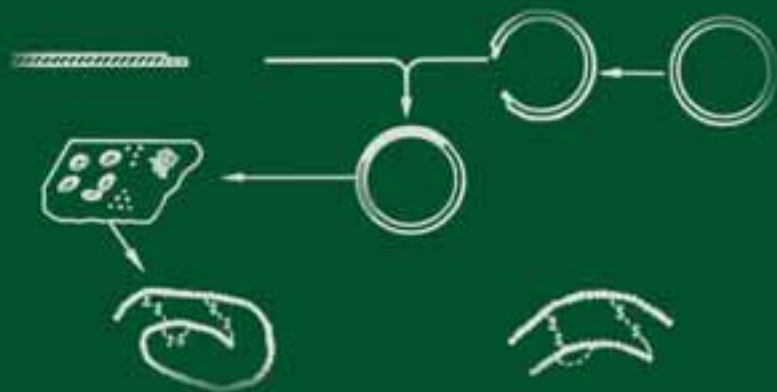




Біотехнологія



Фірма «ІНКОС»

БІОТЕХНОЛОГІЯ

*За редакцією доктора біологічних наук,
академіка УААН В.Г. ГЕРАСИМЕНКА*

Підручник

*Затверджено Міністерством аграрної політики України
як підручник для підготовки спеціалістів
в аграрних вищих навчальних закладах*

Київ
«Фірма «ІНКОС»
2006

ББК 24.2я73
УДК 547(075.8)
Г 37

*Затверджено Міністерством аграрної політики України як підручник для підготовки спеціалістів із спеціальностей «Біотехнологія виробництва і переробки продукції тваринництва» та «Ветеринарна медицина» в аграрних вищих навчальних закладах 3-4 рівнів акредитації
(лист від 5.07.2005 р. № 18-1-1-13/836)*

Автори: *В.Г. Герасименко*, д-р біол. наук, проф., засл. діяч науки і техніки України, академік УААН; *М.О. Герасименко*, канд. с.-х. наук, ст. наук. співроб., доц; *М.І. Цвіліховський*, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН; *І.Я. Коцюмбас*, д-р вет. наук, проф.; *М.О. Захаренко*, д-р біол. наук, проф., Заслужений прац. освіти України; *А.Ф. Ображей*, канд. ветер. наук, ст. наук. співроб., чл.-кор. УААН; *А.М. Головка*, д-р ветер. наук, проф., чл.-кор. УААН.

За редакцією В.Г. Герасименка

Рецензенти: *Б.Т. Стегній*, д-р ветер. наук, проф., чл.-кор. УААН (Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН, м. Харків);
В.А. Яблонський, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН (Національний аграрний університет, м. Київ)

Г 37 Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.

ISBN 966-8347-34-X

Підручник складається із двох частин — загальної біотехнології і спеціальних біотехнологій. Загальна біотехнологія включає розділи «Основи молекулярної біології», «Клітинна інженерія» та «Основи генетичної інженерії», які є теоретичним підґрунтям біотехнологій, що розробляються, уже розроблені і постійно удосконалюються для тваринництва, ветеринарної медицини і захисту навколишнього середовища.

Кожний із 24 розділів підручника містить контрольні питання для самоперевірки знань, а викладений в них матеріал скерований на підготовку конкурентоспроможних фахівців. В підручнику є іменний, предметний покажчики та словник термінів.

Висловлюємо щирю вдячність завідувачу сектору Інституту ветеринарної медицини УААН (м. Київ) Дерябіну О.М. за надану допомогу при оформленні розділу підручника «ДНК-вакцини».

© Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І., Коцюмбас І.Я., Вербицький П.І., Захаренко М.О., Ображей А.Ф., Головка А.М., 2006

ISBN 966-8347-34-X

© Фірма «ІНКОС», 2006
© Художнє оформлення Фірма «ІНКОС», 2006

ЗМІСТ

Вступ.....	9
------------	---

ЧАСТИНА I. ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Розділ 1. Біотехнологія – наукова дисципліна	15
1.1. Предмет біотехнології, історія розвитку.....	15
1.2. Біологічні об'єкти і методи біотехнології.....	17
1.3. Мета і завдання біотехнології.....	21
Розділ 2. Системи GLP і GMP щодо якості біотехнологічних продуктів	23
2.1. Система GLP	23
2.2. Система GMP.....	25
<i>Контрольні питання</i>	28
Розділ 3. Основи молекулярної біології	29
3.1. Нуклеїнові кислоти.....	29
3.1.1. Хімічний склад нуклеїнових кислот.....	29
3.1.2. Структура нуклеїнових кислот.....	35
3.2. Біосинтез білка і його регуляція.....	58
3.2.1. Генетичний код.....	58
3.2.2. Етапи біосинтезу білка.....	65
3.2.3. Регуляція синтезу білка.....	78
<i>Контрольні питання</i>	81
Розділ 4. Клітинна інженерія	84
4.1. Культура еукаріотичних клітин.....	84
4.2. Біотехнології гібридизації соматичних клітин.....	89
4.3. Біотехнологія трансплантації ядер.....	96
4.4. Біотехнологія перенесення генів у соматичні клітини за допомогою метафазних хромосом.....	106
4.5. Біотехнологія перенесення генів у еукаріотичні клітини за допомогою ДНК (ДНК технологія).....	112
4.6. Введення генів. Біотехнологія трансформації статевих ембріональних клітин чужорідними генами.....	119
<i>Контрольні питання</i>	124
Розділ 5. Основи генетичної інженерії	127
5.1. Біотехнологія конструювання рекомбінантних ДНК.....	127
5.1.1. Одержання фрагментів ДНК.....	128
5.1.2. Плазміді і віруси як донорні переносники генетичної інформації.....	130
5.1.3. Конструювання рекомбінантної ДНК.....	143
5.1.4. Клонування молекул рекомбінантної ДНК.....	148
5.1.5. Експресія еукаріотичних генів у клітинах прокариот.....	158
5.1.6. Перспективи і проблеми біотехнології клонування генів.....	166
<i>Контрольні питання</i>	168

Розділ 6. ДНК-технології	170
<i>Контрольні питання</i>	177

ЧАСТИНА II. СПЕЦІАЛЬНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Розділ 7. Біотехнологія виробництва і застосування імобілізованих препаратів	178
7.1. Інженерна ензимологія. Завдання інженерної ензимології.....	178
7.2. Імобілізація біологічно активних речовин та клітин.....	180
7.3. Імобілізація ферментів. Мета імобілізації.....	181
7.4. Носії для імобілізації ферментів.....	183
7.4.1. Органічні полімерні носії.....	183
7.4.2. Носії неорганічної природи.....	199
7.4.3. Місткість носія.....	204
7.4.4. Модифікація носія.....	205
7.4.5. Вимоги до носіїв.....	206
7.5. Методи імобілізації ферментів.....	206
7.5.1. Фізичні методи імобілізації.....	206
7.5.1.1. Імобілізація ферментів шляхом адсорбції на нерозчинних носіях.....	208
7.5.1.2. Методи механічного включення молекул ферменту в структуру носія	215
7.5.2. Хімічні методи імобілізації.....	220
7.5.2.1. Основні принципи конструювання препаратів ковалентно імобілізованих ферментів.....	220
7.5.2.2. Характеристика реагентів.....	226
7.6. Фізико-хімічна характеристика імобілізованого фермента.....	231
7.7. Класифікація імобілізованих ферментів.....	231
7.8. Імобілізація клітин (адгезія).....	233
7.8.1. Основні методи імобілізації клітин.....	235
<i>Контрольні питання</i>	237
Розділ 8. Використання імобілізованих препаратів з лікувальною метою	239
8.1. Імобілізація препаратів. Носії для імобілізації.....	241
8.2. Методи імобілізації і застосування препаратів.....	242
8.3. Терапія імобілізованими ферментами.....	248
<i>Контрольні питання</i>	250
Розділ 9. Використання імобілізованих ферментів у аналітичній роботі	251
9.1. Аналітичні проточні реактори з імобілізованими ферментами.....	254
9.2. Ферментні мікрокалориметричні датчики.....	255
9.3. Ферментні електроди.....	255

