**Лекція №8**

**Тема: Біотехнологія. Клітинна інженерія. Генна інженерія.**

**Біотехноло́гія** (від [грец.](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D1%80%D0%B5%D1%86%D1%8C%D0%BA%D0%B0_%D0%BC%D0%BE%D0%B2%D0%B0) bios — життя, *techne* — мистецтво, майстерність і *logos* — навчання) — [використання](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F) живих організмів і біологічних процесів у виробництві**. Біотехнологія — міждисциплінарна галузь, що виникла на стику** [**біологічних**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)**,** [**хімічних**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D1%96%D0%BC%D1%96%D1%8F) **і** [**технічних**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B5%D1%85%D0%BD%D1%96%D0%BA%D0%B0) **наук**. Сучасна біотехнологія використовує досягнення таких біологічних наук, як молекулярна біологія та генетика, біохімія, біологія клітини**. Саме уявлення про універсальність властивостей генетичного матеріалу і клітинної будови живої матерії являють собою теоретичні узагальнення, які втілюються у сучасних галузях експериментальної біології, до яких належать клітинна і генна інженерія. Цей синтетичний напрям став основою галузі прикладної біології – біотехнології.**

**Властивості генетичного матеріалу**

1. **Властивість відносної стабільності.** Генетичний аналіз можливий лише завдяки тому, що ознаки рослин, тварин і мікроорганізмів стабільно відтворюються в ряду поколінь. Однак властивість стабільності генетичного матеріалу не є абсолютною. Час від часу відбуваються мутації.
2. **Властивість дискретності генетичного матеріалу** узагальнює дуже різні за формою конкретні прояви законів розщеплення і незалежного успадкування генів. Дискретність генетичного матеріалу має прояв на декількох рівнях : генному, хромосомному і геномному, який охоплює всю сукупність хромосомних і поза хромосомних генетичних детермінант.
3. **Властивість лінійності генетичного матеріалу,** яка лежить в основі хромосомної теорії спадковості. Хромосоми не бувають розгалуженими. В групах зчеплення гени розташовуються в лінійній послідовності, так само, як і ділянки всередині генів.
4. **Властивість безперервності генетичного матеріалу.** Між генами не виявлені будь-які негенетичні елементи.

Ці чотири універсальні властивості генетичного матеріалу можна виявити у будь-якого організму. І це пояснюється властивостями ДНК – лінійного полімера.

Крім того необхідно зазначити, що існує біохімічна універсальність живого, яка підтверджується подібністю багатьох метаболічних шляхів, молекулярних структур у різних об’єктах і відповідає універсальності клітинної будови організмів.

Саме єдність живого на різних рівнях організації лежить в основі розробки і впровадження біотехнології.

**Клітинна інженерія -** метод конструювання [клітин](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D1%96%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%B0_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)) нового типу на основі їх культивування, гібридизації та реконструкції. Соматичні клітини одного виду тварин, які культивували на штучних середовищах поза організму, виявилось можливим гібридизувати не лише між собою, а й з клітинами тварин іншого виду, наприклад, миші і китайського хом’яка. Також гібридизують клітини людини і миші. Гібриди соматичних клітин отримують, стимулюючи їхнє злиття впливом вірусу Сендай і поліетиленглюколя. При цьому гібридизація досягає 25-30% від загальної кількості клітин. На першій стадії виникають гетерокаріони (клітини у яких 2 ядра). У частині цих клітин утворюються синкаріони (клітини, у яких два різних ядра об'єднуються). Якщо в хромосомах миші є рецесивні біохімічні маркери , то вивчають параллельно цитологічні характеристики і фенотипічні ознаки клонованих гібридів. Втрата певної хромосоми людини, яка супроводжується проявом рецессивного маркера миші, свідчить про локалізацію гомологічного гена в певній хромосомі людини. Так, наприклад, був вперше локалізований ген тимідинкінази в 17-й хромосомі людини.

Методи гібридизації соматичних клітин застосовують і в генетиці рослин. У цьому випадку об'єднують не соматичні клітини безпосередньо, а їхні протопласти, попереньо позбавлені оболонок, які видаляли ферментативним шляхом. При цьому способі гібридизації вдалося здолати не лише міжвидові, але й міжродові бар'єри, які унеможливлюють схрещування. Соматична гібридизація відкриває перспективи для одержання нового вихідного матеріалу для селекції. Так були створені соматичні гібриди культурної і дикої картоплі.

Для вивчення закономірностей функціонування диференційованих клітин пересаджують ядра з соматичних клітин до енуклейованих яйцеклітин тварин. У такий спосіб вдалося довести, що ядра диференційованих клітин містять усю необхідну генетичну інформацію для розвитку зародка і дорослої особини. Вчені навчились клонувати не лише рослинні, а й тваринні організми.

