

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА
БІОТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА І ПЕРЕРОБКИ
ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА**

ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ В ТВАРИННИЦТВІ

Методичні вказівки

до проведення практичних занять галузі знань: 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності: 204 «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва» ступеня вищої освіти: доктор філософії (PhD)

Генна інженерія у тваринництві: *Методичні вказівки* до проведення практичних занять для здобувачів третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти ступеня доктора філософії (PhD) спеціальностей **204 «Технологія виробництва та переробки продукції тваринництва»**. Розробник: професор, завідувач кафедри технології виробництва і переробки продукції тваринництва Одеського державного аграрного університету – Сусол Р. Л. Одеса: ОДАУ, 2020. 49 с.

Рецензент:

КАРУНСЬКИЙ О.Й. – професор кафедри генетики, розведення та годівлі сільськогосподарських тварин Одеського державного аграрного університету.

Рекомендовано до друку методичною комісією спеціальності 204 «технології виробництва і переробки продукції тваринництва» відділення факультету ВМ та БТ Одеського державного аграрного університету. Протокол № 5 від 23 січня 2020 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
Лабораторно-практична робота №1	
Організація геномів біоти	6
Лабораторно-практична робота №2	
Реплікація та репарація ДНК	10
Лабораторно-практична робота №3	
Реалізація генетичної інформації	13
Лабораторно-практична робота №4	
Електрофорез і побудова рестрикційних карт	19
Лабораторно-практична робота №5	
Полімеразна ланцюгова реакція і секвенування	24
Лабораторно-практична робота №6	
Молекулярні інструменти генетичної інженерії	28
Лабораторно-практична робота №7	
Генетична рекомбінація	32
Лабораторно-практична робота №8	
Генетична трансформація клітин	36
Лабораторно-практична робота №9	
Методика створення генно-інженерних гормонів	40
Лабораторно-практична робота №10	
Створення вакцин нового покоління	43
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	45

ВСТУП

Курс «Генна інженерія» відноситься до складу вибіркових навчальних дисциплін освітньо-професійної програми підготовки здобувачів третього (доктор філософії) рівня вищої освіти зі спеціальності 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва».

Мета навчальної дисципліни – поглибити теоретичні знання та оволодіти необхідними навичками щодо використання генної інженерії у селекційних процесах у тваринництві.

Завдання навчальної дисципліни «Генної інженерії» – ознайомити майбутніх науковців з напрямками використання генетичної інженерії в тваринництві, що охоплюють широке коло питань. Зокрема, це методи цілеспрямованої корекції спадковості та одержання на цій основі трансгенних тварин, які володіють кращими продуктивними якостями та більш стійкі до захворювань (інтеграція трансгенів з хромосомами соматичних і генеративних клітин; тканиноспецифічні регуляторні елементи; ін'єкція рекомбінантної ДНК в зиготи; ретровірусні вектори для введення генів у генеративні клітини; трансгеноз генів, що забезпечує прискорений ріст тварин тощо). Окрім того, важливим напрямом генетичної інженерії в тваринництві є методи створення вакцин нового покоління задля профілактики інфекційних хвороб у тварин, а також синтезу генно-інженерних гормонів, за допомогою яких підвищують продуктивність тварин тощо.

У результаті вивчення навчальної дисципліни «Генна інженерія» здобувач повинен **знати**:

- основні напрямки використання генетичної інженерії в тваринництві;
- основні етапи розвитку і становлення генетичної інженерії;
- інструменти і методи маніпуляцій з генами;
- процедуру одержання генно-інженерних продуктів;
- способи підвищення продуктивності свійських тварин за допомогою генно-інженерних препаратів;
- методи створення трансгенних тварин;
- введення генів до тканин і генна терапія.

Здобувач освіти повинен **вміти**:

- створювати асептичні умови для проведення генно-інженерних досліджень *in vitro*;
- здійснювати підбір живильного середовища для генно-інженерних робіт;
- створювати банк плазмід;
- культивувати плазмідні на певних живильних середовищах на фоні конкретних антибіотиків;
- використовувати гормональні препарати для підвищення росту і продуктивності тварин.

У результаті вивчення дисципліни у аспіранта формуються **спеціальні (фахові) компетентності:**

– здатність планувати, організовувати та проводити наукові дослідження, обробляти, публікувати та патентувати їх результати;

– здатність до комплексного підходу у володінні інформацією щодо сучасного стану і тенденцій розвитку світової і вітчизняної сільськогосподарської науки;

– здатність проведення фахового аналізу різних інформаційних джерел, авторських методик, конкретних освітніх, наукових та професійних матеріалів з технології виробництва і переробки продуктів тваринництва;

– комплексність у виявленні, постановці та вирішенні наукових задач та проблем у технології виробництва і переробки продуктів тваринництва;

– здатність виконувати, аналізувати та критично оцінювати результати експериментальної роботи з біологічними об'єктами тваринництва;

– здатність обґрунтовувати новоздобуті знання в області наукових досягнень з технології виробництва і переробки продуктів тваринництва.

Програмними результатами вивчення дисципліни є:

– обробляти статистично отримані результати наукових досліджень з використанням інформаційних технологій;

– обґрунтовувати систем організації та оптимізації (ведення) селекційного процесу з використанням сучасних методів біотехнологій, відтворення і досягнень генетики;

– удосконалювати методи розведення та селекції тварин на основі оцінки впливу комплексу генотипових і паратипових факторів, способів відбору та підбору.

Тема: **ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ БІОТИ**

Мета: Вивчити хімічну і просторову будову нуклеїнових кислот. Розглянути різновиди РНК і означити функції, які вони виконують. Структуруйте дані з організації геному вірусів, про- і еукаріот.

Віруси є особливими біологічними структурами. Перш за все виникає питання, чи можна їх вважати живими? Істина залежить від прийнятого визначення життя. Зазвичай віруси вважаються живими за «функціональним» визначенням життя, проте не за «структурним».

Геном всіх прокаріот побудований дуже компактно. Кількість некодуючих послідовностей нуклеотидів мінімальна, інтрони рідкісні. Більше того, у прокаріот для кодування білків часто використовуються дві або всі три рамки зчитування одного і того ж гену. Це підвищує кодуєчий потенціал геному без збільшення його розміру. Більшість механізмів регуляції експресії генів, що використовуюється еукаріотами, ніколи не зустрічаються у прокаріот. Таким чином, простота будови геному прокаріот пояснюється, перш за все, їх спрощеним життєвим циклом, протягом якого прокаріотичні клітини, як правило, не зазнають складних диференціювань, пов'язаних з глобальним перемиканням експресії одних груп генів на інші, або тонкою зміною рівнів їх експресії, що має місце в онтогенетичному розвитку еукаріот.

На відміну від прокаріот основна частина геному еукаріот знаходиться в спеціальній клітинній органелі (компаратменті), який називається ядро, а значно менша частина – в мітохондріях, пластидах і центріолях. Так само, як і у прокаріот, інформаційною макромолекулою геному еукаріот є ДНК, яка нерівномірно розподілена в декількох хромосомах у вигляді комплексів з численними білками. Ці ДНК-білкові комплекси еукаріот отримали назву хроматину. Упродовж клітинного циклу хроматин зазнає високовпорядкованих структурних перетворень у вигляді послідовних конденсацій-деконденсацій. У соматичних клітинах при максимальній конденсації в метафазі мітозу ці перетворення супроводжуються формуванням видимих у мікроскопі метафазних хромосом. Як морфологія метафазних хромосом, так і їх число є унікальними характеристиками виду. Сукупність зовнішніх ознак хромосомного набору еукаріот отримала назву каріотипу. Геном еукаріот складають унікальні нуклеотидні послідовності (гени), а також послідовності різного ступеня повторюваності.

Завдання 1. Опануйте хімічний склад нуклеїнових кислот. Запишіть хімічні формули азотистих основ (пуринових та піримідинових) та замалюйте структурну схему нуклеотида. Надайте означення наступним термінам: *нуклеїнові кислоти, нуклеозид, нуклеотид, ефірний зв'язок, N-глікозидний зв'язок, водневий зв'язок.*

Структура нуклеїнових кислот

ДНК (_____)			РНК (_____)		

Завдання 2. Замалюйте фрагмент молекули ДНК згідно з моделлю, запропонованою Дж. Уотсоном і Ф. Кріком (1953 р.).

Завдання 3. Доповніть інформацію щодо варіантів конформації подвійних спіралей нуклеїнових кислот.

Таблиця 2

Характеристика конформацій подвійних спіралей нуклеїнових кислот

Параметр подвійної спіралі	Тип подвійної спіралі				
	A	B	C	D	Z
Напрямок обертання		вправо			
Кут спірального обертання		+35,9°			
Кут нахилу пари нуклеотидів до вісі спіралі		-1,2°			
Кількість пар основ на виток		10,5			
Відстань між парами основ, Å		3,38			
Довжина ланцюга напіввитка, Å		33,2	-	-	
Діаметр спіралі, Å		23,7			

Умови існування та джерела різних типів спіралей нуклеїнових кислот

Тип	Умови існування і джерела
спіралі	
A	
B	
C	
D	
Z	

Завдання 4. Охарактеризуйте особливості вірусів і їх геномів.

	Особливості вірусів і їх геномів
Параметр Будова	Характеристика
Геном	

Завдання 5. Охарактеризуйте особливості геномів клітинних форм життя.

Таблиця 5

Параметр	Особливості геномів клітинних форм життя		
	Клітинна форма життя		
	еубактерії	археї	еукаріоти
Стан (форма спадкового матеріалу)			
Локалізація й розміри			
Організація генів			
Система реплікації ДНК			
Система експресії генів			
Інше			

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

1. *Яка будова та функції нуклеїнових кислот?*
2. *Умови існування та джерела різних типів спіралей нуклеїнових кислот.*
3. *Правила Е. Чаргаффа.*
4. *Особливості вірусів і їх геномів.*
5. *Поняття, будова і функції гену про- та еукаріот.*

Тема: **РЕПЛІКАЦІЯ ТА РЕПАРАЦІЯ ДНК**

Мета: Опанувати особливості реплікації нуклеїнових кислот та визначити роль ферментів, залучених до неї. Окреслити причини виникнення мутацій та механізми захисту від них.

Для того щоб дочірні клітини за своєю структурою і функціями були точною копією батьківських клітин-попередників, вони повинні отримати від батьківських клітин повний набір генетичної інформації у вигляді геномної ДНК, яка організована в хромосомах, і позахромосомних генетичних елементах (плазмідах, мітохондріальній і пластидній ДНК, тощо). У зв'язку з цим перед батьківськими клітинами постає завдання створення точної копії геному та її правильної передачі дочірнім клітинам. Створення такої копії геномної ДНК в батьківських клітинах стає можливим завдяки наявності в них спеціальних ферментних систем, що здійснюють подвоєння молекул ДНК. У результаті реалізації послідовності ферментативних реакцій на матриці батьківських ДНК відбувається біосинтез дочірніх молекул, які є точною копією вихідних молекул. Цей процес подвоєння батьківських молекул геномної ДНК під час відтворення клітин живого організму отримав назву *реплікації*, або *реплікативного синтезу ДНК*.

Реплікацію ДНК здійснює складний ферментний (реплікативний) комплекс, що складається з 15-20 різних білків і називається *реплісомою* (англ. *replisome*). Головним ферментом при цьому виступає ДНК-залежні ДНК-полімерази. За правилами комплементарності положення кожного наступного нуклеотиду споруджуваного ланцюга ДНК однозначно визначається положенням відповідного нуклеотиду матриці.

Велика група молекулярно-генетичних явищ, відома нині під загальною назвою «репарація пошкоджень ДНК», була усвідомлена як окремий і дуже важливий біологічний феномен лише наприкінці 1950-х років. *Репарація* (лат. *Reparatio* – відновлення) – особлива функція клітин, яка полягає в здатності виправляти хімічні пошкодження і розриви в молекулах ДНК, які виникають при нормальному біосинтезі ДНК у клітині або в результаті впливу фізичних чи хімічних агентів.

Систематизація наявних даних про репарацію дозволила всі відомі системи об'єднати в три групи: пряма, ексцизійна та постреплікативна репарації. Варто відмітити, що різні механізми репарації характеризуються здатністю корегувати однакові пошкодження ДНК. Варто відмітити, що різні механізми репарації характеризуються здатністю корегувати однакові пошкодження ДНК.

Завдання 1. Охарактеризуйте загальні принципи реплікації нуклеїнових кислот. Надайте означення наступним термінам: *реплікація*, *реплісома*, *реплікон*, *реплікатор*, *контроль реплікації*, *механізм реплікації*, *етапи реплікації*.

Завдання 2. Опануйте принципи реплікації ДНК прокаріот. Надайте означення наступним термінам і характеристику ферментам, задіяним у реплікації: *реплікативні вила, лідируючий ланцюг, відстаючий ланцюг, фрагменти Оказаки, затравки (праймери), процесивність.*

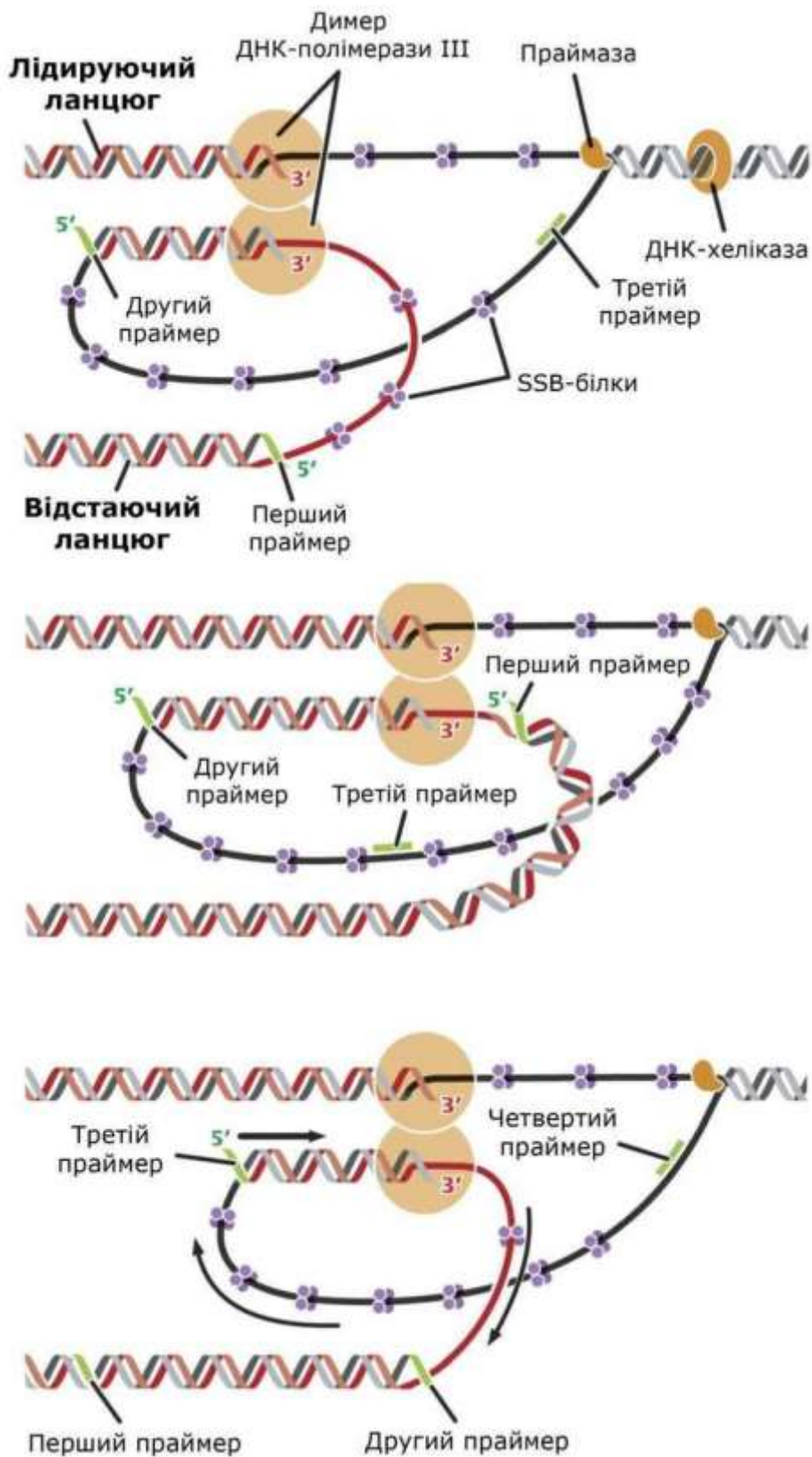


Рис. 1. Схема реплікативних вил *E. coli*

Особливості будови ферментів й виконувани ними функції

Назва ферменту	Особливості будови й виконувани функції
Топоізомераза	
ДНК-геліказа	
ДНК-праймаза	
ДНК-полімераза III	
РНКаза H	
ДНК-полімераза I	
ДНК-лігаза	

Завдання 3. Охарактеризуйте родину ДНК-полімераз еукаріот: ДНК-полімераза α , ДНК-полімераза δ , ДНК-полімераза ε , ДНК-полімераза γ , теломераза.