9.4. Біоломінесцентний мікроаналіз.....	259
9.5. Біосенсори з іммобілізованими ферментами.....	261
9.6. Імуноферментний аналіз (ІФА) і його використання.....	262
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>273</i>
Розділ 10. Застосування іммобілізованих ферментів у біотехнології.....	274
10.1. Біотехнологія перетворення крохмалю на глюкозу.....	274
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>278</i>
10.2. Біотехнологія одержання сиропів з високим вмістом фруктози.....	279
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>284</i>
10.3. Біотехнологія виробництва глюкози й етанолу з целюлози.....	285
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>286</i>
10.4. Біотехнологія одержання L-яблучної кислоти.....	287
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>287</i>
10.5. Застосування біотехнологій з іммобілізованими ферментами у молочній промисловості.....	288
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>294</i>
10.6. Біотехнологія виробництва D-фенілгліцину.....	295
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>295</i>
Розділ 11. Біотехнологія виробництва антибіотиків.....	296
11.1. Виробництво β -лактамних антибіотиків.....	299
11.2. Модифікація β -лактамних антибіотиків.....	302
11.2.1. Одержання 6-амінопеніциланової кислоти (6-АПК).....	302
11.2.2. Одержання 7- λ -аміноцефалоспоринової кислоти (7-АЦК).....	306
11.3. Створення нової біотехнології виробництва і застосування антибіотиків.....	306
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>308</i>
Розділ 12. Біотехнологія виробництва гормонів.....	310
12.1. Шляхи отримання гормонів.....	310
12.2. Отримання інсуліну.....	313
12.2.1. Традиційні шляхи отримання інсуліну.....	314
12.2.2. Нові технології одержання інсуліну.....	315
12.3. Отримання соматотропіну.....	317
12.3.1. Використання генно-інженерного соматотропіну у тваринництві.....	320
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>322</i>
Розділ 13. Біотехнологія виробництва інтерферонів.....	323
13.1. Класи і типи інтерферонів.....	324
13.2. Традиційні шляхи отримання інтерферонів.....	325

13.3. Генно-інженерний метод отримання інтерферонів.....	327
13.4. Одержання вдосконалених інтерферонів.....	332
13.5. Використання екзогенного інтерферону у ветеринарній медицині і тваринництві.....	333
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>335</i>
Розділ 14. Біотехнологія одержання моноклональних антитіл (антитіл одного епітопу).....	336
14.1. Традиційний спосіб одержання антитіл.....	336
14.2. Моноклональні антитіла і гібридомна технологія.....	337
14.3. Застосування моноклональних антитіл	344
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>346</i>
Розділ 15. Біотехнологія і вакцини майбутнього.....	347
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>365</i>
Розділ 16. ДНК-вакцини.....	366
16.1. Структура.....	366
16.2. Вибір генів.....	369
16.3. Методи і шляхи введення.....	369
16.4. Модуляція імунної відповіді.....	371
16.5. Підвищення імуногенності ДНК-вакцин.....	373
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>374</i>
Розділ 17. Біотехнологія одержання вітамінів.....	375
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>385</i>
Розділ 18. Біотехнології одержання біологічно активних продуктів на основі металокомплексних сполук.....	386
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>399</i>
Розділ 19. Біотехнології одержання L-амінокислот.....	401
19.1. Методи одержання L-амінокислот.....	402
19.2. Біотехнологія виробництва L-метіоніну.....	407
19.3. Біотехнологія виробництва L-триптофану.....	408
19.4. Біотехнологія одержання L-лізину.....	412
19.5. Біотехнологія одержання L-треоніну.....	416
19.6. Біотехнологія одержання L-аспарагінової кислоти.....	418
19.7. Біотехнологія одержання L-глутамінової кислоти.....	420
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>421</i>
Розділ 20. Біотехнологія одержання ферментів.....	423
20.1. Джерела ферментів.....	425
20.2. Методи культивування мікроорганізмів-продуцентів ферментів.....	431
20.3. Одержання товарних форм ферментних препаратів.....	433
20.3.1. Виділення ферментів.....	433
20.3.2. Очищення ферментних препаратів.....	435
20.3.3. Концентрування ферментів.....	437