Можливо утворення гібридів між раковими і нормальними клітинами. Саме такий підхід застосовують для отримання так званих моноклональних антитіл на основі вирощування гібридом. Відомо, що специфічні антитіла у відповідь на введення до організму тварини антигена (чужорідного білка або полісахарида) виробляються певними клонами клітин імунної системи. Ці клітини вилучають з селезінки імунізованих тварин, поєднують з клітинами меланоми – одного з типів злоякісної пухлини. Утворюються гібридоми, які об'єднують ознаки обох батьківських форм: від клітини імунної системи – здатність виробляти певні антитіла, а від клітини меланоми – здатність необмежено довго поділятись в умовах культури клітин.

**Генна інженерія** - це біотехнологічний прийом, спрямований на конструювання рекомбінантних молекул ДНК на основі ДНК, взятої з різних джерел. Перша рекомбінантна ДНК була створена в лабораторії Берга в 1972 році, складалась фрагментів ДНК від трьох різних організмів.

Дуже важливими для отримання рекомбінантних ДНК є розробка методичних підходів для вилучення певних генів з геному організму. Головну роль для здійснення цієї задачі виконують ферменти ендонуклеази рестрикції або рестриктази. Ці ферменти розрізають ДНК поблизу або всередині певних послідовностей нуклеотидів, які однакові на обох комплементарних ланцюгах. Крім того існує і інший підхід для одержання гена – хімічний синтез. Методологія синтезу ДНК із заданою послідовністю була розроблена Г. Кораною ще в 60-х роках минулого століття. Такий підхід дозволив синтезувати штучний ген гормону інсуліну. У наш час існують автомати для синтезу ДНК із заданою нуклеотидною послідовністю. Однак необхідно враховувати ще необхідність напрацювання достатньої для подальших досліджень кількості такої ДНК, а також для транспортування гена у клітину і вбудовування його до геному.

Для цього використовують вектори. вектор — транспортний засіб для передачі генетичного матеріалу у клітину. [Вірусний вектор](https://uk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%92%D1%96%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BD%D0%B8%D0%B9_%D0%B2%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80&action=edit&redlink=1) — вірус, який був змінений для [трансдукції](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F_(%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0)) специфічного генетичного матеріалу у клітину, наприклад для [генетичної терапії](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B0_%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%BF%D1%96%D1%8F). [Плазмідний вектор](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D1%96%D0%B4%D0%B0) також може використовуватися для доставлення штучного фрагменту [рекомбінантної ДНК](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F_%D1%80%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B1%D1%96%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%BD%D0%B8%D1%85_%D0%94%D0%9D%D0%9A) у складі плазміди до клітини, для чого застосовують різні методи [трансфекції](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F). Отже, існують різні методи введення чужорідної [ДНК](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B5%D0%B7%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%97%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0) в еукаріотичну [клітину](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D1%96%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%B0) : в основу деяких покладений фізичний вплив на мембрану клітини-мішені (електропорація, видавлювання клітин, наночастинки, магнітофекція); в основі інших - лежить взаємодія з хімічними сполуками чи вірусами), які використовуються як носії генетичної інформації. Наприклад, доставка генів є одним із етапів, необхідних для [генної терапії](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%BF%D1%96%D1%8F) та генетичної модифікації культур. Існує багато різних методів доставки генів для різних типів клітин і тканин, від бактеріальних до ссавців. Зазвичай методи можна розділити на дві категорії: невірусні та вірусні.

Таким чином, **трансфекція - це процес введення нуклеїнових кислот в еукаріотичні клітини.** Це може також стосуватися схожих методів для інших типів клітин: " **трансформація** " зазвичай використовується для опису **невірусної передачі ДНК бактерій** **та нетваринних еукаріотичних клітин, в тому числі, клітини рослин**

Вектори для клонування генів рослин. Проаналізуємо пухлинне захворювання рослин, відоме як корончатий гал. Це захворювання рослин викликає грунтова бактерія *Agrobacterium tumefaciens*. Ця бактерія здатна викликати розвиток пухлин у деяких представників голонасінних і у більшості дводольних покритонасінних рослин. Клітини рослинних пухлин інтенсивно ростуть на штучних середовищах і при цьому не вимагають додавання фітогормонів на відміну від клітин нормальних тканин. Ще в 70-х роках минулого століття з’ясувалось, що причиною розвитку пухлин є так звані Ті-плазміди, які були виявлені в клітинах деяких штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Ті-плазміди – це кільцеві молекули ДНК розміром 50-80 мкм з молекулярною масою біля 1,3х108 Д, довжиною до 200 тис. п.н. Ці плазміди здатні транспортуватись з бактерій до клітин рослини, і частина ДНК Ті-плазміди, так звана *Т-ДНК* ковалентно вбудовується до хромосоми інфікованої рослини. Після такої інтеграції до хромосоми рослини *Т-ДНК* викликає утворення пухлини, гіперпродукцію фітогормонів: цитокінінів і ауксинів, а також синтез деяких похідних амінокислот, об’єднаних загальним терміном опіни. Пухлина виникає внаслідок порушення балансу фітогормонів, від яких залежить нормальний розвиток рослини. Опіни, які виділяються клітинами пухлини, бактерія використовує у якості джерела карбону та нітрогену, але в тому випадку, коли *Agrobacterium tumefaciens* містять Ті- плазміну. Ті-плазміда належить до класу кон’югативниєх плазмід, може передаватися до клітин *Agrobacterium tumefaciens*, які були позбавлені таких плазмід. Цей процес ефективно відбувається в зараженій рослині і стимулюється опінами. Такі стосунки між *Agrobacterium tumefaciens* і вищою рослиною Дж.Шелл назвав генетичною колонізацією., яка являє собою експеримент з генної інженерії, який винайшла сама природа. Таким чином, Ті-плазміда – це природний вектор для трансформації клітин вищих рослин. Як показав Дж. Шелл, якщо з клітин корінця тютюну з інтегрованими Т-ДНК отримати культуру (калюс) рослинної тканини, а потім виростити цілі рослини-регенеранти, то при наступному генетичному аналізі ознака «присутність Т-ДНК» виявляє менелевське розщеплення.