Завдання 4. Охарактеризуйте мутагенні чинники та механізми превентивного захисту геному від них: помилки реплікації, мутагенне випромінювання, хімічні мутагени, ендогенні мутагени, рівні превентивного захисту ДНК.

Завдання 5. Охарактеризуйте системи репарації ДНК: репарація, пряма репарація, ексцизійна репарація, постреплікативна репарація.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

1. Як відбувається реплікація ДНК та за участю яких ферментів?
2. Принципи реплікації ДНК прокаріот.
3. Характеристика родини ДНК-полімераз еукаріот.
4. Мутагенні чинники та механізми превентивного захисту геному від них.
5. Системи репарації ДНК.

Тема: **РЕАЛІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ.**

Мета: Описати й опанувати загальні особливості експресії генів та її етапів, визначивши роль ферментів у них. Охарактеризувати різновиди РНК. Здійснити моделювання синтезу білків.

Під час передачі генетичної інформації від генів до молекулярних об'єктів, яким вона адресована по існуючих каналах зв'язку, має місце її багаторазове декодування і перекодування аж до остаточного втілення у фенотипових ознаках. Тобто відбувається *експресія генів*. Спрощуючи наведене визначення можна тлумачити експресію генів як процес реалізації генетичної інформації. Для повноти розуміння цього явища необхідно знати що таке ген. Отже, *ген* – це найменша структурно-функціональна одиниця спадкового матеріалу, яка відповідає за формування певної елементарної ознаки.

Кінцевим результатом експресії генів має бути утворення повноцінних у функціональному відношенні макромолекул білків або нуклеїнових кислот, які формуватимуть певний фенотип організму.

На першому етапі експресії генів відбувається переписування генетичної інформації, закодованої в генах, на матричні (інформаційні) РНК (м(і)РНК), які є місцем проміжного зберігання цієї інформації при її реалізації. У деяких випадках вже самі РНК є кінцевим результатом експресії генів, і після низки ферментативних модифікацій вони безпосередньо використовуються в клітинних процесах. Це стосується, перш за все, рибосомних і транспортних РНК (рРНК і тРНК), які разом складають основну частину сумарної РНК клітини. Окрім того, до таких РНК належать і малі ядерні РНК (мяРНК), які приймають участь у процесингу попередників мРНК еукаріот, а також РНК, які входять до складу ферментів, і природні антисенсові РНК. В цілому синтез РНК відбувається в результаті складної послідовності біохімічних реакцій, яка називається *транскрипція*. На другому етапі реалізації генетичної інформації – *трансляції* – послідовність нуклеотидів мРНК відповідно до генетичного коду однозначно визначає послідовність амінокислотних залишків синтезованих білків.

Завдання 1. Надайте означення термінам: *ген, експресія генів, головна догма молекулярної біології*. Охарактеризуйте загальні особливості експресії генів.

Таблиця 7

Типи передачі спадкової інформації

Загальні	Особливі	Невідомі
1.	1.	1.
2.	2.	2.
3.	3.	3.

Завдання 2. Опануйте принципи та етапи транскрипції. Надайте означення термінам: *транскрипція, фактори транскрипції, промотор, термінатор, транскриптон, кодуєчий (матричний) ланцюг, некодуєчий (захисний) ланцюг, оперон, цистрон.*

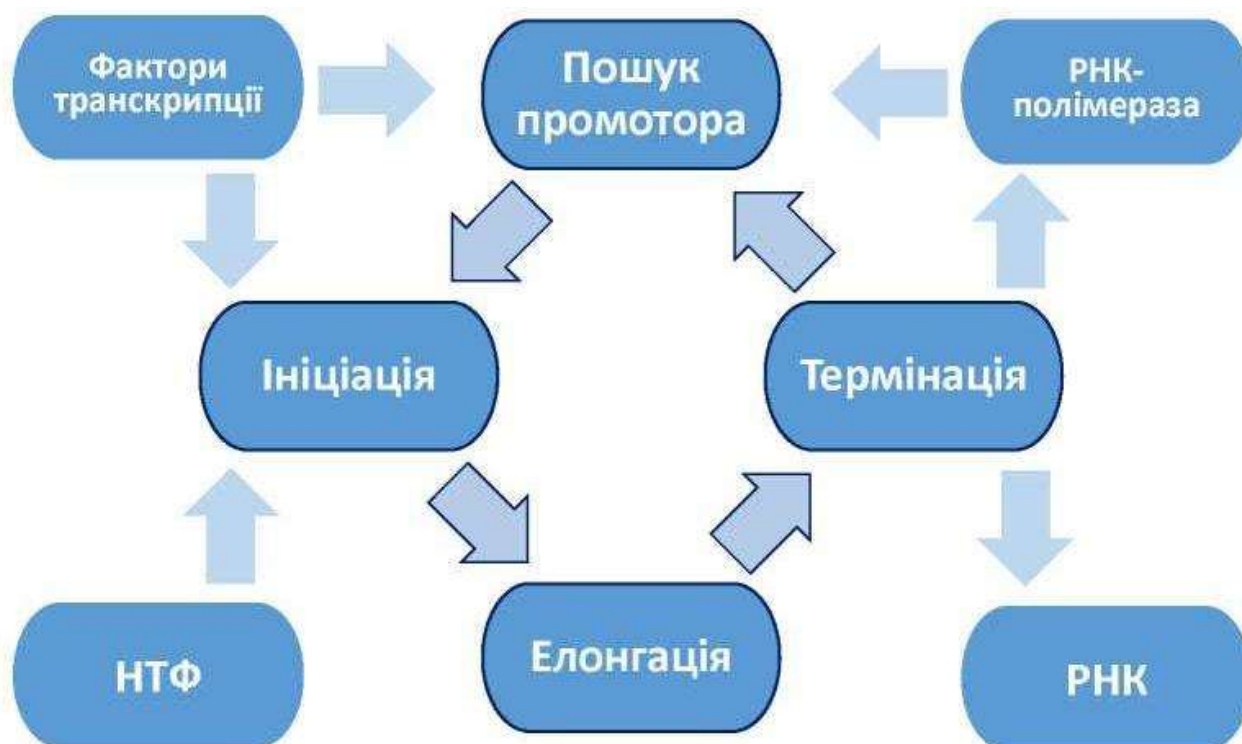


Рис. 2. Цикл транскрипції

Таблиця 8

Характеристика етапів транскрипції

Етап	Характеристика
Зв'язування (преініціація)	
Ініціація	
Елонгація	
Термінація	

Завдання 3. Охарактеризуйте родину РНК-полімераз і промоторів відповідних ферментів еубактерій та еукаріот (Pol II): *РНК-полімераза*

еубактерій, РНК-полімераза I еукаріот, РНК-полімераза II еукаріот, РНК-полімераза III еукаріот, РНК-полімераза мітохондрій, РНК-полімерази пластид, РНК-полімераза архей.

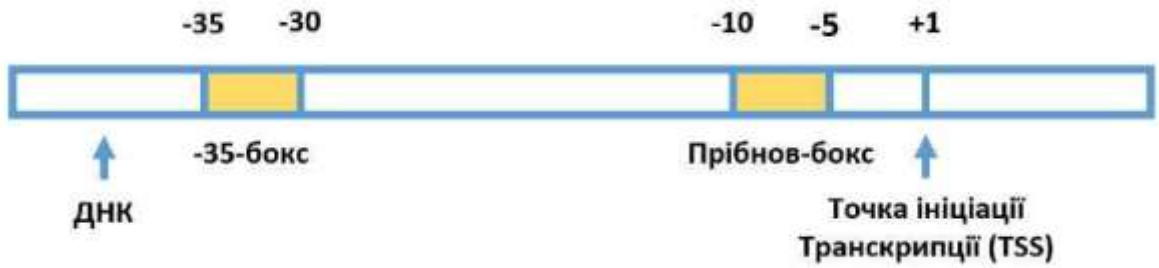


Рис. 3. Структура промотору еубактерій



Рис. 4. Структура промотору еукаріот для РНК-полімерази II

Завдання 4. Охарактеризуйте загальні особливості РНК (РНК, основні родини РНК), їх типи (матрична РНК, транспортні РНК, рибосомальні РНК, транспортно-матрична РНК) та функції (реплікативна, кодуюча, регуляторна, структуроутворююча, впізнання, каталітична).

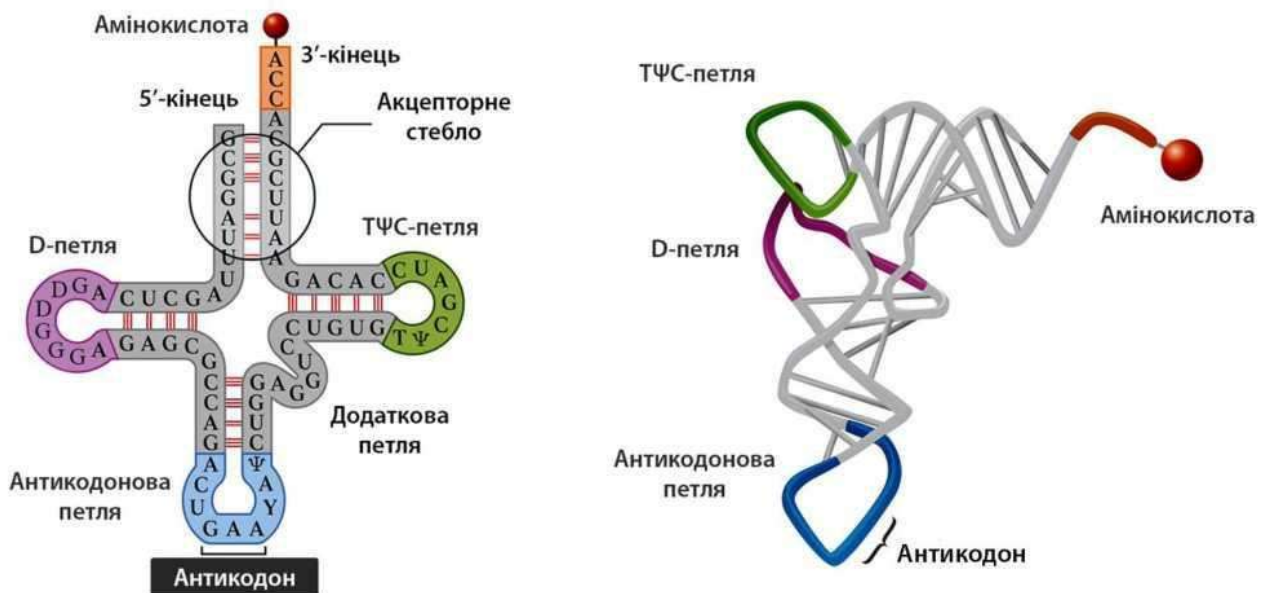


Рис. 5. Будова тРНК (вторинна і третинна структури)