20.3.4. Стандартизація ферментних препаратів.....	437
20.3.5. Ідентифікація і індексація ферментних препаратів.....	438
20.4. Промислові ферментні препарати.....	438
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>440</i>
Розділ 21. Біотехнологія виробництва білка.....	441
21.1. Виробництво білків одноклітинних організмів.....	442
21.2. Мікроорганізми-продуценти білка.....	445
21.3. Принципова технологічна схема одержання мікробного білка.....	448
21.4. Одержання мікробного білка на відходах переробки нафти.....	450
21.5. Одержання мікробіального білка на природному газі (метані).....	451
21.6. Одержання мікробного білка на нижчих спиртах — метанолі і етанолі.....	452
21.7. Одержання мікробного білка на гідролізатах рослинних відходів.....	454
21.8. Одержання білка одноклітинних водоростей.....	455
21.9. Отримання високобілкових кормових препаратів із сировини, що постійно відновлюється.....	457
21.9.1. Ферментація у зануреній культурі або глибинне культивування мікроорганізмів.....	459
21.9.2. Твердофазова ферментація рослинної сировини.....	460
21.10. Мікробіальний білок у харчуванні людей.....	463
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>465</i>
Розділ 22. Біотехнології утилізації і біоконверсії відходів агропромислового комплексу.....	467
22.1. Негативний вплив відходів тваринництва на навколишнє середовище.....	467
22.2. Методи утилізації гною.....	468
22.2.1. Традиційні методи. Використання гною як органічного добрива.....	469
22.2.2. Мінералізація органічних речовин у ґрунті і водоймищах.....	470
22.2.3. Включення гною до раціонів сільськогосподарських тварин.....	474
22.3. Нетрадиційні методи. Біотехнологія одержання біогазу шляхом анаеробного зброджування відходів.....	475
22.3.1. Біометаногенез та його етапи.....	476
22.3.2. Фактори, які впливають на біометаногенез і їх оптимізація.....	480
22.3.3. Техніко-технологічні аспекти виробництва біогазу.....	492
22.3.3.1. Склад та розповсюдження БГУ у світі.....	492

