічністю до одного епітопа (антигенної детермінанти). Синтезовані гібридомами (див. гібридоми).

**Морфогенез** – здійснення генетичної програми розвитку організму.

**Мутагенез** – процес індукції мутацій за допомогою фізичних або хімічних агентів.

**Мутагени** – фізичні, хімічні або біологічні агенти, що збільшують частоту виникнення мутацій.

**Мутація** – зміна генетичного матеріалу, часто призводить до зміни властивостей організму.

**Мутація типу зсуву рамки зчитування (*frameshift*)** – мутація пов'язана з делеціями або вставками нуклеотидів, число яких не кратне трьом. Призводить до порушення триплетності генетичного коду і синтезу зовсім іншого білка (якщо синтез не блокується взагалі).

**Нокаут (генний таргетинг)** – спрямоване руйнування гена за допомогою гомологічної реплікації.

**Нонсенс-мутація** – мутація, що викликає утворення некоректного кодона з передчасною термінацією. У генетичному коді є три некоректних кодони: *амбер* – UAG, *охр* – UAA і *опал* – UGA.

**Нуклеаза S1** – фермент, що специфічно розщеплює одноланцюгову молекулу ДНК.

**Нуклеозид** – пуринова або піримідинова азотиста основа, що ковалентно пов'язана з п'ятивуглеводним цукром (пентозою). Якщо цукром є рибоза, то маємо справу з рибонуклеозидом, якщо дезоксирибоза – то з дезоксирибонуклеозидом.

**Нуклеотид** – нуклеозид, до якого приєднана одна або більше фосфатних груп.

**Олігонуклеотид** – ланцюг, що складається з декількох (від 2 до 20) нуклеотидних залишків. Як правило отримують хімічним шляхом.

**Онкоген** – ген, продукти якого мають здатність трансформувати еукаріотичні клітини так, що вони набувають властивості пухлинних клітин.

**Оператор** – ділянка ДНК, що безпосередньо примикає до структурного гена і регулює його транскрипцію за участю репресора або активатора.

**Оперон** – одиниця генетичної експресії, до складу якої входять один або кілька зв'язаних між собою структурних генів, а також їхні промоторні, операторні та регуляторні ділянки, що контролюють транскрипцію оперона.

**Паліндром** – сайти рестрикції рестриктаз II типу, послідовності яких є симетричними за повороту на 180°.

**Партеногени** – тварини, отримані за рахунок партеногенезу.

**Партеногенез** – розвиток ембріона з жіночої гамети без участі чоловічої статевої клітини, тобто партеногенетичні особини в хромосомах містять тільки гени матері. Форма безстатевого розмноження тварин зі статевим способом відтворення.

**Пасирування (розподілення) клітин** – це відбір невеликої кількості клітин для вирощування в іншій лабораторній судині.

**Патогенність** (грец. *pathos* – хвороба, *genesis* – виникнення) – здатність викликати захворювання.

**Пенетрація** – проникнення сперміїв у яйцеклітину.

**Пептид** – короткий ланцюг амінокислот, поєднаних пептидними зв'язками.

**Пептидний зв'язок** – ковалентний зв'язок між вільною карбоксильною групою при  $\alpha$ -вуглеводному атомі однієї амінокислоти і вільною карбоксильною групою при такому самому атомі сусідньої амінокислоти в поліпептидному ланцюгу.

**Первинна культура** – культура клітин або тканин, що відібрані безпосередньо від організму.

**Первинний транскрипт** – молекула РНК, що створилася в результаті транскрипції з еукаріотичного гена і не підлягала процесингу (тобто містить усі екзони та інтрони).

**Плазміда** – кільцева молекула ДНК, здатна до стабільного, не зв'язаного з хромосоми існування і автономної реплікації.

**Полікаріони** – багатоядерні клітини.

**Полілінкер** – синтетичний олігонуклеотид, що містить ділянки розпізнавання (сайти рестрикції) для декількох рестриктаз.

**Полімерази** – ферменти, що здійснюють матричний синтез нуклеїнових кислот.

**Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР** – високо специфічна і чутлива реакція, за її допомогою можна виявити, розмножити і дослідити навіть одиничну копію гена у вихідному матеріалі. Процес складається з багаторазового повторення таких реакцій: денатурації ДНК, ренатурації (відпалу) коротких дволанцюгових зондів, синтезу ДНК.

**Полінуклеотид** – лінійний полімер, що складається з 20 і більше нуклеотидів, поєднаних один з одним фосфодієфірними зв'язками. Полінуклеотидами є, наприклад, молекули ДНК і РНК.

**Поліпептид** – полімер, що складається з амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками. Поліпептидом є, наприклад, білкова молекула.

**Поліпотентність (або плюрипотентність)** – здатність ембріональних стовбурових клітин диференціюватися в культурі в клітини всіх трьох зародкових листків.

**Помірний фаг** – бактеріофаг, який після проникнення у бактеріальну клітину може поводитися різним чином: хромосома фагу або залучається до літичного циклу, або вступає з клітиною-господарем у своєрідні симбіотичні відносини – перетворюється на профаг і передається усім нащадкам даної клітини.

**Праймер** – короткий олігонуклеотид, який гібридується з матрицею і є затравкою під час її копіювання.

**Прокаріоти** – організми, у яких немає ядра і органел, оточених мембранами. Всі бактерії належать до прокаріот.

**Проліферація** – процес розподілу клітин. Лежить в основі розвитку будь-якого багатоклітинного організму, становлення системи його органів і тканин.