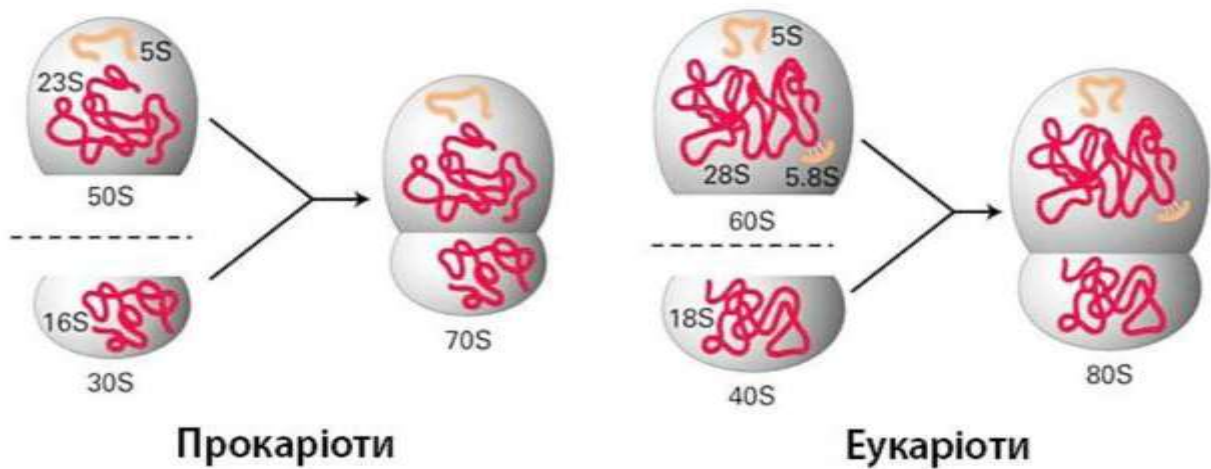


Рис. 6. Вміст рРНК в рибосомах про- та еукаріот

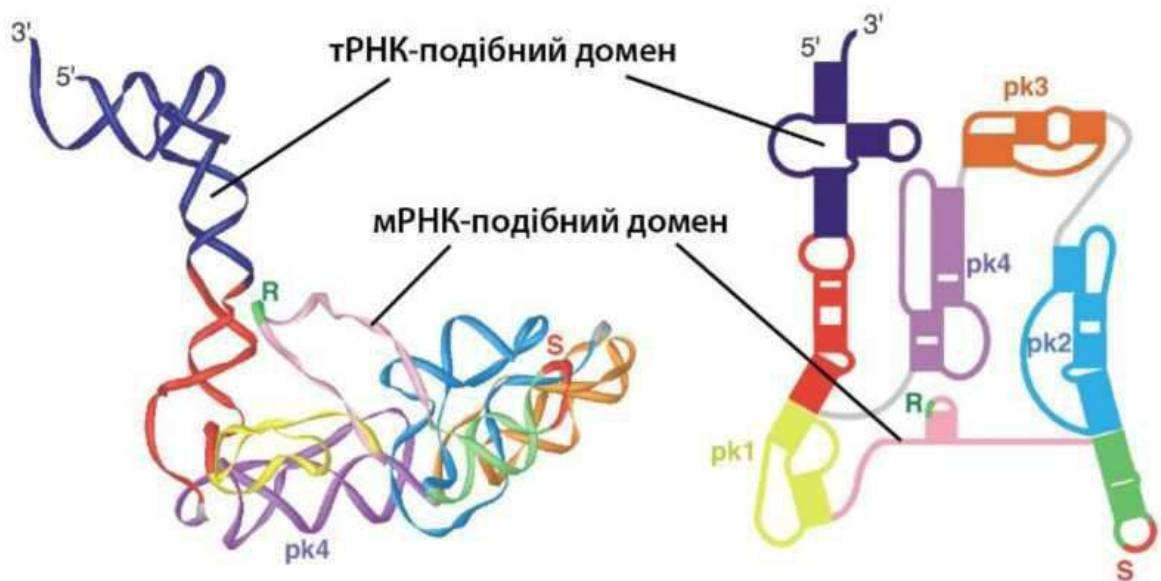


Рис. 7. Третинна і вторинна структури тмРНК

Завдання 5. Поясніть суть і значення етапів процесингу РНК еукаріот. Надайте означення наступним термінам: *кепування, поліаденілювання, сплайсинг, екзони, інтрони, донор сплайсингу, акцептор сплайсингу, точка розгалудження інтрону, сплайсосома, аутосплайсинг, альтернативний сплайсинг, редагування мРНК.*

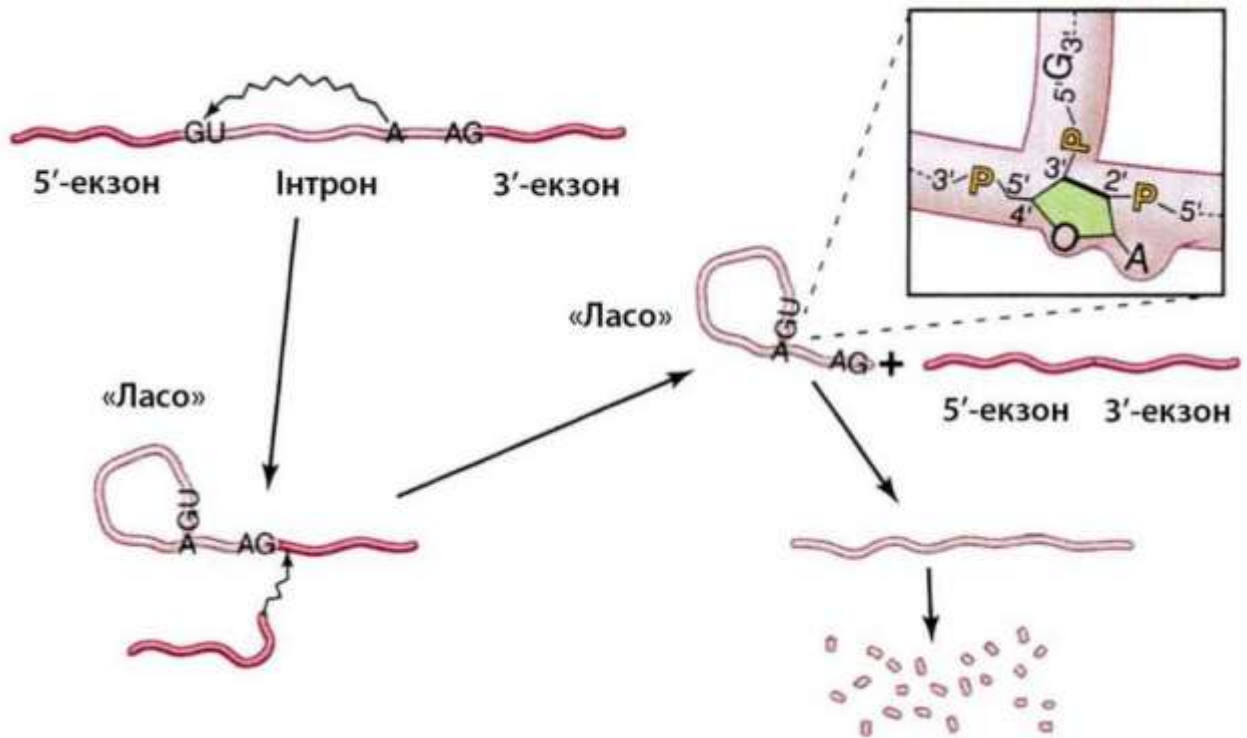


Рис. 8. Механізм сплайсингу

Завдання 6. Охарактеризуйте генетичний код і його властивості. Надайте означення наступним термінам: *генетичний код, триплет, кодон, старт-кодон, стоп-кодони, ізоакцепторні кодони, властивості генетичного коду.*

Завдання 7. Опишіть принципи будови і функціонування рибосом, зокрема і їх сайтів зв'язування з РНК.

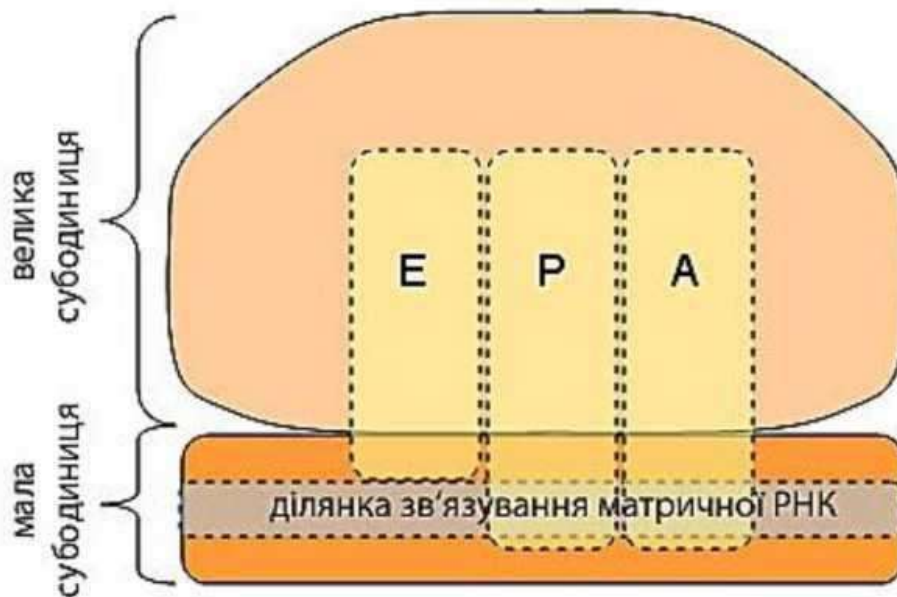


Рис. 9. Схема сайтів зв'язування з РНК на рибосомі

(А – аміноацил-тРНК-зв'язуюча (акцепторна) ділянка; Р – пептидил-тРНК-зв'язуюча (донорна) ділянка; Е – ділянка виходу тРНК (англ. exit).

Завдання 8. Надайте загальні відомості механізму трансляції і її етапів: трансляція, трансляція і транскрипція у прокаріот, трансляція і транскрипція у еукаріот, активація тРНК, ініціація, елонгація, термінація.

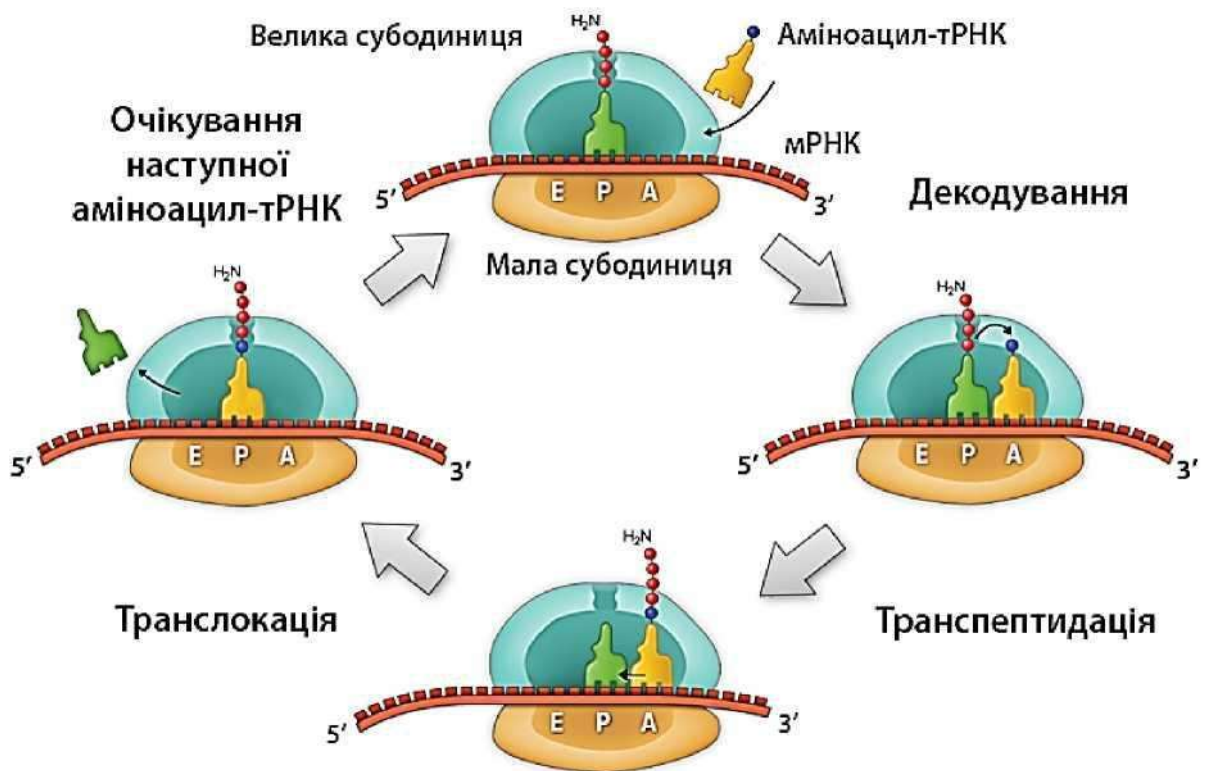


Рис. 10. Схема циклу трансляції

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

1. Що таке транскрипція РНК? Локалізація, ферменти, що задіяні, та етапи процесу.
2. Характеристика родини РНК-полімераз.
3. Загальні особливості РНК, їх типи та функції.
4. У чому полягає суть дозрівання мРНК еукаріот?
5. Що називається генетичним кодом та які властивості йому характерні?
6. Принципи будови і функціонування рибосом.
7. Охарактеризуйте етапи трансляції білка та які чинники залучені до цього процесу?

Тема: **ЕЛЕКТРОФОРЕЗ І ПОБУДОВА РЕСТРИКЦІЙНИХ КАРТ**

Мета: Вивчити принципи, особливості проведення, різновиди і значення електрофорезу. Навчитись складати карти сайтів рестрикції лінійних і кільцевих молекул ДНК.

Електрофорез – рух дисперсних твердих частинок, рідинних крапель або газових пухирців, йонів тощо завислих в рідинному або газоподібному середовищі в електричному полі постійного струму під дією електрокінетичних сил, що виникають завдяки утворенню подвійного електричного шару на межі розділу фаз. Розрізняють два різновиди електрофорезу: *катафорез* – випадок електрофорезу, при якому частинки дисперсної фази рухаються в напрямку катода і *анафорез*, коли дисперсійні часточки рухаються до аноду.

Сили електричного поля, що прикладаються до зразків, змушують фрагменти ДНК мігрувати крізь гель. Для електрофоретичного аналізу ДНК зазвичай використовують агарозний (для відносно довгих молекул ДНК) і поліакриламідний (для високоточного розділення коротких молекул ДНК, наприклад, у випадку секвенування) гелі. Цукрофосфатний остов молекул ДНК заряджений негативно і тому ланцюги ДНК рухаються від катода, зарядженого негативно, до позитивного анода. Більш довгі молекули мігрують повільніше, оскільки затримуються в гелі, більш короткі молекули рухаються швидше. У рідкому розчині здійснити процедуру відокремлення фрагментів ДНК не можливо, тому в якості носія використовують гель-концентрований розчин полімеру.

Перед початком електрофорезу до зразків прийнято додавати два різних барвника з кислим значенням рН (часто для цих цілей використовують, ксіленовий блакитний і бромфеноловий синій), щоб візуалізувати хід електрофорезу. Барвник також необхідний для того, щоб визначити, коли варто зупинити процес.

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 кожною з рестриктаз окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК. Тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції уздовж молекули. Визначивши розмір отриманих фрагментів за допомогою гель-електорофезу можна знайти положення сайтів рестрикції (здійснити *картування*).

Завдання 1. Охарактеризуйте принципи електрофорезу: *електрофорез*, *використання барвників*, *буферний розчин*, *визначення розмірів фрагментів*.