22.3.3.2. Конструкційні особливості реактора БГУ.....	494
22.3.3.3. Класифікація БГУ за принципом дії.....	496
22.3.3.4. Техніко-технологічні рівні БГУ.....	497
22.3.4. Фракції, що утворюються в процесі біометаногенезу.....	506
22.3.4.1. Біогаз, його склад та використання.....	506
22.3.4.2. Шлам, його склад та використання.....	509
22.3.4.3. Рідка фракція, склад і використання.....	511
22.3.5. Шляхи вдосконалення біогазового виробництва.....	512
22.3.6. Сучасний стан виробництва біогазу в Європі та світі.....	512
22.3.7. Стан виробництва біогазу в Україні.....	523
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>532</i>
Розділ 23. Біотехнологія утилізації органічних відходів	
методом вермікультивування.....	535
23.1. Загальні відомості й біологічні особливості дощових черв'яків.....	537
23.2. Способи вирощування черв'яків.....	540
23.3. Підготовка субстрату (корму) для черв'яків.....	542
23.4. Методика формування лож і техніка закладки маточного поголів'я в субстрат.....	546
23.5. Умови утримання черв'яків у ложах.....	547
23.6. Оцінка стану популяції черв'яків.....	548
23.7. Методика розділення лож.....	549
23.8. Технологія вермікультивування взимку.....	551
23.9. Вермікультивування на присадибних ділянках.....	553
23.10. Вермікультура, її склад та використання.....	557
23.11. Біогумус, його склад і використання.....	561
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>564</i>
Розділ 24. Біотехнологія отримання біомаси одноклітинної водорості спіруліни.....	566
24.1. Загальна характеристика спіруліни.....	568
24.2. Склад живильного середовища для вирощування спіруліни.....	569
24.3. Хімічний склад і поживна цінність спіруліни.....	571
24.4. Використання біомаси спіруліни.....	575
24.5. Технологія вирощування спіруліни для використання в годівлі тварин.....	577
24.6. Вирощування спіруліни для використання у фармацевтичній промисловості.....	580
<i>Контрольні питання.....</i>	<i>585</i>
Основна література.....	586
Рекомендована література.....	588
Словник термінів.....	590
Іменний покажчик.....	628
Предметний покажчик.....	631

ВСТУП

XXI століття називають «золотим сторіччям» біології. Це стосується і одного з її напрямів — біотехнології.

Біотехнологія — це напрям біології, який вивчає застосування біологічних об'єктів та хіміко-біологічних процесів з метою отримання різноманітної продукції для вирішення народногосподарських проблем.

Власне, ще з давніх часів людство використовує окремі біотехнологічні процеси у різних сферах практичної діяльності. Однак лише з 70-х років минулого сторіччя біотехнологія як самостійна наука сформувалась на базі молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії, широкого використання методів мікробіології, біохімії, біоорганічної хімії та інших наук. Нині **нова біотехнологія** є одним з пріоритетних напрямів сучасної науки, які забезпечують прискорення науково-технічного прогресу, а також дійовим засобом для подолання сировинних, продовольчих, енергетичних, екологічних та економічних проблем. Її використовують при розв'язанні багатьох практичних питань, пов'язаних з підвищенням ефективності охорони здоров'я людей і тварин, збільшенням продовольчих ресурсів та забезпеченням промисловості сировиною, використанням рентабельних поновлювальних джерел енергії і організації безвідходних виробництв, зменшенням шкідливих антропогенних впливів на довкілля та в інших галузях діяльності людини.

Біотехнологія, як наука, є більш зрілим етапом у розвитку біології, яка нині і в майбутньому займатиметься створенням цілого з елементів, вивчених раніше (*Глеба Ю., 2002*).

Могутнім підґрунтям нової біотехнології є встановлення Ейвері О. (1944) біологічної ролі ДНК. Було доведено, що ця полімерна хімічна сполука є носієм спадкової інформації. Згодом Кріком Ф., Уотсоном Д. (1953) було зроблено епохальне відкриття: встановлено структурну організацію ДНК у вигляді подвійної спіралі. Завдяки цій події наступні кроки, що було

здійснено у напрямку з'ясування біохімічних механізмів функціонування ДНК, привели до повного розуміння молекулярних основ біологічної специфічності.

Найвидатнішим досягненням біотехнології на початку нового ХХІ століття стало завершення створення детальної карти генома людини, що дозволить краще зрозуміти взаємозв'язок людини з іншими організмами нашої планети, збагнути, що робить людей схожими один з одним і що відрізняє нас від інших організмів, озброїть нас більш досконалішими підходами для з'ясування причин виникнення хвороб і пошуку нових методів лікування.

Викликає подив той факт, що довжина послідовності нуклеотидів у ДНК людини лише втричі перевершує цей параметр у черв'яка *Caenorhabditis elegans* і водночас свідчить про складність механізмів контролю розвитку, які необхідно вивчити для пояснення такого складного явища, як поява людини (Дей П., 2002).