**Промотор** – регуляторна ділянка гена, до якої приєднується РНК-полімераза що ініціює процес транскрипції.

**Протопласти** – рослинна або мікробна клітина, що позбавлена клітинної стінки.

**Профаг** – ДНК бактеріофага, вбудована в геном бактеріальної клітини-господаря і реплікується разом з нею.

**Процесинг** – сукупність ферментативних реакцій, що каталізують перетворення первинних продуктів транскрипції і трансляції в функціонально повноцінні молекули.

**Рамка зчитування** – один з трьох можливих способів зчитування нуклеотидної послідовності у вигляді триплетів. Відкрита рамка зчитування не містить термінуючих кодонів і може транслюватися в білок.

**Реверсія або зворотна мутація** – мутація, що відновлює вихідну структуру гена.

**Ревертаза** – див. зворотна транскриптаза.

**Регулон** – регуляторний ген, що контролює гени, які є у різних ділянках хромосоми і кодують ферменти біосинтезу деяких амінокислот.

**Рекомбінантна ДНК** – молекула ДНК, що отримана поєднанням *in vitro* різнорідних, не існуючих у природі поряд, фрагментів ДНК.

**Рекомбінантна плазмідна** – плазмідна, що містить фрагмент(и) чужорідної ДНК.

**Рекомбінантний білок** – білок, частина амінокислотної послідовності якого кодується одним геном, а частина – іншим.

**Рекомбінація (кросинговер)** – явище, при якому гени однієї групи зчеплення утворюють нові комбінації з генами гомологічних груп зчеплення.

**Рекомбінація *in vitro*** – операції *in vitro* (в склі, поза організмом), що призводять до створення рекомбінантних молекул ДНК.

**Ренатурації** – відновлення вихідної просторової структури дволанцюгової молекули ДНК.

**Репарація ДНК** – процес відновлення нормальної структури ДНК заповненням пошкоджених ділянок відповідними нуклеотидами.

**Реплікатор** – ділянка ДНК, відповідальна за ініціацію реплікації.

**Реплікаційна вилка** – точка, в якій ланцюги батьківської дволанцюгової ДНК розходяться для того, щоб здійснилася реплікація.

**Реплікація** – процес подвоєння молекул ДНК або геномних вірусних РНК.

**Реплікони** – молекула ДНК або її ділянка, що містить регуляторні елементи, які забезпечують процес незалежної реплікації.

**Репресія** – пригнічення активності генів, найчастіше шляхом блокування їх транскрипції.

**Репресор** – білок, здатний взаємодіяти з регуляторною послідовністю (оператором) гена і блокувати його транскрипцію.

**Рестриктази, рестрикційні ендонуклеази** – ферменти, які розщеплюють дволанцюгову молекулу ДНК в специфічному сайті.

**Рестрикти** – фрагменти ДНК, що створилися після її розщеплення рестриктазами.

**Рестрикційна карта** – схема молекули ДНК, на якій вказані сайти розрізання її різними рестриктазами.

**Рестрикційний аналіз** – установлення місць розщеплення ДНК рестриктазами.

**Ретровіруси** – РНК-вмісні віруси, що кодуєть зворотну транскриптазу (ревертазу). Дволанцюгова ДНК, що створюється на РНК-матриці, може вбудовуватися в хромосому клітини, яка інфікована цим вірусом.

**Рибонуклеаза (РНКазы)** – ферменти, що розщеплюють РНК.

**РНК-полімерази** – ферменти, що синтезують РНК (іРНК, рРНК, тРНК та РНК інших класів). Матрицею може бути ДНК або РНК, відповідні РНК-полімерази називаються ДНК- або РНК-залежні.

**іРНК** – інформаційна (матрична) РНК, яка є матрицею за синтезу білків на рибосомах; може позначатися і як мРНК.

**рРНК** – рибосомна РНК – компонент рибосом, необхідний для підтримання їх структури та функціонування.

**тРНК** – транспортна РНК, виконує функцію транспортування амінокислоти до поліпептидного ланцюга, що росте. Для кожної з двадцяти амінокислот, з яких складаються білки, існує якнайменш

одна специфічна тРНК.

**Сайт** – специфічна ділянка молекули ДНК, білка й ін.

**Сайт рестрикції** – нуклеотидна послідовність у молекулі ДНК, що розпізнається рестриктазою.

**Сайт-специфічний мутагенез** – процес здійснення *in vitro* мутації в певному сайті клонованої послідовності. Дозволяє ідентифікувати функціональні ділянки в молекулах білків і отримувати білки із заданими властивостями.

**Секвенування** – визначення нуклеотидної послідовності молекули ДНК або РНК.

**Селективні середовища** – поживні середовища, на яких можуть рости лише клітини з певними властивостями.

**Середовища поживні** – субстрати, які використовують для культивування в штучних умовах мікроорганізмів та культур тканин.

**Синкаріон** – клітинний гібрид, що утворюється внаслідок злиття у гетерокаріонах ядер після злиття клітин.

**Скринінг** – метод ідентифікації одиничного об'єкта шляхом перебору чисельних об'єктів.

**Соматичні гібриди** – продукт злиття нестатевих клітин.

**Соматичні клітини** – будь-яка нестатева клітина багатоклітинного організму.

**Спейсер** – некодуюча послідовність нуклеотидів між генами в ДНК або РНК.

**Сплайсинг** – процес вирізування з попереднику іРНК інтронів і ковалентне з'єднання екзонів з утворенням зрілої іРНК.

**Стовбурові клітини** – мітотичне активні стовбурові клітини, внаслідок ділення яких відбувається заміна загиблих клітин багатоклітинного організму.