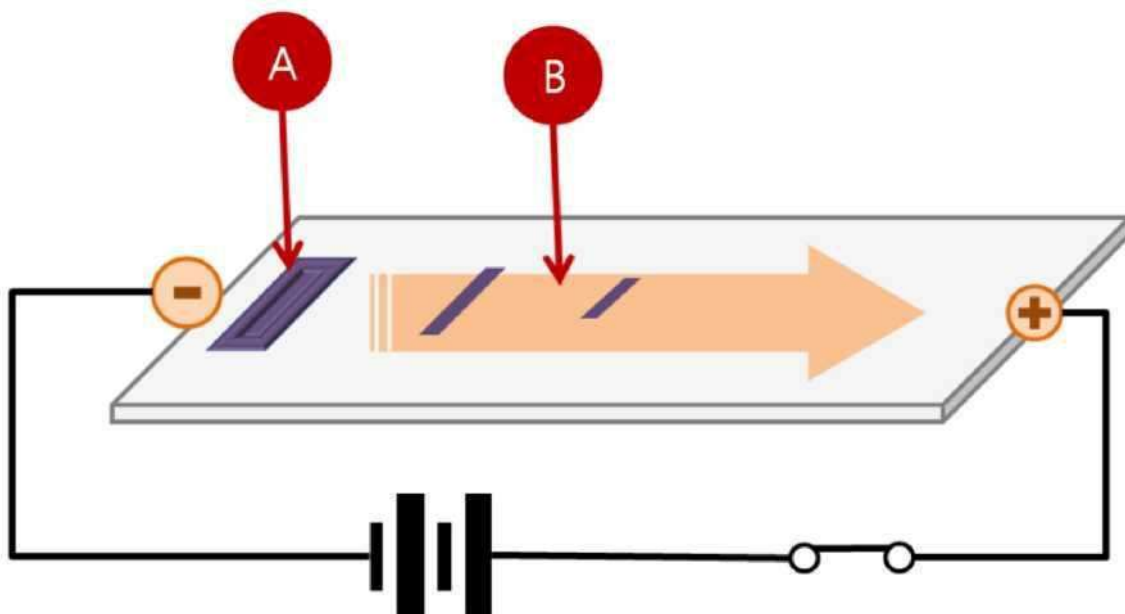


Рис. 11. Принципова схема електрофорезу

(А – чарунка, куди поміщають зразок ДНК; В – напрям руху фрагментів ДНК)

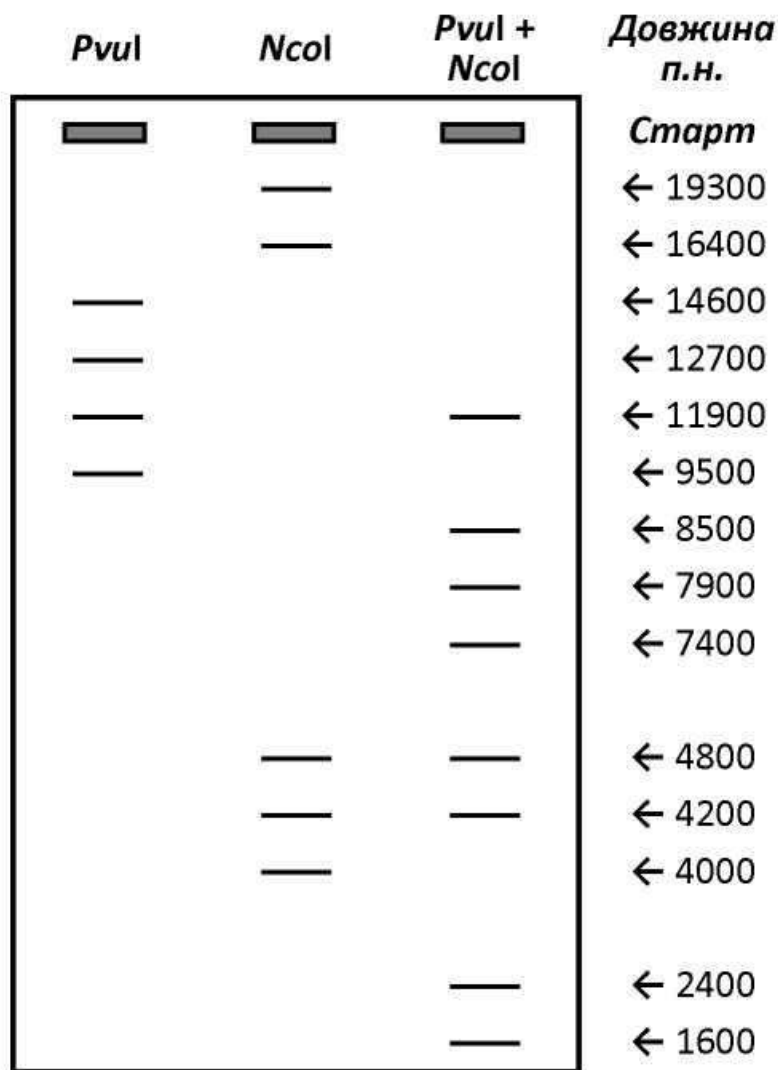
Завдання 2. Опишіть особливості різновидів електрофорезу та у яких галузях суспільного життя вони використовуються: *горизонтальний електрофорез, вертикальний електрофорез, електрофорез у медицині, електрофорез у наукових дослідженнях.*

Завдання 3. Опишіть процедуру побудови рестрикційної карти та розберіть поданий приклад: *рестрикційна карта.*

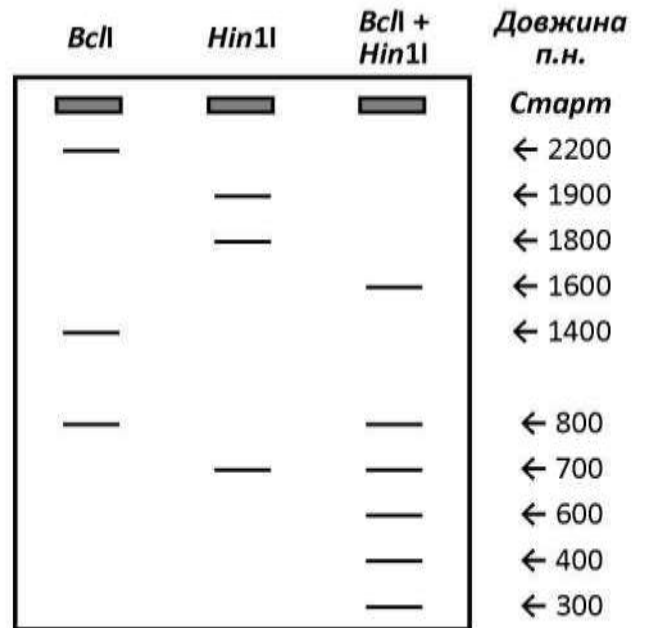
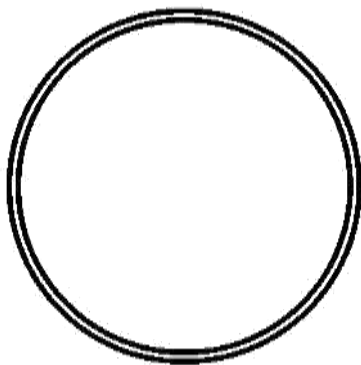
<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI + BamHI</i>	Довжина п.н.
			Старт
			← 950
			← 850
			← 600
			← 500
			← 400
			← 300
			← 250
			← 100

Завдання 4. Виконайте наступні задачі.

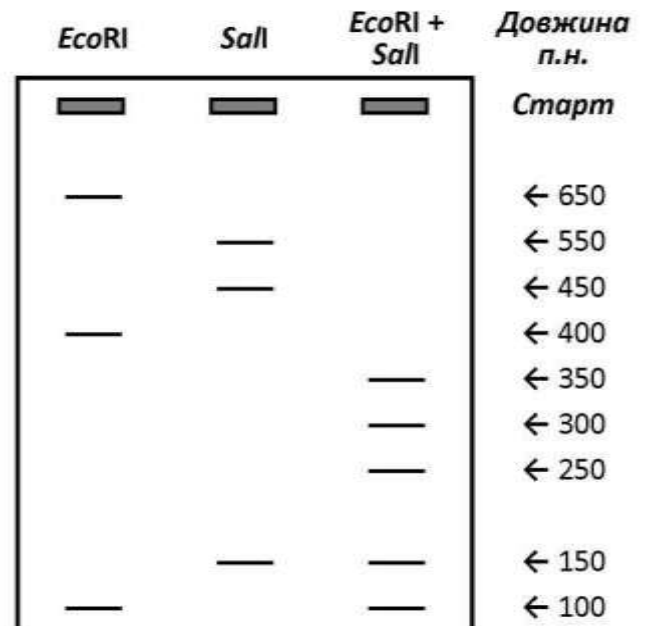
1. Віріонну (лінійну) ДНК бактеріофага λ обробили рестриктазою *PvuI*, рестриктазою *NcoI*, а також сумішню обох рестриктаз. Продукти реакцій розділили в агарозному гелі і пофарбували бромистим етидієм. Цифри праворуч вказують приблизні розміри фрагментів у п.н. Визначте координати сайтів *PvuI* і *NcoI* в ДНК фага λ .



2. Плазмідну ДНК обробили рестриктазами *BclI*, *HinII* і їх сумішшю. Продукти реакцій розділили в агарозному гелі і пофарбували бромистим етидієм. Цифри праворуч вказують приблизні розміри фрагментів у п.н. Побудуйте рестрикційну карту плазміди.



3. Лінійний фрагмент ДНК обробили рестриктазою *EcoRI*, рестриктазою *SalI* і їх сумішшю. Продукти реакцій розділили в агарозному гелі і пофарбували бромистим етидієм. Цифри праворуч вказують приблизні розміри фрагментів у п.н. Побудуйте рестрикційну карту фрагменту.



Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

- 1. Характеристика принципів електрофорезу.*
- 2. Особливості різновидів електрофорезу та у яких галузях суспільного життя вони використовуються.*
- 3. Опишіть процедуру побудови рестрикційної карти.*

Тема: ПОЛІМЕРАЗНО ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ І СЕКВЕНУВАННЯ

Мета: Опанувати суть і послідовність проведення ПЛР та напрями її застосування. Засвоїти поняття і принципи проведення секвенування класичними й сучасними методами.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – експериментальний метод молекулярної біології, який дозволяє досягти значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) в біологічному матеріалі (пробі).

Окрім *ампліфікації* ДНК (збільшення копій), ПЛР дозволяє здійснювати безліч інших маніпуляцій з нуклеїновими кислотами (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК) і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад, для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, для клонування генів, виділення нових генів, тощо.

Ідея методу і її втілення дуже прості. Спочатку синтезуються два дезоксиолігонуклеотиди довжиною 20-30 основ, що є кінцевими послідовностями фрагменту ДНК, який вивчають. Полярність обрана так, щоб після відпалу їх напрями (5'→3') були звернені один до одного. Надмірну кількість цих олігонуклеотидів змішують з ДНК геному, і суміш нагрівають для денатурації останньої. Зниження температури призводить до реасоціації олігонуклеотидів з гомологічними ділянками ДНК генома. У подальшому проводять нарощування ланцюга за участю ДНК-полімерази і дезоксирибонуклеотидтрифосфатів. Така послідовність реакцій денатурації, реасоціації і нарощування ланцюга повторюється 20-30 разів.

На практиці ефективність кожного циклу ампліфікації складає 20-50%, тобто при проведенні достатнього числа циклів можна досягти збільшення кількості специфічної послідовності до мільйону копій.

Секвенування ДНК – набір біохімічних методів встановлення послідовності нуклеотидних основ ДНК: аденіну, гуаніну, цитозину і тиміну.

Послідовність ДНК кодує спадкову генетичну інформацію живих клітин та деяких органел, що закладає основу програм розвитку всіх живих організмів. Таким чином, визначення послідовності ДНК корисне як для дослідження всіх фундаментальних біологічних процесів, так і для прикладних методів, таких як діагностика захворювань та судова медицина.

У біотехнології рекомбінантних ДНК зазвичай використовують два різних методи секвенування ДНК: хімічний та ферментативний. Обидва методи надзвичайно надійні, швидкі у виконанні і результативні. Результати секвенування дозволяють на основі генетичного коду визначити амінокислотну послідовність білка відповідно до нуклеотидної послідовності певного гена.

Схема *хімічного методу секвенування ДНК* передбачає, що вихідний фрагмент ДНК, мічений ^{32}P на 5'-кінці, піддається специфічному розщепленню за певним нуклеотидом (наприклад, А), в результаті чого утворюються

фрагменти різної довжини.

Першим методом прямого ферментативного секвенування ДНК став метод, запропонований Frederick Sanger (нар. 1918) і Alan R. Coulson у 1975 р. У якості матриці в реакції полімеразного копіювання використовувався одноланцюговий фрагмент ДНК, у якості праймерів – синтетичні олігонуклеотиди або природні субфрагменти, що отримані при гідролізі рестрикційними ендонуклеазами, а в якості ферменту – фрагмент Кленова ДНК полімерази I (PolI) з E.coli.

Завдання 1. Охарактеризуйте полімеразно ланцюгову реакцію (ПЛР): полімеразно ланцюгова реакція, вихідні компоненти ПЛР, послідовність проведення ПЛР.

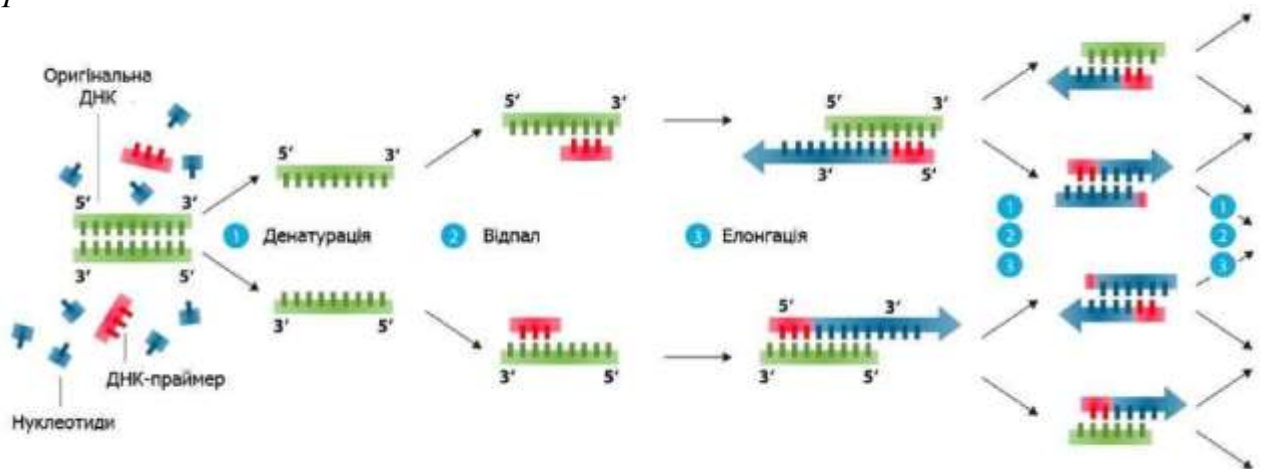


Рис. 12. Принципова схема ПЛР

Завдання 2. Опишіть у яких галузях суспільного життя застосовується полімеразно ланцюгова реакція: аналіз довжин рестрикційних фрагментів, криміналістика, встановлення батьківства, медична діагностика, клонування генів, секвенування ДНК, мутагенез.