Упродовж 60 останніх років, які охоплюють час від відкриття Ейвері О., крім згаданого вище, в біології зроблено надзвичайно важливі відкриття: розроблено технологію одержання рекомбінантних молекул ДНК, яка є основою генної інженерії, гібридомну технологію, секвенування геномів бактерій, дріжджів, нематоди, рослинного організму арабідопсиса, а також людини. Зроблено перші кроки генної терапії і успішні спроби клонування тварин, конструювання штучних хромосом, розроблено умови і створено можливості для перенесення генів, що дозволяє долати видові бар'єри, які обмежують можливості класичної селекції, розшифровано структуру нуклеосоми і комплексу РНК — полімерази.

Понад 30 років тому розроблено методи локалізації генів з елементами, які контролюють експресію, а ще важливішим є розробка прийомів перенесення цих елементів будь-якому мікроорганізму або рослині, що дає можливість модифікувати організми таким чином, щоб одержати нові лінії зі зміненими властивостями, які відповідають нашим бажанням. У свою чергу, функціонування модифікованого організму дозволить отримати інформацію про поведінку в геномі конкретного гена, тобто ідентифікувати функції генів (функціональна геноміка), про взаємодію генів і контролюючих експресію цих генів послідов-

ностей, що дає можливість використати нові властивості для забезпечення потреб людства.

Важливим досягненням, яке дозволяє здійснювати генно-інженерні маніпуляції, є відкриття ферментів, за участю яких здійснюються операції «розрізання» і «зшивання» фрагментів ДНК.

Вражаючими також є швидкість і розмах, з якими наукові дослідження трансформуються у процес одержання нових фармацевтичних препаратів або сільськогосподарських продуктів. Ліки, одержані завдяки біотехнології, наприклад, інсулін, соматотропний гормн, інтерферони або вакцина проти поліомієліту, дають можливість створення більш ефективних препаратів з меншими побічними діями, оскільки вони будуть спрямовані на специфічні молекули-мішені, які зазнали змін у процесі захворювання.

У сільському господарстві вражає швидкість сприйняття американськими фермерами генетично модифікованих (ГМ) культур сільськогосподарських рослин для виробництва продуктів харчування і підвищення їх якості. Яскравим прикладом є розробка біотехнології синтезу вітаміну А у «золотому рисі». Близько двох третин усіх продовольчих товарів торгової мережі США містять ГМ-інгредієнти. Однак у багатьох розвинених країнах (зокрема країнах ЄС) використання ГМ-продукції зустрічає сильну опозицію. Натомість діабетики, не задумуючись, використовують для лікування інсулін, одержаний завдяки модифікованим мікроорганізмам.

Використання генетичної інженерії дасть можливість отримати ГМ-рослини не тільки для виробництва продуктів харчування, але й для вирішення екологічних проблем — для очищення забруднених хімічними речовинами і токсичними металами територій (фіторемедіація) та використання ГМ-рослин як «фабрик» або «реакторів» для виробництва фармацевтичних білків (у першу чергу вакцин) та інших біологічно активних речовин.

Встановлено можливість елімінації із забруднених ґрунтів кадмію і свинцю за допомогою окремої лінії індійської гірчиці (*Brassica Juncea*); за участю аеробних і анаеробних мікроорганізмів здійснювати утилізацію пестицидів, алканів, бензолу, толуолу, ксилолу, поліциклічних ароматичних вуглеводнів.

Внаслідок проведених глибоких фундаментальних генно-інженерних досліджень було доведено можливість переміщення генів від однієї таксономічної групи живих організмів до іншої попри їх статеvu несумісність. Це одна із суттєвих переваг біотехнологічного підходу для вирішення прикладних питань, яка дозволяє гени, що цікавлять дослідника, з елементами, які контролюють їх експресію, перемістити з одного до іншого організму і забезпечити їх експресію. Так, джерелом генів засухо- і холодостійкості рослин можуть бути клітини тварин або бактерії.