**Структурний ген** – ген, що кодує будь-який білок.

**Субодинична вакцина** – вакцина, що містить лише окремі компоненти патогенного мікроорганізму.

**Суперовуляція** – чисельна овуляція, під час якої з яєчника корови у воронку яйцепроводу виходить біля десяти яйцеклітин. Для стимуляції суперовуляції здійснюють гормональну обробку самок.

**Суперпродуцент** – мікробний штам, спрямований на синтез певного продукту у високій концентрації.

**Сферопласти** – клітини, оболонка яких зруйнована лише частково.



**Cos-сайти** – нуклеотидні послідовності на кінцях геному фага  $\lambda$ , що необхідні для упакування ДНК у фагові часточки.

**TATA-бокс** – ділянка, що розташована в промоторній області генів еукаріот за 25 нуклеотидів до сайту ініціації транскрипції, з якою зв'язується РНК-полімераза. Інша назва – бокс Хогнеса. Аналог у прокариот – бокс Прибнова.

**Термінація** – зупинка синтезу макромолекули.

**Термінуючий кодон** – кодон, що визначає закінчення (термінацію) синтезу полінуклеотидного ланцюгу. Як правило це кодони *UAA*, *UAG*, *UGA*.

**Тотипотентність** – властивість соматичних клітин повністю реалізувати свій потенціал розвитку аж до створення цілого організму.

**Транзиція** – точкова мутація, при якій відбувається заміна основ пурину на пурин або піримідину на піримідин.

**Трансверсія** – точкова мутація, під час якої відбувається заміна основ пурину на піримідин або піримідину на пурин.

**Трансгенний організм** – організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал, уведений методами генної інженерії.

**Трансгеноз** – процес уведення чужорідного гена в рослинну або тваринну клітину та його передача в ряду поколінь.

**Трансдукція** – перенесення генетичного матеріалу з однієї клітини в іншу за допомогою бактеріофага.

**Транскрипція** – синтез РНК на ДНК-матриці; здійснюється РНК-полімеразою.

**Транскрипт** – продукт транскрипції, тобто РНК, що синтезована на даній ділянці ДНК як на матриці і комплементарна одному з її ланцюгів.

**Транслокація** – структурні зміни хромосом, під час яких хромосомний сегмент переміщується в інше місце тієї ж хромосоми, або переноситься в іншу хромосому, чи відбувається обмін двома сегментами між гомологічними або негомологічними хромосомами.

**Трансляція** – процес синтезу поліпептиду на матриці РНК, що відбувається в рибосомах.

**Трансплантації ембріонів (ТЕ)** – метод полягає в тому, що генетично видатні самки звільняються від необхідності виношування плоду і вигодовування потомства. В них на ранніх стадіях вилучають сформовані зародки і пересаджують менш цінним у генетичному

відношенні реципієнтам.

**Транспозиція** – переміщення мобільного генетичного елемента з одного локуса в інший.

**Транспозони** – мобільні генетичні елементи, здатні до самостійних переміщень (транспозиції) та інтеграції в різні ділянки хромосомної або позахромосомних ДНК.

**Трансфекція** – штучне введення в еукаріотичні клітини ізольованих молекул ДНК.

**Трансформація** – 1) перенесення генетичної інформації в бактеріальну клітину за допомогою ізольованої ДНК (без участі вірусів); 2) перетворення нормальних клітин тварин у пухлинні.

**Фактор F (фактор фертильності, статевий фактор)** – фактор, що містить кон'югативні F-плазмиди. Клітини з фактором F завжди є донорами генетичного матеріалу.

**Фенотип** – зовнішній прояв властивостей організму, що залежать від його генотипу та факторів навколишнього середовища.

**Ферментація** – процес культивування мікроорганізмів у спеціальних ємкостях.

**Ферменти** – біологічні каталізатори, більшість з яких є розчинними глобулярними білками.

**Халогени** – речовини, що затримують процес подвоєння клітин.

**Химера** – організм, що містить клітини, тканини і органи різних організмів.

**Хромосома** – структура, основу якої становить конденсована молекула ДНК; носій генетичної інформації. Здатна до відтворення зі зберіганням структурно-функціональної індивідуальності в ряду поколінь. У еукаріот є в ядрі клітини, у прокаріот – безпосередньо в цитоплазмі (частина пронуклеусу).

**Штам** – чиста культура мікроорганізмів, що належать до одного виду.

**Штучна бактеріальна хромосома ВАС (*bacterial artificial chromosome*)** – векторна система на основі F-плазмиди *E.coli*. Сучасні ВАС-вектори дозволяють клонувати фрагменти ДНК завдовжки до 300 т.п.н. і вище.

**Штучна дріжджова хромосома УАС (*yeast artificial chromosome*)** – УАС-вектор являє собою кільцеву молекулу ДНК, що містить ряд генетичних елементів, що дозволяють їй існувати у позахромосомному стані в клітинах дріжджів. Містить декілька маркерних генів і сайтів ініціації реплікації.