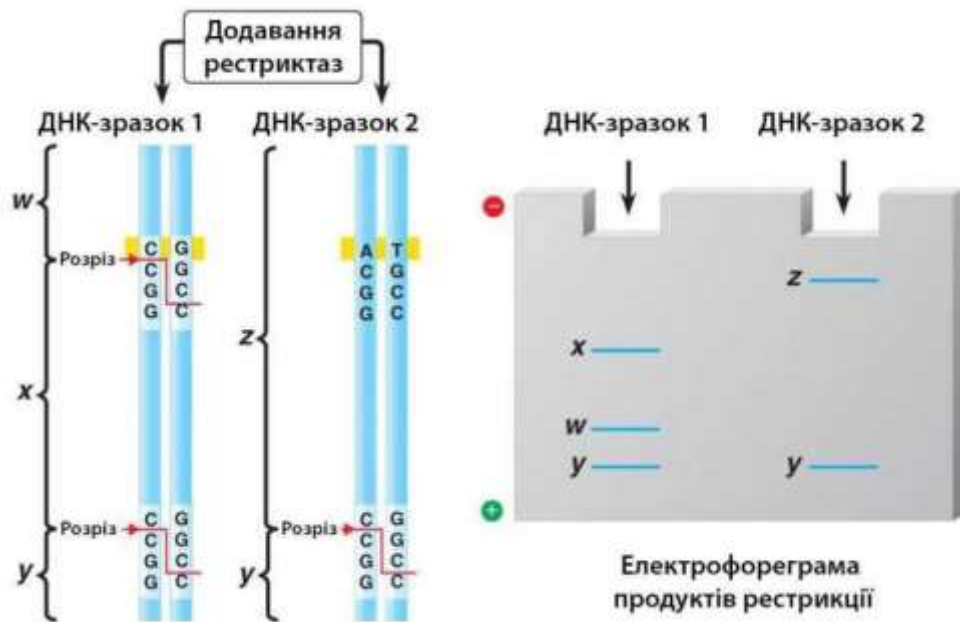


Рис. 13. Принципова схема методу ПДРФ

Завдання 3. Опишіть принципи класичних методів секвенування: секвенування, хімічне секвенування, ферментативне секвенування.

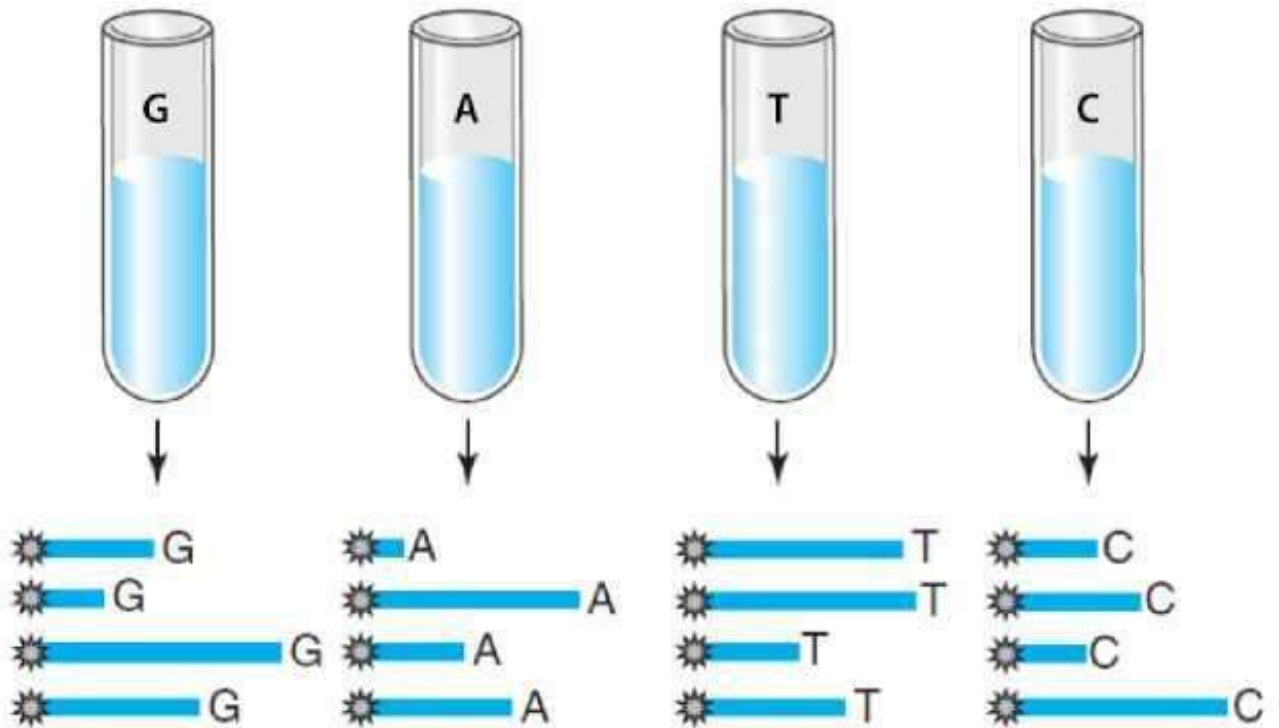


Рис. 14. Схема хімічного методу секвенування ДНК

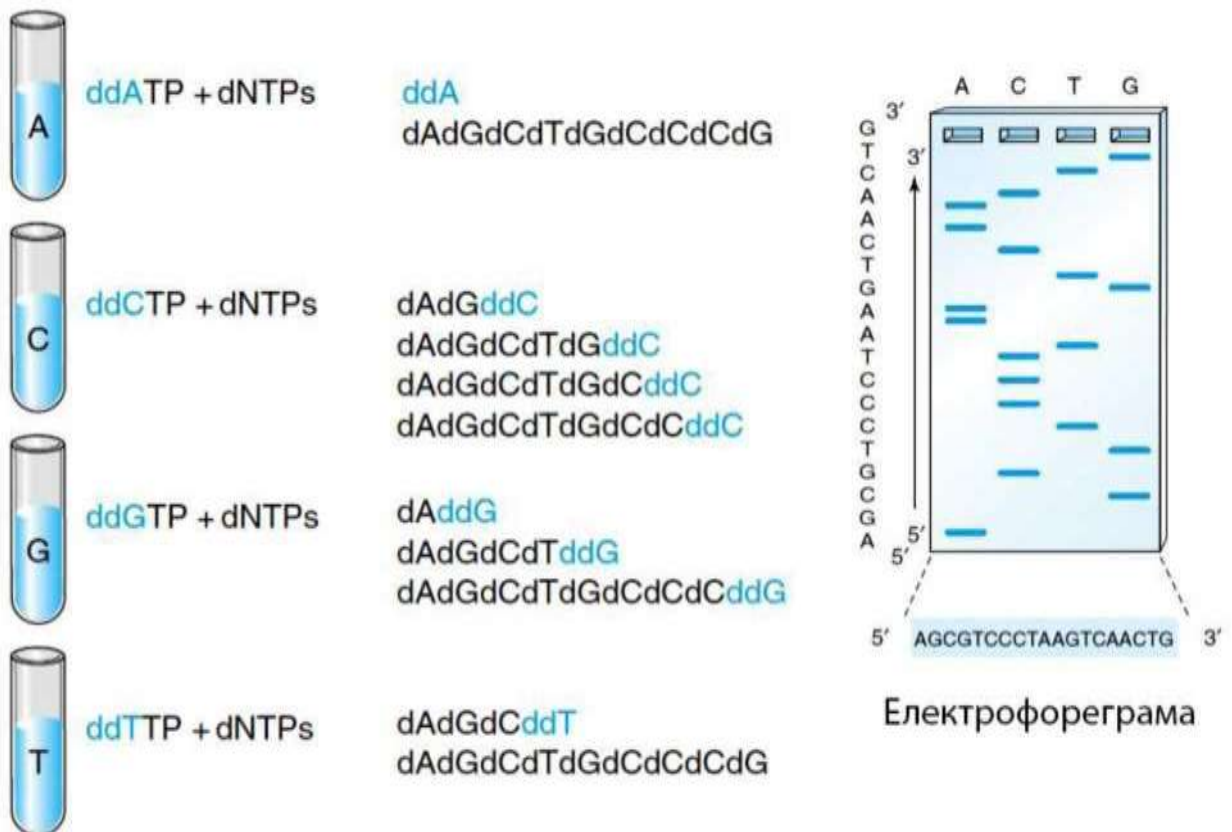


Рис. 15. Схема ферментативного секвенування ДНК

Завдання 4. Опишіть на вибір один з методів секвенування нового покоління: піросеквенування, метод Шлітіна, SOLiD, істинне одномолекулярне секвенування, одномолекулярне секвенування у реальному часі, іонне напівпровідникове секвенування, нанопорове секвенування.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

- 1. Охарактеризуйте ПЛР.*
- 2. У яких галузях суспільного життя застосовується ПЛР?*
- 3. Напрями використання ПЛР у тваринництві.*
- 4. Надайте визначення, опишіть різновиди і значення секвенування.*
- 5. Методи секвенування нового покоління.*

Тема: **МОЛЕКУЛЯРНІ ІНСТРУМЕНТИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Мета: Описати ферменти, які використовуються в генно-інженерних дослідженнях і проектах. Зазначити послідовності нуклеотидів для сайтів впізнавання деяких рестриктаз II.

Серед ферментів, що використовуються в генетичній інженерії для клонування, велике значення мають ендонуклеази рестрикції – *рестриктази*. Ці ферменти, вперше відкриті як частина системи рестрикції-модифікації ДНК у бактерій, специфічно гідролізують молекули дволанцюгових ДНК за наявності в них певних послідовностей нуклеотидів, так званих *сайтів рестрикції*. У той же час метилази використовують для обмеження числа сайтів рестрикції і отримання більших фрагментів ДНК за допомогою рестриктаз.

Застосування рестриктаз значно полегшило роботу з рекомбінантними ДНК. Кожна з сотень відомих сьогодні рестриктаз розпізнає специфічну коротку (зазвичай довжиною 4 і 6 нуклеотидів) послідовність в дволанцюговій ДНК і розщеплює її тільки в цій ділянці. Використовуючи декілька рестриктаз, можна скласти детальну карту рестрикційних сайтів для будь-якого фрагмента ДНК завдовжки від декількох сотень до десятків тисяч нуклеотидів.

Створення фосфодієфірних зв'язків у одноланцюгових розривах дволанцюгової ДНК за допомогою *ДНК-лігази* є разом з рестриктазами одним з найважливіших етапів отримання рекомбінантних ДНК *in vitro*. Найбільше застосування в генно-інженерних дослідженнях знаходить ДНК-лігаза бактеріофага T4.

До ферментів матричного синтезу нуклеїнових кислот відносяться численні *ДНК- і РНК-залежні ДНК- і РНК-полімерази*, що здійснюють залежний від матричних ДНК або РНК синтез нуклеїнових кислот. Ці ферменти зазвичай використовуються в генетичній інженерії для отримання дволанцюгових молекул ДНК з одноланцюгових, а також для зворотної транскрипції, тобто синтезу дволанцюгових ДНК, комплементарних мРНК, які називають комплементарними ДНК (кДНК).

Незважаючи на високу ферментативну активність ДНК-полімераз, вони не здатні ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль виконують РНК-полімерази. Фермент РНК-полімераза знаходить промотори, активує матрицю ДНК і відбувається локальне розплітання подвійної спіралі ДНК. Однак, основна роль РНК-полімераз полягає у каталізі процесу транскрипції (тобто створенні РНК на підставі ланцюгу ДНК).

Зворотні транскриптази (РНК-залежні ДНК-полімерази) здатні здійснювати синтез ДНК на матриці РНК, за рахунок полімеризації чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів, як це має місце у випадку ДНК-залежних ДНК-полімераз.

Важливими ферментами генної інженерії також є *полінуклеотидкіназа, термінальна трансфераза, лужні фосфатази, нуклеази, екзонуклеази, панкреатична рибонуклеаза А, панкреатична дезоксирибонуклеаза І*.

Завдання 1. Охарактеризуйте ферменти рестрикції і модифікації нуклеїнових кислот: рестриктази, номенклатура: сайт рестрикції, паліндром, «липкі» кінці, «тупі» кінці, рестриктази II, ізошизомери, ДНК-метилази.

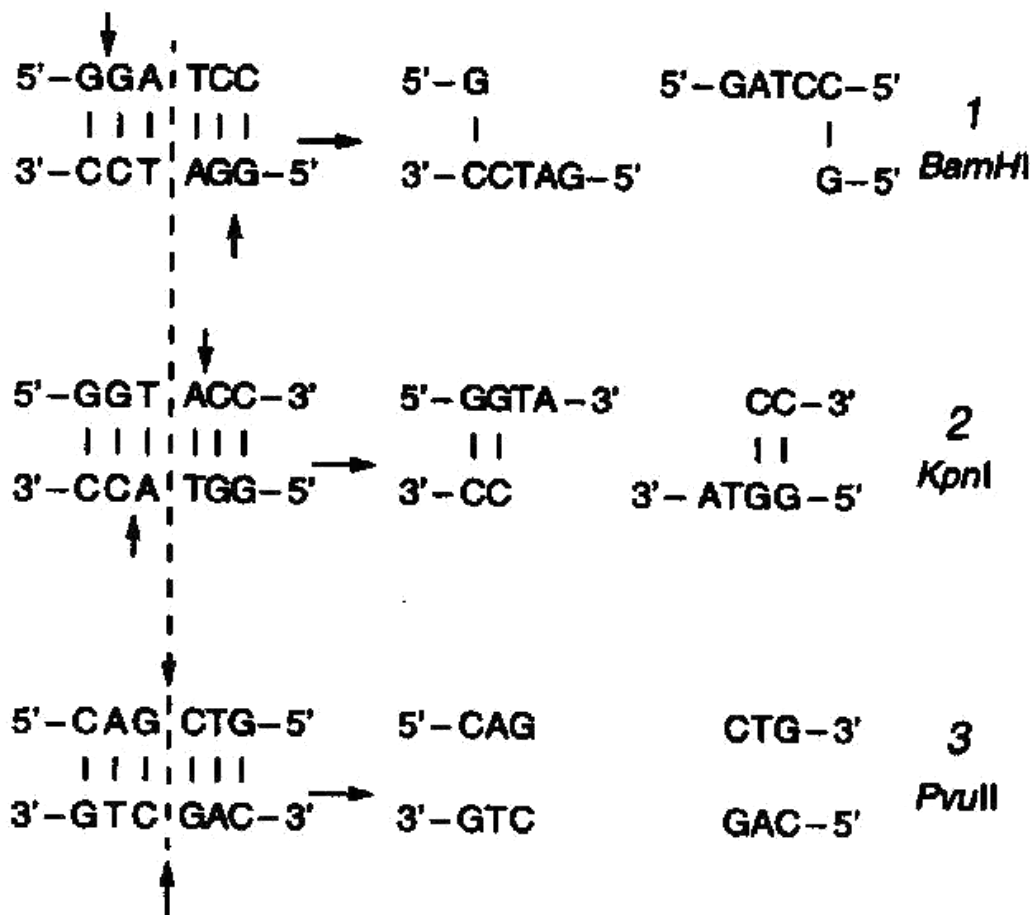


Рис. 16. Форми розривів дволанцюгових ДНК, утворених рестриктазами: 5'-виступаючі (1), 3'-виступаючі «липкі» (2) і «тупі» (3) кінці ДНК, що утворюються під дією рестриктаз *BamHI*, *KpnI* і *PvuII* відповідно. Стрілками позначені місця розривів ланцюгів ДНК, пунктирною лінією – вісь симетрії сайтів рестрикції

Таблиця 9

Характеристика сайтів впізнавання для деяких рестриктаз II

Фермент	Сайт впізнавання	Фермент	Сайт впізнавання
1	2	3	4
Симетричні (N=6)			
<i>Bal</i> I		<i>Pst</i> I	
<i>Bam</i> HI		<i>Pvu</i> II	
<i>Bcl</i> I		<i>Sma</i> I	
<i>Bgl</i> II		<i>Sac</i> I	
<i>Eco</i> RI		<i>Sac</i> II	
<i>Hind</i> III		<i>Sal</i> I	
<i>Hpa</i> I		<i>Xba</i> I	
<i>Kpn</i> I		<i>Xho</i> I	

1	2	3	4
Вироджені симетричні (N=6)			
<i>Acc</i> I		<i>Hae</i> II	
<i>Ava</i> I		<i>Hgi</i> AI	
<i>Hae</i> I		<i>Hind</i> II	
Симетричні (N=5)			
<i>Asu</i> I		<i>Eco</i> RII	
<i>Ava</i> II		<i>Hin</i> fI	
Симетричні (N=4)			
<i>Alu</i> I		<i>Hpa</i> II	
<i>Hae</i> III		<i>Mbo</i> I	
<i>Hha</i> I		<i>Taq</i> I	
Симетричні метиловані (N=4)			
<i>Dpn</i> I		<i>Msp</i> I	
Асиметричні (N=5)			
<i>Bbv</i> I		<i>Hph</i> I	
<i>Hga</i> I		<i>Mbo</i> II	

Завдання 2. Надайте характеристику ДНК- і РНК-лігазам.