З урахуванням таких унікальних властивостей хлоропластів, як їх спроможність набагато інтенсивніше, ніж *E.coli* або рослини з перенесеними в їх ядра генами, синтезувати і накопичувати білки, вчені працюють над розробкою відповідної біотехнології (Малига П., 2002).

Створено нові методи і технології генетичної інженерії рослин для розробки біотехнології виробництва фармацевтичних білків, перш за все антитіл (Глеба Ю., 2002), експресії соматотропного гормону людини в хлоропластах тютюну, фармацевтичних і діагностичних препаратів та оральних вакцин рослинами (Малига П., 2002).

Існує думка про можливість одержання біологічно активних речовин шляхом трансформації рослин вірусами (Блюм Я., 2002). Рослини тютюну використовуються для виробництва вакцинального препарату, який має бути специфічним для кожного хворого на неходжкиновську лімфому (різновидність раку), шляхом перенесення за допомогою вірусного вектора гена, що асоційований з лімфомою пацієнта, для синтезу специфічного білка. При цьому слід зазначити, що вартість одержаного таким чином терапевтичного білка є набагато нижчою, ніж при використанні для цієї мети культури клітин ссавців (Ервін Б., 2002).

Використання генів, що кодують біосинтез білкової оболонки вірусів, та вбудовування їх в геном рослин забезпечують ефективний захист останніх від шкідників (Кентлі М., 2002).

На думку Пітера Дея (США), учасника електронного «круглого столу» з визнаними у світі науковими авторитетами у сфері біотехнології і генетики, який був організований в Україні (проф. Блюм Я.Б.) у 2001р., біотехнологія стане одним із найбільш важливих засобів для впровадження стійкого збалансова-

ного виробництва, що буде необхідним у новому сторіччі для того, щоб забезпечити населення Землі, яке швидко зростає, продуктами харчування. Нині у світі голодують понад 800 млн чоловік, переважно у країнах Південної Азії і Африки. Бідність є причиною недоїдання трьох чвертей населення Землі, яке проживає у сільській місцевості. Біотехнологія дає нам новий потужний інструмент, який доповнює уже існуючі способи підвищення продуктивності сільського господарства і, як наслідок, стимулювання економічного росту в бідних країнах.

У менш розвинених країнах (порівняно з Європою), в тому числі в Україні, біотехнологія могла б стати таким же трампліном у світ багатства і добробуту, яким стала для багатьох азіатських країн електроніка і комп'ютерна технологія (Блюм Я., Глеба Ю., 2002).

США і ЄС є найпотужнішими світовими центрами наукових досліджень в галузі біотехнології. Китай, Бразилія та Індія стали на шлях прискороного впровадження досягнень генної інженерії перш за все у галузі сільськогосподарського виробництва, зокрема рослинництва (Кентлі М., 2002). На сьогодні США зберігають свої чільні позиції, за ними або поряд іде Західна Європа, а Китай останнім часом здійснив величезний ривок вперед, особливо у сфері сільськогосподарської біотехнології. Сьогодні на Китай припадає 6 % світових посівів генетично модифікованих сільськогосподарських культур.

На думку Блюма Я. (2002), незважаючи на значне відставання України від лідерів, у нас поки що зберігається критичний потенціал для розвитку знань і технологій та їх впровадження у виробництво.

Для використання досягнень нової біотехнології в галузях агропромислового комплексу України необхідна підготовка висококваліфікованих фахівців з молекулярної біології, генетичної і клітинної інженерії для забезпечення наукоємного виробництва. Вирішення цього питання потребує забезпечення навчального процесу необхідною літературою.

Наразі в Україні немає вітчизняного україномовного підручника з біотехнології у тваринництві і ветеринарній медицині для студентів аграрних вищих закладів освіти. Навчальний посібник з біотехнології, виданий 1989 року, не відповідає сучасним вимогам, і, крім того, є російськомовним.