У якості векторів для клонування генів і наступної трансформації росли використовують два різновиди Ті-плазмід. Вони розрізняються типами опінів, які синтезують заражені ними рослини. В наш час виділені і про клоновані десятки генів вищих рослин, у тому числі гени, які контролюють запасні білки: сої, ячменя, гороху, кукурудзи.

Першими чужорідними генами, що були введені у вищі рослини, були гени стійкості до антибіотиків. Ген, який кодує бета-глобін кролика, вдалось інтегрувати в геном тютюну. Отримані були рослини тютюну, які світились у темряві завдяки експресії в них гена люциферази світлячка.

Сьогодні активно створюються генетично модифіковані рослини і тварини. **Основні етапи створення генетично модифікованого організму:**

**1 отримання ізольованого гена;**

**2 введення гена у** [**ДНК-вектор**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F))**;**

**3 перенесення вектора з геном в організм, що модифікують (процес** [**трансформації**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F_(%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0))**);**

**4 е**[**кспресія генів**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%95%D0%BA%D1%81%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%96%D1%8F_%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D1%96%D0%B2) **у трансформованій клітині;**

**5 відбір (**[**селекція**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F)**) трансформованого біологічного матеріалу (**[**клону**](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%BE%D0%BD_(%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0))**) від нетрансформованого.**

Отримати нобхідний ген можна як з природного джерела (геному), так і з [геномної бібліотеки](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%96%D0%B1%D0%BB%D1%96%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0_%D0%94%D0%9D%D0%9A). Він може бути отриманий і хімічним (за наявності відповідної послідовності нуклеотидів) чи ферментативним (використання механізму [зворотньої транскрипції](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%97%D0%B2%D0%BE%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%BD%D1%8F_%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BA%D1%80%D0%B8%D0%BF%D1%82%D0%B0%D0%B7%D0%B0)) шляхами. На сьогодні процес штучного (хімічного) синтезу генів є рутинною справою. Здійснюється такий процес за допомогою комп'ютеризованих пристроїв, що продукують різні послідовності ДНК довжиною 100—140 пар нуклеотидів (олігонуклеотиди). Ще одним методом отримання чи накопичення потрібної послідовності ДНК є [ПЛР](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%9B%D0%A0). Щоб вбудувати ген у вектор, використовують [ферменти](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8) — [рестриктази](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%82%D0%B0%D0%B7%D0%B8) та [лігази](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D1%96%D0%B3%D0%B0%D0%B7%D0%B8). За допомогою рестриктаз векторна ДНК розрізається в певних ділянках і вбудовується необхідний ген. Зшивається дана конструкція за допомогою лігази.

Генетично модифіковані організми використовують в біологічних та медичних дослідженнях, виробництві [ліків](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D1%96%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%81%D1%8C%D0%BA%D1%96_%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%B8), [генній терапії](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%BF%D1%96%D1%8F) та у сільському господарстві. За допомогою генетично модифікованих організмів. вивчаються закономірності розвитку деяких захворювань, процеси [старіння](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%82%D0%B0%D1%80%D1%96%D0%BD%D0%BD%D1%8F) та [регенерації](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%80%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F_(%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%8F)). Генну інженерію використовують для створення нових сортів рослин, стійких до несприятливих умов середовища, гербіцидів та шкідників або рослин, що мають покращені ростові та смакові якості. Згідно з Міжнародною службою з придбання агробіотехнічних розробок (ISAAA), у 2010 приблизно 15 мільйонів фермерів вирощували генетично модифіковані культури у 29 країнах. Загальна комерційна цінність біотехнологічних культур, вирощених у 2008 році була оцінена у 130 мільярдів доларів. Найбільше вирощують генетично модифіковану сою, кукурудзу та бавовну. Не менш широко використовують трансмодифікованих тварин. У лютому 2009 FDA схвалила перші біологічні ліки з генетично модифікованої тварини [кози](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%B7%D0%B0). Препарат, [ATryn](https://uk.wikipedia.org/w/index.php?title=ATryn&action=edit&redlink=1), є [антикоагулянтом](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%B0%D0%B3%D1%83%D0%BB%D1%8F%D0%BD%D1%82), який знижує імовірність утворення [тромбів](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B1) під час хірургічного втручання при народженні дитини. Його екстрагують з козячого молока.