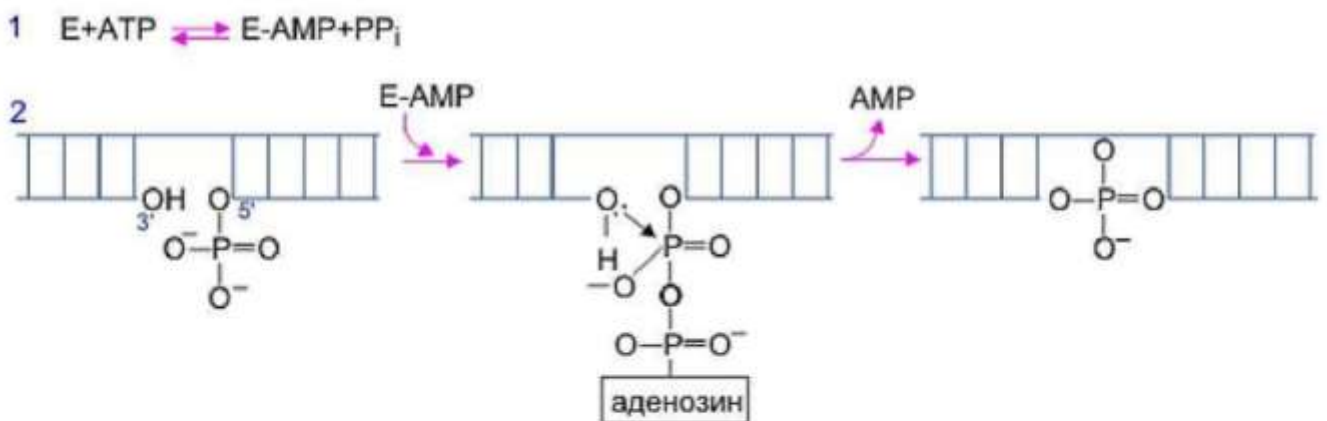


Рис. 17. Механізм лігування ДНК Т4-ДНК-лігазою

Завдання 3. Охарактеризуйте ферменти матричного синтезу ДНК і РНК: ДНК-залежні ДНК-полімерази, ДНК-залежні РНК-полімерази, РНК-залежні ДНК-полімерази.

Завдання 4. Опишіть наступні ферменти генної інженерії.: полінуклеотидкінази, термінальна трансфераза, лужні фосфатази, нуклеаза *Bal* 31, екзонуклеаза *E.coli*, екзонуклеаза фага λ , Нуклеаза *S1*, панкреатична рибонуклеаза *A*, панкреатична дезоксирибонуклеаза *I*.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

- 1. Охарактеризуйте ферменти рестрикції і модифікації нуклеїнових кислот.*
- 2. Надайте характеристику ДНК- і РНК-полімеразам.*
- 3. Опишіть групу ферментів нуклеази.*
- 4. Охарактеризуйте ДНК-метиلاзи і лігази.*
- 5. Надайте характеристику ревертази і термінальній трансферазі.*

Тема: **ГЕНЕТИЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ**

Мета: Оволодіти методами створення рекДНК та описати основні групи векторів, що використовуються при цьому.

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

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

З'єднання за однойменними «липкими» кінцями (рестриктазно-лігазний метод). Деякі рестриктази, наприклад Eco R1, розрізають дволанцюгову ДНК таким чином, що протилежні ланцюги розміщуються із зсувом один від одного на рівної відстані від центру сайту узнавання. Ці комплементарні одна до одної ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок парування основ.

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). Процес приєднання ділянок полі-А і полі-Т здійснюється за допомогою ферменту – кінцевої трансферази. Фрагменти, що побудовані таким чином потім змішують і обробляють ДНК-лігазою. При цьому між фрагментами вбудовуються ділянки dA/dT. Такі додаткові послідовності можуть впливати на функції молекул, що з'єднуються, і тому бажано для отримання рекомбінантних молекул ДНК використовувати «липкі» кінці, створені внаслідок дії рестриктаз.

Лінкерний метод з'єднання фрагментів ДНК. У тому випадку, коли необхідно зшити 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». Часто усередину лінкеру розташовують який-небудь регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку пов'язану із рибосомою. В цьому випадку лінкери не лише забезпечують поєднання генів, але й зумовлюють їх експресію. Існують лінкери «тупий кінець – липкий кінець».

Гени, які можна отримати одним з вище описаних способів, містять інформацію про структуру білку, але самі по собі не здатні реалізувати цю інформацію. Для цього необхідні додаткові механізми, які керують експресією, тому перенесення генетичної інформації в клітину здійснюється у складі векторів. Векторами називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (переніс у інші організми). Таким чином, вектор дозволяє

здійснити введення у клітину додаткову генетичну інформацію. У наш час створено значну кількість векторів, які розрізняють за профілем їх використання на декілька типів.

Завдання 1. Опишіть методи конструювання рекомбінантних ДНК: рекомбінантні ДНК, рестриктазно-лігазний метод, конекторний метод, лінкерний метод.

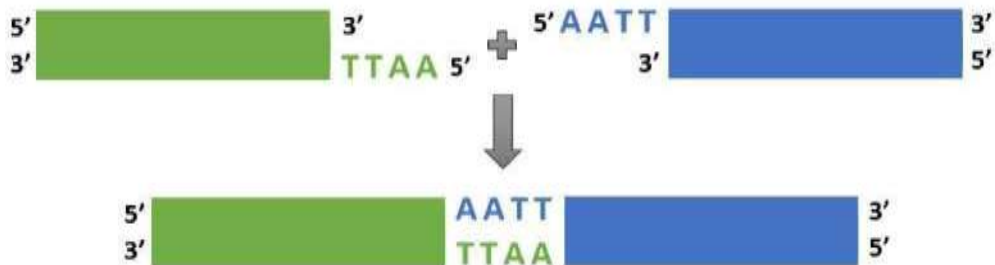


Рис. 18. Схема з'єднання ділянок ДНК рестриктазно-лігазним методом

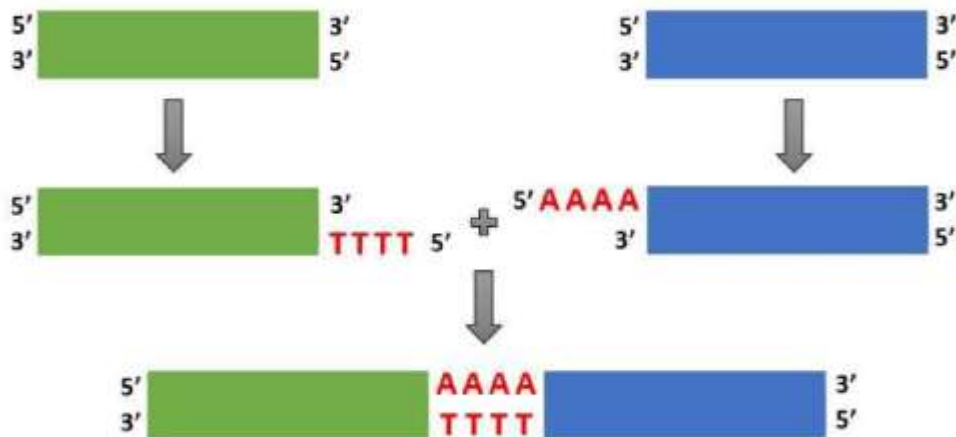


Рис. 19. Схема з'єднання ділянок ДНК конекторним методом

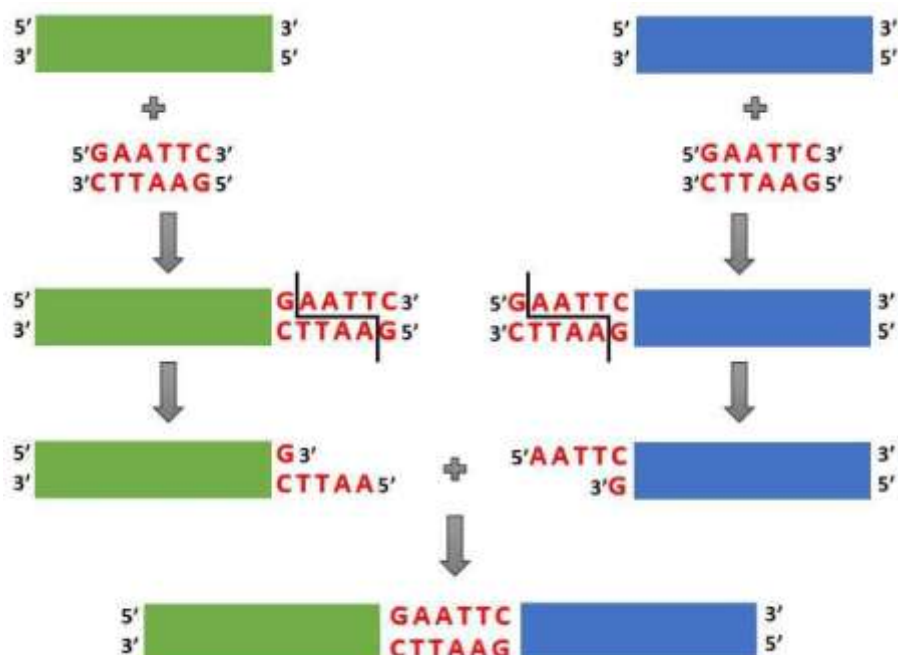


Рис. 20. Схема з'єднання ділянок ДНК лінкерним методом

Завдання 2. Охарактеризуйте загальні особливості генетичних векторів: генетичний вектор; вимоги, що висувають до векторів.

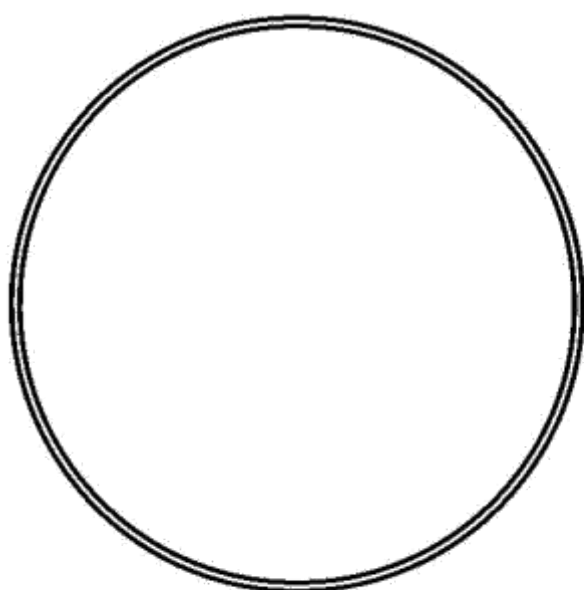
Завдання 3. Опишіть біологічні властивості плазмідних векторів: плазміда, біологічні властивості бактеріальних плазмід.

Завдання 4. Заповніть таблицю та замалюйте генетичну карту для відповідних плазмідних векторів.

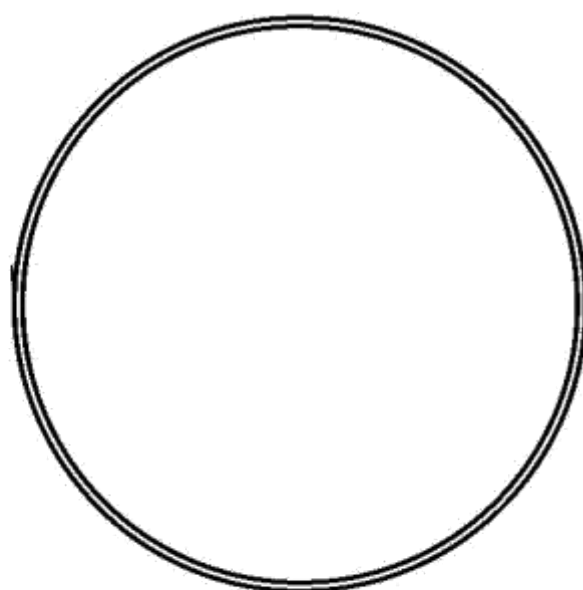
Таблиця 10

Характеристика плазмід

	Господар	Функція (т.п.о.)	Розмір
pT181			
ColE1			
pGKL2			
pAMpi			
pI258			
pADP-1			
pWW0			
pX01			
pSOL1			



pBR322



Bluescript

Рис. 21. Генетична карта плазмідних векторів

Завдання 5. Охарактеризуйте наступні групи векторів: вектори на основі хромосом вірусів, надємнісні вектори YAC, BAC, PAC; штучні хромосоми тварин і людини, інтегруючі вектори, бінарні вектори.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

1. *Що таке рекомбінантна ДНК? Яка послідовність її конструювання?*
2. *Якими методами досягається з'єднання молекул ДНК?*
3. *Генетичні вектори: поняття, класифікація, вимоги до них.*
4. *Властивості бактеріальних плазмід і їх використання у якості векторів.*
5. *Особливості використання фагів у якості векторів.*
6. *Переваги використання штучних і гібридних векторів.*
7. *Застосування pPAC, pNAC, pBAC, pYAC у клонуванні ДНК.*
8. *Принципи використання вірусних векторів.*
9. *Що являють собою транспозони? Яка їх роль і механізми переміщення?*
10. *Виділення генів із геному донора.*
11. *Особливості введення рДНК у клітини.*

Лабораторно-практична робота № 8

Тема: Генетична трансформація клітин.

Мета: Засвоїти методи переносу ДНК. Визначити суть компетентності бактеріальних і грибних клітин та методи її підвищення. Описати принципи і мету створення бібліотек ДНК, а також груп методів пошуку клонів у них.

Трансформація – генетична модифікація клітини шляхом введення і подальшої експресії в ній чужорідного генетичного матеріалу (ДНК). Зараз це загальна лабораторна процедура в молекулярній біології.