## ІМЕННИЙ ПОКАЖЧИК

- Аїба С., 10  
Андреєва Л. Е., 94  
Арнхейм Н., 81  
Асаї С., 338  
Астауров Б. Л., 301  
Аустин Г. Р., 248  
Баєв А. А., 10  
Барб'єрі М., 32  
Барроуз К., 176  
Берардино М. Дж., 272  
Берг П., 14, 85  
Беринг Е., 161  
Бернар К., 175  
Біб В., 175  
Боллум Ф., 72  
Бондіолі К., 274  
Бреннер С., 49  
Бриггс Р., 271  
Буркат В. П., 289  
Ваксман З. Е., 343  
Вейгл Дж., 69  
Вейссман А., 153  
Виноградський С. М., 12  
Вирхов Р., 12  
Вілладсен С., 242  
Вольта А., 398  
Вуд С., 319  
Вудворд Дж., 377  
Газарян К. Г., 117, 273  
Гамберг К., 190  
Гарднер Р., 312  
Гаррісон Р., 26  
Геддель Г. В., 157  
Герасименко В. Г., 401, 402  
Гілберт В., 74, 150, 153  
Голубєв А. К., 267, 299  
Гордон Дж., 271, 272  
Гріффі Е., 370  
Дабагян Н. В., 273  
Дельбрюк М., 326  
Джей Г. С., 177  
Дженнер Е., 160, 161  
Джоллі Р., 175  
Дибан А. П., 308  
Ди-Берардино М., 218  
Домінко Т., 274  
Еванс М., 126  
Евінг Б., 175  
Ереки К., 7  
Ерл В. Р., 177, 185  
Ерліх Х. А., 81  
Ернст Л. К., 233, 235, 244, 299, 316  
Єгоров Н. С., 344  
Єлінов Н. П., 23  
Єрмольєва З. В., 13  
Завадовський М. М., 257  
Завертяєв Б. П., 310, 311  
Зубець М. В., 289  
Ігл М. Г., 177  
Ісаєв Д. А., 312  
Ісаченко Б. Л., 12  
Каррель А., 26, 176  
Кауфман М., 126  
Келер Д., 202  
Кемпбелл К., 278  
Кінг В., 264  
Кінг Т., 271  
Кіносіта М., 338  
Ковтун С. І., 229  
Кольцов М. К., 261

Конюхов Б. П., 313  
Крик Ф., 14, 36, 40, 49  
Лавітрано М., 131  
Леб Ж., 175  
Левіс С.А., 176  
Лейбо С. П., 237  
Льонгрем І., 175  
Мак Грат Дж., 273  
Мартінова М. Ю., 312  
Мак-Ларен Е., 311  
Максам А., 74, 76  
Мартін Г., 126  
Массіп А., 241  
Мезельсон М., 69  
Мендель Г. І., 12  
Мечников І. І., 12, 161, 386  
Милліс Н. Ф., 10  
Мільштейн Ц., 202  
Моно Ж., 13, 196  
Муллис К. Б., 81  
Мурхед П., 177  
Навашин С. Г., 13  
Нагано Р., 132  
Надсон Г. А., 12  
Нельсон Дж., 370  
Новик А., 196  
Ноніашвілі Е. М., 308  
Овчинников Ю. А., 10  
Омелянський В. Л., 12  
Осташко Ф. І., 262  
Пальмітер Р., 117  
Пастер Л., 10, 12, 158, 161  
Платонов Е. З., 313  
Полдж К., 237, 242  
Пратер Р., 274  
Прокоф'єв М. І., 244  
Раус П., 70, 169, 177, 307  
Рей Д., 370  
Рід Л. М., 176  
Рінгер С., 176  
Рінгерц Н., 198  
Робл Дж., 273, 274  
Розеліус Т., 299  
Роурі Р., 254  
Роусон Л., 237  
Ру У., 175  
Сандерем Т., 370  
Сассон А., 333  
Севідж Р., 198  
Сейки Р. К., 81  
Семенова М. Л., 124, 128  
Сенгер Ф., 77, 78, 150  
Сергеєв Н. І., 233, 234, 235  
Сіммс Х., 177  
Скрябін Г. К., 10  
Слепцова Л. О., 273  
Солтер Д., 273  
Стідлман Дж., 177  
Стік С., 273  
Струнников В. О., 301  
Сурані М., 308  
Сцілард Л., 196  
Таусон В. О., 329  
Тірод М., 176  
Тихомиров О. О., 301  
Троунсон А., 275  
Уілладсен С., 273, 274  
Уілмут Я., 274, 279  
Уілраден С. М., 237  
Уотсон Дж., 14, 36, 40  
Фалуна Ф., 81  
Флемінг О., 13  
Флорі Х., 13  
Форд К., 310  
Хайнс Р. О., 190  
Хакоморі С. І., 190  
Хан Дж., 299  
Харрісон Р. Г., 175

Хеден К. Г., 8  
Хейфлік Л., 177, 184  
Хемфрі А. Е., 10  
Холдейн Дж. Б. С., 16  
Хорн Г. Е., 81  
Хофнер Н., 272  
Чанг М. Н., 248  
Чейн Е., 13  
Шаловило С. Г., 228  
Шарф С., 81  
Шванн Т., 12  
Шеллер Р., 87  
Шлейден М. Я., 196  
Шульган І. З., 228  
Янагімачі Р., 280, 282  
Fehilly С. В., 315  
Johson M., 314  
Lillie F., 259  
Meinecke В., 315  
Meinecke-Tillmans S., 315  
Mintz В., 311, 313  
Polzir V., 316  
Sammer R., 314  
Stranziger G., 316  
Tarkowski A., 311  
Waterworth H., 325

## ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

- Адгезія, 181  
Акрсомна реакція, 248  
Амінокислоти, 11, 13, 48, 50, 55  
– незамінні, виробництво, 320, 334  
– захист від руйнування, 360  
Ампліфікація, 45, 83, 89, 107  
Андрогенез, 299  
Антибіотики, 9, 93, 343  
– виробництво, 343  
– кормові, 347  
Антигени, 20, 167, 173, 185, 200, 205  
Антитіла, 20, 161  
– моноклональні, 20, 140, 202, 204, 209  
– гібридні, 202, 207  
Апоптоз, 34, 184  
Атрезія, 218, 246  
Ауксотрофи, 100, 197, 336
- Бактерії**, 21, 24, 39, 55  
– метанутворюючі, 315  
– молочнокислі, 281, 303, 305, 307  
Бактеріофаг, 19, 52, 71, 75  
Банки (бібліотеки) генів, 63, 84, 87  
Біоенергетика, 17, 313  
Біометаногенез, 314  
– установки, 316, 317  
Біофармінг, 109  
Білок, 16, 19, 42, 81, 85, 91, 284  
– кормовий, 253, 255  
– мікробіологічний синтез, 265  
– молока, 108  
– одноклітинних (SCP), 255  
– рослинний, 253, 254  
Біогаз, 17, 23, 314, 316, 320  
Бластомери, 181, 210, 219, 221, 230, 240

Бластоциль, 202, 229, 230, 232  
Бластула, 214, 215, 216, 223  
Близнюки, 23, 137, 226, 231  
– дизиготні, 205  
– монозиготні, 137, 225, 226, 236  
Блот-гібридизація, 87, 97  
Бродіння, 8, 270, 282, 303, 305, 310  
– спиртове, 304, 310  
– молочнокисле, 278, 280, 304

**Вакцина, 127**

– атенуйована, 133  
– векторна, 134  
– генно-інженерна, 128  
– пептидна, 131  
– субдинична, 129  
Вектор, 65, 89  
– ампліфікації, 89  
– експресії, 89  
– міні-хромосоми дріжджів *YAC*, 78  
– плазмідний, 72  
– ретровірусний, 118  
– сперматозоїд для доставки транс гена, 102  
– трансформації, 71  
– фаговий, 754  
– штучна хромосома бактерії *BAC*, 80

Виродженість коду, 51

Віріон, 24, 112, 167, 173

Вірус, 23, 127

– вісповакцини (ВВВ), 18, 134  
– поліомієліту, 13  
– простого герпесу, 130  
– Сендай, 155, 157, 219  
– ящура, 130

Вітаміни, 253, 267, 269

– кормові препарати, 340

Вітрифікація, 188, 192

Внутрішньоклітинна маса (ВКМ), 202, 220, 228, 245, 248, 251

Гамети, 114  
– відбір за статтю, 246  
Ген, 12  
– структурний, 55  
– регуляторний, 55  
Генетичний код, 32  
Генний нокаут (генний таргетинг), 129  
Генно-модифіковані організми (ГМО), 409  
– агрономічно важливі характеристики, 411  
– поживні властивості, 411  
Генно-модифіковані мікроорганізми (ГММ), 416  
Гетерокаріон, 197  
Гібридизація, 27  
– соматична, 27, 109, 196  
Гібридома, 202  
Гіногенез, 299  
Гомокаріон, 197  
Гормони, 19  
– інсулін, 19, 149, 150  
– лютеїнізуючий гормон (ЛГ), 219  
– росту (соматотропін), 19, 149, 157  
– сироватка жеребної кобили (СЖК), 121  
– соматостатин, 117, 125  
– фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), 173  
Гриби, 25, 304

Детермінанта антигенна, 130, 134, 160  
Детермінація, 256  
Диференціація клітин, 34, 247, 249  
Диференціація статі, 256  
ДНК-гібридизація, 85  
ДНК-зонд, 86  
ДНК-копія (кДНК), 89, 119, 122  
ДНК-метиلاзи, 69  
ДНК-полімерази, 41, 66  
Домен, 131  
Дріжджі, 12



Екзон, 45  
Експресія генів, 51, 103  
Електропорація, 84  
Елімінація, 26  
Ембріон, 170  
– вилучення, 179  
– відбір за статтю, 209  
– імунологічні методи, 212  
– цитогенетичний метод, 210  
– *FISH*-аналіз, 211  
– Кріоконсервування, 189, 190  
– культивування *in vitro*, 202  
– отримання *in vitro*, 195  
– партеногенетичні, 222  
– химерний, 222  
– якість, 182  
Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), 101, 222, 253  
Ензимологія, 10, 289  
Епітоп (антигенна детермінанта), 161  
Запліднення *in vitro*, 193, 197  
Зародок партеногенетичний, 241  
– гаплоїдний, 242, 252  
– диплоїдний, 241, 242  
Зигота, 90, 92, 97, 198, 216

Імобілізація, 11, 295  
– методи, 296  
Імунізація, 128  
– генна, 134  
Імунітет, 128  
– гуморальний, 129  
– клітинний, 129  
Індуктор, 45, 292  
Інтерлейкіни, 15  
Інтерферон, 19, 121, 156  
– гібридний, 124  
Інтрон, 45