Трансдукція (від лат. transductio – переміщення) – форма горизонтального перенесення генів, при якій передача генетичного матеріалу від однієї клітини до іншої відбувається за допомогою вірусу (бактеріофага у випадку бактерій), що, як і у випадку інших форм горизонтального перенесення генів, призводить до зміни спадкових властивостей. Вірус, що переносить клітинну ДНК або РНК, називається трансдукційною частинкою. Розрізняють два види трансдукції: загальну (генералізовану), за якої може переноситись будь-яка ділянка геному клітини, та спеціалізована, під час якої завжди переноситься один і той самий набір генів.

Бактеріальна кон'югація – передача генетичного матеріалу між бактеріями через прямий міжклітинний контакт. Це один з механізмів горизонтального переносу генів, як і трансформація та трансдукція, хоча ці механізми не вимагають контакту між клітинами. Бактеріальна кон'югація відносно рідкісна серед бактерій, хоча і звичніша у панміктичних популяціях.

В бактеріях для опису процесів трансформації використовується термін *компетентність* – стан, коли бактерії мають здатність приймати ДНК із зовнішнього середовища. Існують дві форми компетентності, природна і штучна.

Природна компетентність. Бактерії багатьох видів (можливо, більшості) природно здатні до прийняття ДНК. В стані компетентності бактерії виробляють особливий низькомолекулярний білок (фактор компетентності), що активує синтез автолізину, ендонуклеази і ряду факторів транскрипції. Автолізин частково руйнує клітинну стінку, що сприяє проникненню ДНК через неї, а також знижує чутливість бактерій до осмотичного шоку. В стані компетентності також знижується загальна інтенсивність метаболізму.

Штучна компетентність не кодується в генах клітин. Натомість, вона викликається лабораторними процедурами, в яких клітини пасивно робляться проникними для ДНК, використовуючи умови, які зазвичай не зустрічаються в природі. Ці процедури порівняно легкі і прості, і широко використовуються в молекулярній біології і генній інженерії бактерій. Штучно компетентні клітини стандартних бактеріальних штамів навіть виробляються комерційно, їх можна придбати замороженими і готовими для використання.

Бібліотека ДНК – сукупність фрагментів ДНК певного біологічного об'єкту (хромосоми, типу клітин, тканини, пухлини, організму тощо), які

вставлені у генетичні вектори і розмножені до великої кількості. Часто бібліотекою ДНК називають і колекцію мікроорганізмів (бактерій, дріжджів), у яких зберігаються ці генетичні вектори. Бібліотеки ДНК використовують для вивчення геномів і транскриптомів живих організмів, окремих їх частин, патологічно змінених тканин і органів.

Завдання 1. Опишіть методи переносу спадкового матеріалу: *трансформація, трансфекція (транз'єнтна трансформація), трансфекція (транз'єнтна трансформація), кон'югація.*

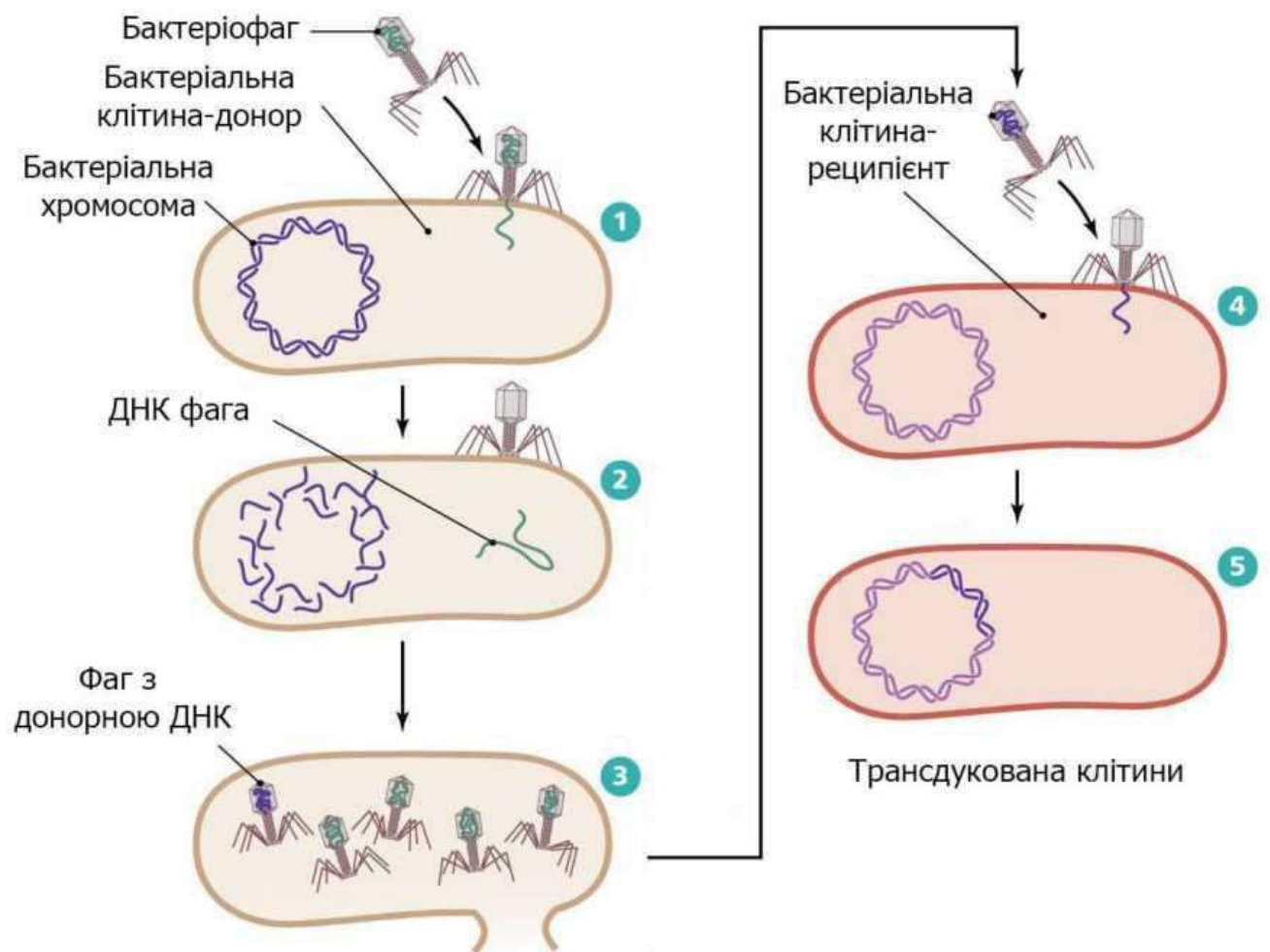


Рис. 22. Схема загальної трансдукції

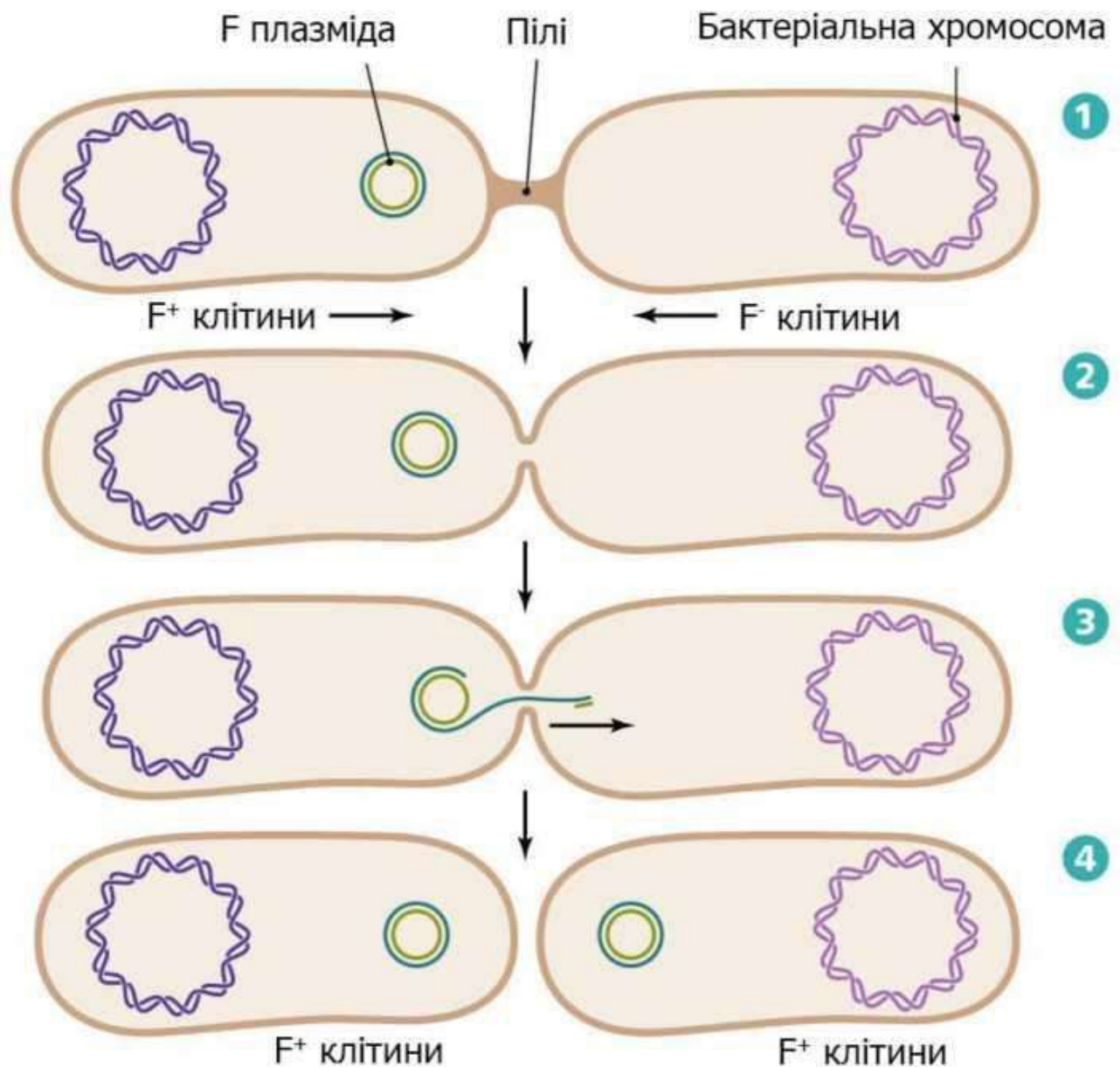


Рис. 23. Схема бактеріальної кон'югації

Завдання 2. Опишіть механізми трансформації і способи підвищення її ефективності: компетентність, природна компетентність, штучна компетентність, трансформація клітин грибів.

Завдання 3. Поясніть суть і мету створення бібліотек ДНК: бібліотека ДНК, мета і суть створення бібліотеки ДНК, геномні бібліотеки, бібліотеки κДНК.

Завдання 4. Охарактеризуйте способи пошуку трансформованих клітин.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

1. Надайте характеристику наступним поняттям: трансформація, трансфекція, трансдукція, кон'югація.

2. *Механізми трансформації і способи підвищення її ефективності.*
3. *Експресія чужорідних генів у мікроорганізмах.*
4. *Що таке банк генів і банк кДНК?*
5. *Методи скринінгу геномних бібліотек і клонотек.*

Тема: **МЕТОДИКА СТВОРЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ ГОРМОНІВ**

Мета: Засвоїти особливості будови й функціонування інсуліну і соматотропіну. Визначити напрямки використання відповідних гормонів у медицині і тваринництві. Оволодіти методиками створення рекомбінантних гормонів.

Інсулін (від лат. *insula* – острів) – гормон пептидної природи, що утворюється у бета-клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Впливає на багато аспектів обміну речовин практично у всіх тканинах. Основна дія інсуліну полягає в зниженні концентрації глюкози в крові.

Зазвичай підшлункова залоза великої рогатої худоби і свиней не використовується в м'ясній та консервній промисловості і поставляється на фармацевтичні підприємства, де проводять екстракцію гормону. Для отримання 100 г кристалічного інсуліну необхідно 800-1000 г вихідної сировини.

Роботи з генно-інженерного отримання інсуліну почалися близько 40 років тому. У 1978 році з'явилося повідомлення про отримання штаму кишкової палички, яка продукує шурячий проінсулін (США). У цьому ж році були синтезовані окремі ланцюга людського інсуліну за допомогою експресії їх синтетичних генів в клітинах *E.coli*:

1. Кожен з отриманих синтетичних генів підлаштовувався до 3'-кінця гена ферменту В-галактозидази і вводився у векторну плазмиду – рBR322.

2. Клітини *E.coli*, трансформовані такими рекомбінантними плазмідами, виробляли гібридні (хімерні) білки, що складаються з фрагмента В-галактозидази і А і В пептиду інсуліну, приєднаного до неї через залишок метіоніну.

3. Після обробки химерного білка бромціаном і протеолітичного відщеплення С-пептиду утворюється інсулін.

Соматотропін (СТГ, соматотропний гормон, соматропін, гормон росту) – один з гормонів передньої долі гіпофіза. Відноситься до родини поліпептидних гормонів, у які входять також пролактин і плацентарний лактоген.

Оскільки ген гормону росту має складну структуру і містить інтрони, то процедура клонування починається з отримання кДНК на підставі мРНК за допомогою ревертази. Створюються гомогенні фрагменти ДНК довжиною 531 п.н., до яких потім ферментативним шляхом приєднують регуляторні елементи для забезпечення експресії цього рекомбінантного гена у клітині-реципієнті. На етапі створення кДНК можна за допомогою рестриктаз відокремити певні центри активності і в подальшому використовувати міні-гени гормону росту із спрямованої 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 в певних ділянках ДНК), в наслідок якого відбувається заміна одних амінокислот на інші, завдяки цьому високо

специфічні рецептори певних клітин не розпізнають гормон, зв'язування не відбувається і модифікований гормон росту зв'язується лише зі «своїм» рецептором. Генно-інженерний препарат має безперечні переваги: доступний у великих кількостях, гомогенний, не містить вірусів.