Калюс, 20  
Капацитація, 198  
Капсид, 131  
Клітина, 137  
– гібридна, 157  
– диференційована, 137, 142, 217, 224  
– еноклеїована, 206  
– соматична, 137, 206, 225  
– трансформована, 137, 141, 145  
Клітинний цикл, 26  
Клітинна лінія, 143  
– постійна (трансформована), 143  
Клон, 138, 215  
– клітин, 141  
– ембріонів, 222, 225  
– тварин, 225, 227  
Клонування  
– генів, 118  
– гібридом, 164  
– ембріональне, 220  
– молекулярне, 51  
– соматичне, 9, 222  
Кодон, 49  
Колінеарність, 49  
Кон'югація, 83  
Контактне гальмування, 144  
Корова-донор, 170  
Корова-реципієнт, 171, 174  
Косміди, 97  
Кріоконсервування, 186, 188, 224, 235  
Кріотрансформація, 84  
Ксенотрансплантація, 111  
Культивування, 137, 138  
– диплоїдних клітин, 140

Культура, 178  
– адгезивна, 179, 180, 181  
– клітин, 179  
– первинна, 179  
– суспендована, 179  
– тканин, 178, 181

Лігази, 65, 69  
Ліміт Хейфліка, 184  
Ліпіди кормові, 348  
Ліпоплекс, 135  
Ліпосома, 134

Метаболізм, 35  
Метаболіти, 35  
Мієлома, 173, 202  
Мікроін'єкція ДНК, 121, 143  
Мобілізація, 105  
Мозаїки, 124, 148, 281, 310  
Морула, 120, 134, 232, 242, 243, 245, 250  
Мутагенез, 44, 84  
– сайт-специфічний, 94, 159  
Мутанти, 45, 47, 49  
– конститутивні, 57, 336  
Мутація, 12, 28, 42, 126

Нуклеази, 71  
Нуклеотид, 35  
Нуклеїнові кислоти, 22, 44, 71

Оперон, 55  
Осіменіння штучне, 212

Партеногенез, 299  
– амейотичний, 301  
– мейотичний, 301  
– природний, 301  
– штучний, 302  
Патогенність, 24

Пенетрація, 194, 249  
Плюріпотентність, 126  
Поживне середовище, 135, 179, 185, 186, 188  
– без сироваткове, 135  
– Дульбекко, 186  
– Ігла, 186  
– Іскова, 186  
– Мак Коя 5А, 186  
– сольові розчини Ерла й Хенкса, 185  
– 199, 186  
Полікаріон, 196  
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), 81, 82, 123, 267  
Поліпотентність, 126  
Праймер, 42, 81, 82  
Прозора оболонка (зона пелюциди), 251, 293  
Продукти харчування, 391, 416  
– змінені, 411  
– молочнокислі, 416  
Проліферація, 33, 167, 170, 178, 197  
Промотор, 53, 54, 56, 87, 117, 123  
Пронуклеус, 117, 121  
– жіночий, 121, 301  
– чоловічий, 118  
Протопласти, 26, 100, 175

**Р**  
Реверсія, 47  
Ревертаза, 66, 70, 119, 158  
Рекомбінантна ДНК, 14, 27, 63, 69  
– вакцина, 20  
– конструювання, 84  
Репарація, 42, 43, 66  
Репліка, 40  
Реплікативна вилка, 41, 66  
Реплікація, 39, 40, 41  
Рестрикт, 72  
Рестриктази, 17, 19, 65, 73, 88, 99  
Рестрикційна карта, 74  
Ретровіруси, 24, 71, 120  
РНК антисмислова, 136

РНК-полімерази, 53, 57, 66

Сайт, 39, 56, 60, 75

– ініціації, 39, 56

– рестрикції, 67, 75, 92

Селекція, 211

Секвенування, 72, 74, 77

– хімічне, 74

– ферментативне, 77

Силосування, 352, 356

Синкаріон, 197

Системи культивування клітин, 189

– глибинне вирощування у моношарі, 189

– глибинне вирощування у суспензійних культурах, 190

– непротічні культури, 189

– проточні культури, 189

Синхронізація охоти, 222

Скринінг, 106

– методом гібридизації, 107

– імунологічний, 109

– за активністю білка, 109

Спіруліна, 332

Сплайсинг, 57

Субстрат, 322, 324

– I покоління, 326

– II покоління, 329

– III покоління, 330

Суперовуляція, 212, 218

Теломераза, 39

Терапія генна, 64, 134, 142

Термінація, 47, 53, 54

Тотипотентність, 25, 265, 271, 273

Трансген, 115, 117, 121

Трансгенні тварини, 116

Трансгеноз, 115

Трансдукція, 103

Транскрипція, 52

Трансляція, 60

Трансплантація ембріонів, 212  
– нехірургічна, 236  
– хірургічна, 235  
Транспозони, 101  
Трансфекція, 104, 116  
– балістична, 134  
– за допомогою фосфату кальцію, 135  
– ліпосомами, 135  
Трансфераза термінальна, 72  
Трансформація, 103  
Трофктодерма (TE), 290, 309