Завдання 1. Надайте характеристику інсуліну: *інсулін, будова інсуліну та механізм його утворення, фізіологічна дія інсуліну, пов'язані з інсуліном захворювання.*

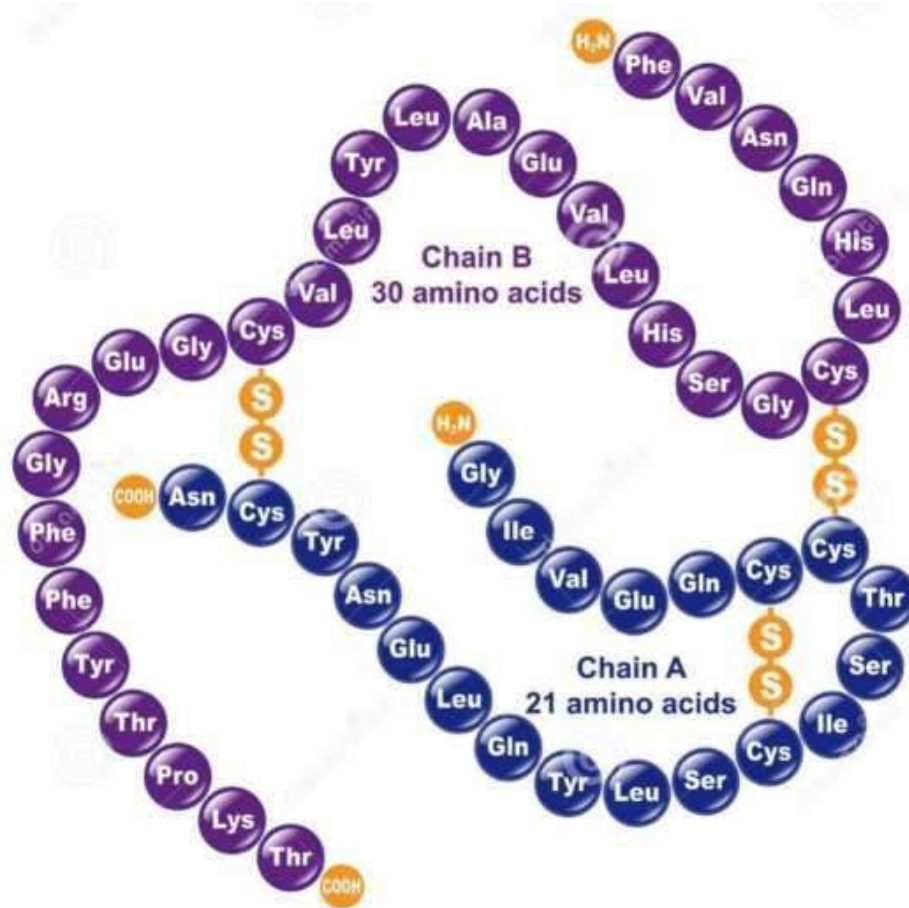


Рис. 24. Будова зрілої молекули інсуліну

Завдання 2. Опишіть методи створення рекомбінантного інсуліну: *метод перетворення інсуліну свині домашньої, метод хімічного синтезу інсуліну, метод створення рекомбінантного інсуліну.*

Завдання 3. Охарактеризуйте соматотропін: *соматотропін, особливості дії соматотропіну.*

Завдання 4. Опишіть методику створення генноінженерного соматотропіну.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

- 1. Характеристика інсуліну.*
- 2. Методика одержання рекомбінантного інсуліну.*
- 3. Характеристика соматотропіну.*
- 4. Синтез і використання генно-інженерного соматотропіну.*
- 5. Альтернативні способи регулювання синтезу гормону росту тварин.*

Лабораторно-практична робота № 10

Тема: СТВОРЕННЯ ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛІННЯ

Мета: Розглянути та засвоїти різні підходи щодо класифікації вакцин.

Вивчити методики створення генноінженерних вакцин.

Вакцина – це препарат, що складається з ослаблених або вбитих збудників хвороб, їх компонентів чи продуктів життєдіяльності, які застосовуються для створення активного імунітету у тварин і людей.

З урахуванням традиційного і сучасного підходів всі вакцини класифікують:

- за спрямованістю застосування на протибактеріальні, протигрибкові, противірусні;
- за здатністю розмножуватись (до реплікації) на живі та інактивовані;
- за сировинними компонентами на корпускулярні, спліт-вакцини, субодиничні і вакцини з екзопродуктів (анатоксини).
- за кількістю типів антигенів на моно-, полівалентні, асоційовані;
- за видовою належністю вакцинного штаму на гомологічні і гетерологічні.
- за способом отримання на генно-інженерні, хімічні та синтетичні. *Живі (атенуйовані) вакцини* являють собою імунопрофілактичні

препарати, які складаються зі спадково змінених форм збудників інфекційних захворювань, суспендованих або висушених у відповідних фізіологічних середовищах.

Інактивовані (неживі) вакцини – це препарати, які містять інактивовану культуру штамів збудників інфекційних хвороб, які при цьому втратили вірулентність і здатність до репродукції, але зберегли імуногенні властивості.

Корпускулярні вакцини складаються з мікроорганізмів, які переважно зберегли цілісність своєї будови – бактерійних клітин чи вірусних корпускул.

Спліт-вакцини складаються з очищених і зруйнованих бактерій (субклітинні) та вірусів (субвіріонні).

Субодиничні (компонентні) вакцини – різновид вакцин, які складаються з окремих (головних, або мажорних) антигенних компонентів, здатних забезпечити розвиток імунітету.

Анатоксини являють собою бактеріальні екзотоксини, знешкоджені шляхом тривалої обробки розчином формальдегіду в умовах підвищеної температури (+ 37 °C).

Моновалентні вакцини містять антигени одного типу (виду) інфекційного збудника. *Полівалентні (політипові, поліваріантні, поліштамові) вакцини* складаються з декількох типів, варіантів або штамів збудника однієї хвороби. *Асоційовані (комбіновані, комплексні) вакцини* містять антигени декількох збудників різних інфекційних захворювань.

Гомологічні вакцини готують з того виду збудника, проти якого передбачається створити імунітет.

Генно-інженерні вакцини – це вакцини виготовлені за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Синтетичні вакцини – це препарати, що містять штучно синтезовані короткі пептиди, які імітують невеликі ділянки антигенів збудників, здатні викликати специфічну імунну відповідь організму і захистити його від захворювання.

Вакцини, що містять лише окремі компоненти патогенного організму, мають назву «субодиничні» і створюються за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Завдання 1. Надайте визначення і класифікацію вакцин: *вакцина, вакцинація, вакцини за здатністю до розмноження (до реплікації), вакцини за спрямованістю застосування, вакцини за сировинними компонентами, вакцини за кількістю типів антигенів, вакцини за видовою належністю вакцинного штаму, вакцини за способом отримання.*

Завдання 2. Опишіть і схематично замалюйте методику створення генноінженерної субодиничної вакцини.

Завдання 3. Опишіть і схематично замалюйте методику створення генноінженерної векторної вакцини.

Завдання 4. Опишіть методику створення генноінженерної вакцини через модифікацію геному патогенного мікроорганізму.

Завдання 5. За матеріалами завдання 1 проведіть класифікацію вакцин із завдань 3-5: субодинична вакцина, векторна вакцина, атенуйована вакцина.

Питання для захисту лабораторно-практичної роботи

- 1. Надайте визначення і класифікацію вакцин.*
- 2. Охарактеризуйте живі генно-інженерні вакцини.*
- 3. Охарактеризуйте неживі генно-інженерні вакцини.*
- 4. Методики створення генноінженерних субодиничної та векторної вакцин.*
- 5. Методика створення генноінженерної вакцини через модифікацію геному патогенного мікроорганізму.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Базова:

1. Коваленко В. П., Горбатенко І. Ю. Біотехнологія у тваринництві й генетиці. – К.: Урожай, 1992. – 15 с.
2. Кравців Р. Й., Колотницький А.Г., Буцяк В. І. Генетична інженерія. – Львів, 2008. – 214 с.
3. Мазин А. В., Кузнецов К. Д. Методики для работ по генетической инженерии. – Новосибирск, 1986. – 29 с.
4. Ніколайчук В. І., Горбатенко І. Ю. Генетична інженерія: підручник. – Ужгород, 1999. – 182 с.
5. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. Генная и белковая инженерия. – М.: Наука, 2004. – 526 с.
6. Рыбин В. Н. Основы генетической инженерии. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
7. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия: учеб.-справ. пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Допоміжна:

1. Агапова Є. М. Теоретичне узагальнення селекційно-технологічних основ створення та практичного використання перспективного генотипу свиней Одеського регіону/ Є. М. Агапова, Р. Л. Сусол// Вісник аграрної науки Причорномор'я: зб. наук. пр./Миколаївський державний аграрний ун-т.- Миколаїв, 2015. – Т.2, Вип.2(84).– С.63-70.
2. Асоціація 2856С>Т-поліморфізму гену рецептора лептину з відгодівельними і м'ясними якостями свиней великої білої породи/ А.М. Саєнко, В.О. Вовк, В.Ю. Нор, В.М. Балацький, Н.К. Саранцева. 2017, Науково - технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН, 117, 147-152.
3. Генетичний та асоціативний аналіз однонуклеотидного поліморфізму g. 22 G> C в гені катепсину F свиней різних порід/ Є.К. Олійниченко, В.О. Вовк, Т.В. Буслик, М.О. Ільченко, В.М. Балацький. Науковий журнал «Тваринництво та технології харчових продуктів». 2019, 10 (1), 21-26.
4. Балацький В. Н. Генетическая дифференциация пород свиней по десяти локусам количественных признаков / В. Н. Балацький, А. М. Саєнко, Р. Н. Пина и др. // Цитология и генетика. – 2015. – № 5. – С. 26–37. (*Scopus*).
5. Балацький В.М. Молекулярно-генетичні аспекти впровадження маркер-асоційованої селекції у свинарстві. Свинарство 2018, 69, 108-114.

6. Балацький В. М. Асоціація поліморфізму ESR1 гена з репродуктивними якостями свиноматок великої білої і миргородської порід / В. М. Балацький, Л. П. Гришина, А. М. Саєнко, та ін. // Розведення і генетика тварин. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2016. – Вип. 52. – С. 150–158. (РІНЦ).

7. Балацький В. М. Асоціація гену рилізінг-фактора гормону росту з якістю м'яса свиней великої білої породи української селекції. / В. М. Балацький, С. М. Корінний, І. Б. Баньковська, О. С. Гіболенко // Свинарство. – Полтава, – 2015. – Вип. 67. – С. 107–112.

8. Баньковская И. Б. Связь полиморфизма генов катепсина CTSS, CTSL, CTSB, CTSK с показателями качества мяса и сала свиней украинской крупной белой породы / И. Б. Баньковская, В. Н. Балацкий, Т. В. Буслик // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сборник научных трудов. Горки: БГСХА. – 2016. – Вып. 19. – Ч. 1. – С. 198–204.

9. Ващенко П. А. Использование модели BLUP с включением ДНК-маркеров для оценки свиней / П. А. Ващенко, В. Н. Балацкий, К. Ф. Почерняев // Зоотехническая наука Беларуси. Сборник научных трудов: генетика, разведение, селекция, биотехнология размножения и воспроизводство. – 2015. – Т. 50 (1). – С. 43–50.

10. Генетичний та асоціативний аналіз одонуклеотидних поліморфізмів в генах лептину і катепсину F свиней. / Є. К. Олійниченко, І. Б. Баньковська, В. М. Балацький, К. Ф. Почерняєв, Т. В. Буслик, М. О. Ільченко. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва». 2018, 289, 38-50.

11. Зв'язок поліморфізму g. 307 G> A snp гену альфа-фукозилтрансфераза 1 із господарсько-корисними ознаками свиней великої білої породи / Г.С. Рудоман, В.М. Балацький, В.Ю. Нор, В.О. Вовк // Розведення і генетика тварин. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2017, 54, 134-140.

12. Лихач В. Я. Поліморфізм генів CTSL та MC4R в популяціях свиней різних порід / В. Я. Лихач, П. О. Шебанін, В. М. Балацький // Науково-технічний бюлетень ІТ НААН. – 2016. – № 115. – С. 134–139. (РІНЦ).

13. Лядский И. К. Связь полиморфизма генов CTSL, MC4R и NMGA1 с продуктивными качествами свиней крупной белой породы Украины / И. К. Лядский, К. Ф. Почерняев, В. Н. Балацкий, В. П. Рыбалко // Зоотехния. – 2014. – № 6. – С. 4–5.

14. Методологія оцінки генотипу тварин за молекулярно-генетичними маркерами у тваринництві України: монографія / К. В.

Копиловта інш. В. М. Балацький. За наук. ред. акад. НААН М. В. Гладія. Київ: Аграр. наука, 2014. 212 с.

15. Олійниченко Є. К. Генетичний та асоціативний аналіз однонуклеотидного поліморфізму С.3469Т>С в гені лептину свиней / Є. К. Олійниченко, І. Б. Баньковська, В. М. Балацький, А. М. Саєнко // Аграрний вісник Причорномор'я. – 2017. – Вип. 84-1. – С. 62–68.

16. Саєнко А. М. Оцінка можливості проведення маркерної селекції за використання показників популяційно-генетичної мінливості / А. М. Саєнко, В. М. Балацький // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2014. – № 202. – С. 55–61.

17. Саєнко А. М. Зв'язок генотипів за локусами *ESR1*, *PRLR*, *GH* та *IGF2* з репродуктивними ознаками свиноматок та окремими показниками власної продуктивності свиноматок великої білої породи типу УВБ-3 / А. М. Саєнко, В. М. Балацький // Свинарство. – Полтава, – 2015. – Вип. 66. – С. 136–143.

18. Сусол Р.Л. Відтворювальна здатність свиней породи п'єтрен з урахуванням ДНК-технологій/ Р.Л. Сусол // Зб. наук. пр./ Подільський державний аграрно-технічний ун-т.- Кам'янець-Подільський, 2013. – Вип. 21. – С.265-267.

19. Сусол Р.Л. Продуктивність свиней великої білої породи з покращеними м'ясними якістьями з урахуванням ДНК-маркерів/ Р.Л. Сусол// Науковий вісник /Інститут тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова».-Х., 2013. – Вип. 6. – С.229-235.

20. Balatsky, V.N., Saienko, A.M., Pena, R.N., Buslyk T. V., Gibolenko O. S. Genetic diversity of pig breeds on ten production quantitative traits loci Cytology and Genetics. 2015, v. 49, Issue 5, P.299–307.

21. V. Balatsky, I. Bankovska, R. N. Pena, A. Saienko, T. Buslyk, S. Korinnyi, O. Doran. Polymorphisms of the porcine cathepsins, growth hormone-releasing hormone and leptin receptor genes and their association with meat quality traits in Ukrainian Large White breed / // Molecular Biology Reports. – 2016. – V.43. – P.517–526.

22. V. Balatsky, Y. Oliinychenko, N. Sarantseva, A. Getya, A. Saienko, V. Vovk, O. Doran. Association of single nucleotide polymorphisms in leptin (LEP) and leptin receptor (LEPR) genes with backfat thickness and daily weight gain in Ukrainian Large White pigs. Livestock Science, 2018, v.217, P.157–161.

23. Joanna Kubejko Alex ClopViktor BalatskyKonstantin PochernyaevShahinEghbalsaiedMarcel Amills. Mitochondrial DNA variation in Ukrainian wild boars. Animal Genetics, 2017, v. 48, Issue 6, P.725-726.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

Наукові журнали:

1. <http://gsejournal.biomedcentral.com/>
2. www.genetics.org - Genetics (USA)
3. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0388](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0388)
4. <http://jabng.org> - Journal of Animal Breeding and Genomics
5. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2052](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2052)
6. <http://journal.frontiersin.org/journal/genetics> - Frontiers in Genetics

Навчальне видання

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ В ТВАРИННИЦТВІ

Методичні рекомендації

Укладач: Сусол Р. Л.

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 2,8.

Тираж 25 прим. Зам. № 161