**Ф**  
Фагміди, 94  
Фазміди, 98  
Фактор фертильності, 100  
Ферментація, 11, 325, 355, 384  
– глибинна, 337  
– поверхнева, 336  
Ферменти, 20, 362  
– кормові, виробництво, 350, 320, 366  
– іммобілізовані, 369  
– застосування, 362  
Фрагмент Кленова, 33, 66, 88  
Фрімартіні, 258  
Фузоген, 276

**Х**  
Химера, 145, 310, 311  
– агрегційна, 311  
– внутрішньовидові, 313  
– ін'єкційна, 312  
– міжвидова, 312, 314  
– міжпородна, 312, 314  
Хроматін статевий, 258  
Хромосоми, 12, 225, 256, 259

**Ц**  
Центрифугування, 260  
Цитоплазма, 221

- Ядро**, 23, 115, 145, 197, 214, 247, 257, 269, 271
- бластомера, 230, 265, 273
  - трансплантація, 212, 228, 231, 254
- Яйцеклітина**, 29, 115, 118, 145, 250, 254
- активація, 275, 301, 303
  - еноклеїована, 271
  - реконструйована, 271

## ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Абелев Г. И. Моноклональные антитела / Г. И. Абелев // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 1. — С. 16.
2. Анализ генома. Методы / [пер. с англ. ; под ред. К. Дейвиса]. — М. : Мир, 1990. — 246 с.
3. Андреева Л. Е. Трансгенные животные: фундаментальные и прикладные аспекты / Л. Е. Андреева, В. З. Тарантул ; отв. ред. Е. Д. Свердлов. — М. : Наука, 2003, Т. 1. — 372 с. (кн. Проблемы и перспективы молекулярной генетики).
4. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию / М. Е. Бекер ; [пер. с латышского]. — Рига : Пищевая промышленность, 1978. — 232 с.
5. Биология развития млекопитающих. Методы / [пер. с англ. ; под ред. М. Манк]. — М. : Мир, 1990. — 406 с.
6. Биотехнология / [отв. ред. А. А. Баев]. — М. : Наука, 1984. — 318 с.
7. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы / [А. П. Сеницын, А. А. Клесов, М. Л. Рабинович и др.].— М., 1998. — 156 с. (Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН ; Т. 12).
8. Биотехнология. Принципы и применение / [пер. с англ. ; под ред. И. Хиггенса, Д. Беста, Дж. Джонса]. — М. : Мир, 1998. — 480 с.
9. Биотехнология: учеб. пособ. для вузов ; в 8 кн. / [под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова]. — М. : Высш. шк., 1987.
10. Біотехнологія: підручник / [В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.] ; за заг. ред. В. Г. Герасименка. — К. : ІНК ОС, 2006. — 647 с.
11. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. — Новосибирск : Сибир. отдел. РАН, 1999. — 252 с.
12. Генетика, селекция и биотехнология в скотоводстве / [под ред. М. В. Зубца, В. П. Бурката]. — К. : БМТ, 1997. — 722 с.
13. Геном, клонирование, происхождение человека / [под ред. Л. И. Корочкина]. — Фрязино: Век 2, 2004. — 224 с.
14. Герасименко В. Г. Биотехнология : учеб. пособ. / В. Г. Герасименко. — К. : Вища шк., 1989. — 343 с.



15. Глик Б. Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Б. Глик, Дж. Пастернак. — М. : Мир, 2002. — 589 с.
16. Евтушенко А. Н. Введение в биотехнологию: курс лекций / А. Н. Евтушенко, Ю. К. Фомичев. — Мн. : БГУ, 2002. — 105 с.
17. Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. — СПб. : Наука, 1995. — 600 с.
18. Ермишин А. П. Генетически модифицированные организмы: мифы и реальность / А. П. Ермишин. — Мн. : Тэхнологія, 2004 — 118 с.
19. Ефимова М. В. Введение в прикладную биотехнологию : учеб. пособ. / М. В. Ефимова. — Петропавловск-Камчатский : Камчат. ГТУ, 2004. — 95 с.
20. Журавель М. П. Технологія відтворення сільськогосподарських тварин: підручник / М. П. Журавель, В. М. Давиденко. — К. : Слово, 2005. — 336 с.
21. Завертяев Б. П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота / Б. П. Завертяев. — Л. : Агропромиздат, 1989. — 255 с.
22. Клесов А. А. Инженерная энзимология на промышленном уровне. Биотехнология / А. А. Клесов. — М., 1989. — 184 с. — (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР).
23. Клонирование ДНК. Методы / [пер. с англ. ; под ред. Д. Гловера]. — М. : Мир, 1988. — 538 с.
24. Коваленко В. П. Биотехнологія у тваринництві й генетиці / В. П. Коваленко, І. Ю. Горбатенко. — К. : Урожай, 1992. — 152 с.
25. Корочкин Л. И. Клонирование животных / Л. И. Корочкин // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — № 4. — С. 10.
26. Кузьмина Н. Биотехнология: основные принципы и методики культивирования клеток животных, сферы применения культур животных клеток [Электронный ресурс] / Н. Кузьмина. — 2009. — Режим доступа : [http://www.biotechnol.ru/ge/biblio\\_ge.htm](http://www.biotechnol.ru/ge/biblio_ge.htm).
27. Курило Л. Ф. Некоторые этические вопросы технологии эмбриональных стволовых клеток / Л. Ф. Курило // Проблемы репродукции. — 2000. — № 3. — С. 18.
28. Лещинская И. Б. Современная промышленная микробиология / И. Б. Лещинская // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, № 4. — С. 14.

29. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фриг, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. ; под ред. Т. Маниатис. — М. : Мир, 1984. — 480 с.
30. Молекулярная биология: структура и биосинтез нуклеиновых кислот: учебник для вузов / [В. И. Агол, А. А. Богданов, В. А. Гвоздев и др.] ; под ред. А. С. Спирина. — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.
31. Мосин О. В. Использование биотехнологии в пищевой и перерабатывающей промышленности : [Электронный ресурс] / О. В. Мосин. — 2009. — Режим доступа : [http://www.biotechnol.ru/ge/biblio/mosin\\_o\\_new2.htm](http://www.biotechnol.ru/ge/biblio/mosin_o_new2.htm).
32. Никитин Г. А. Метановое брожение в биотехнологии: учеб. пособие / Г. А. Никитин. — К. : Выща шк., 1990. — 207 с.
33. Ніколайчук В. І. Генетична інженерія: підручник / В. І. Ніколайчук, І. Ю. Горбатенко. — Ужгород, 1999. — 182 с.
34. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / [Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко и др]. — М. : Агропромиздат, 1990. — 384 с.
35. Осташко Ф. И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф. И. Осташко. — К. : Аграр.наука, 1995. — 183 с.
36. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. Т. 1 : Генная и белковая инженерия / Л. И. Патрушев ; отв. ред. А. И. Мирошников. — М. : Наука, 2004. — 526 с.
37. Патрушев Л. И. Экспрессия генов / Л. И. Патрушев. — М. : Наука, 2000. — 830 с.
38. Пономарьов П. Х. Генетично модифікована продовольча сировина і харчові продукти, вироблені з її використанням: навч. пос. [для студ. вищ. навч. закл.] / П. Х. Пономарьов, І. В. Донцова. — К. : Центр навчальної літератури, 2009. — 126 с.
39. Рекомендації щодо відбору та підготовки телиць-реципієнтів до трансплантації ембріонів / [Г. О. Богданов, В. І. Шеремета та ін.] — К. : Міжнародна фінансова агенція, 1997. — 12 с.
40. Рекомендації щодо стимуляції суперовуляції у корів-донорів з використання біологічно активних речовин / [В. І. Шеремета, Г. О. Богданов та ін.] — К. : Товариство «Знання України», 1999. — 10 с.

41. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник для вузов. / В. Н. Рыбчин. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб. : СПб ГТУ, 2003. — 522 с.
42. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон ; пер. с англ. ; под ред. В. Г. Дебабова. — М. : Мир, 1987. — 411 с.
43. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.] ; под ред. В. С. Шевелухи. — М. : Высш. шк., 1998. — 416 с.
44. Семенова М. Л. Зачем нужны трансгенные животные / М. Л. Семенова // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т. 7, № 4. — С. 13.
45. Тавокина Л. В. Молекулярно-цитологическая диагностика в лечении пациентов с нарушением репродукции / Л. В. Тавокина // Здоровье Украины. — 2007. — № 3 (6). — С. 37.
46. Теория и практика иммуноферментного анализа / [А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е. М. Гаврилова]. — М. : Высш. шк., 1991. — 288 с.
47. Технологія отримання ембріонів і яйцеклітин від корів та телиць / [О. Д. Бугров, М. Д. Безуглий та ін.]. — Харків, 1998. — 9 с. — (Биотехнология: методичні рекомендації для науково-практичних і організаційних питань трансплантації ембріонів сільськогосподарських тварин ; ХЗВІ).
48. Франк-Каменецкий М. Д. Самая главная молекула / М. Д. Франк-Каменецкий. — М. : Наука, 1983. — 160 с.
49. Цыренов В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных: учеб.-метод. пособ. / В. Ж. Цыренов. — Улан-Удэ : ВСГТУ, 2005. — 48 с.
50. Черемис А. В. Секвенирование ДНК / А. В. Черемис, Э. Д. Ахунов, В. А. Вахитов. — Уфа : УНЦ РАН, 1999. — 432 с.
51. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха. — М. : Высш. шк., 2003. — 470 с.
52. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособ. / С. Н. Щелкунов. — 2-е изд. испр. и доп. — Новосибирск : Сиб. унив., 2004. — 496 с.
53. Эрнст Л. К. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. А. Зиновьева // Вестник РФФИ. — 2002. — № 3. — С. 12.

54. Эрнст Л. К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст, Н. И. Сергеев. — М. : Агропромиздат, 1989. — 302 с.
55. Юлевич О. І. Біотехнологія : курс лекцій / О. І. Юлевич. — Миколаїв : МДАУ, 2007. — 156 с.
56. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин : підруч. / В. А. Яблонський. — К. : Арістей, 2005. — 296 с.

**Навчальне видання**

**Юлевич Олена Іванівна**

**Ковтун Світлана Іванівна**

**Гиль Михайло Іванович**

## **БІОТЕХНОЛОГІЯ**

---

*Навчальний посібник*

---

*Редактор:*

*М.І. Гиль*

*Технічний редактор:*

*О.М. Кушнарьова*

*Комп'ютерна верстка:*

*Т.В. Гуднікова*

Формат 60×84 1/16. Ум. друк. арк. 29,75

Тираж \_\_\_\_\_ прим. Зам. № \_\_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського державного аграрного університету  
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1155 від 17.12.2002 р.