Підготовлений підручник складений згідно з вимогами Програми з біотехнології і позбавлений недоліків попереднього видання.

Завданням курсу є вивчення студентами сучасного стану біотехнології, фундаментальних основ і практичного використання її розробок у ветеринарній медицині, тваринництві, екології та суміжних галузях народного господарства.

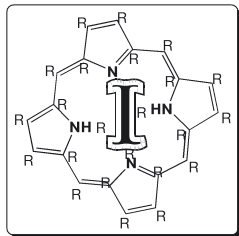
Під час вивчення курсу загальної біотехнології студенти засвоюють основи клітинної і генетичної інженерії як метод конструювання, спрямований на одержання нової генетичної інформації за допомогою гібридизації і реконструкції клітин, створення гібридних (рекомбінантних) ДНК, а також практичні напрями використання культури клітин, рекомбінантних ДНК для отримання біологічно активних речовин.

Важливим розділом спеціальної біотехнології є інженерна ензимологія, яка базується на використанні іммобілізованих ферментів. Шляхом іммобілізації одержано нові форми препаратів біологічно активних речовин з пролонгованою дією, які використовуються як для виробництва біотехнологічної продукції, так і самостійно як профілактичні та лікувальні засоби.

У спеціальній біотехнології вивчаються промислові біотехнології одержання профілактичних, діагностичних, лікарських, кормових і біологічно активних речовин — антибіотиків, гормонів, інтерферонів, білків, незамінних амінокислот тощо, які використовуються у ветеринарній і гуманній медицині, тваринництві та харчовій промисловості.

При вивченні курсу біотехнології передбачено також засвоєння біоконверсних технологій, які забезпечують утилізацію та біоконверсію відходів тваринництва і рослинництва у біогаз, високоякісне органічне добриво і білково-вітамінні кормові добавки, сприяють захисту навколишнього середовища від антропогенного забруднення та дозволяють підтримувати санітарно-гігієнічне й екологічне благополуччя довкілля.

Знання, які одержать студенти при вивченні як фундаментальних основ біотехнології, так і діючих біотехнологій, дадуть можливість підготувати конкурентоспроможного фахівця для роботи в умовах агропромислового виробництва, для прискорення входження України у світове освітнє співтовариство, світової організацію торгівлі, Євросоюз тощо.



Частина

Загальна біотехнологія

Розділ 1.

БІОТЕХНОЛОГІЯ – НАУКОВА ДИСЦИПЛІНА

1.1. ПРЕДМЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ

Біотехнологія — це наука про використання хіміко-біологічних процесів і біологічних об'єктів (мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослинного і тваринного походження, ферментних препаратів та інших біологічно активних речовин) у промисловому виробництві. Назва її походить від грецьких слів bios — життя, techné — мистецтво, logos — наука.

Відповідно до визначення Європейської федерації біотехнологів (ЄФБ, 1984) біотехнологія базується на інтегральному використанні біохімії, мікробіології, молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії з метою промислової реалізації властивостей мікроорганізмів, культур клітин і тканин. Уже у самому визначенні предмета відображено його місцерозташування як прикордонного, завдяки чому результати фундаментальних досліджень у сфері біологічних, хімічних і технічних дисциплін набувають прикладного значення.

Біотехнологія — одна з найдавніших і водночас одна з наймолодших наук і галузей промисловості.

Людство здавна опанувало на практиці різні процеси біотехнології. Ще з біблейських часів було відоме виноробство, випікання хліба, а дещо пізніше — одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів тощо. Стародавні народи інтуїтивно використовували прийоми і способи виготовлення продуктів, які сьогодні ми відносимо до біотехнологічних.

Значний поштовх у розвитку біотехнології пов'язаний з видатними дослідженнями великого французького вченого Луї Пастера (1822–1895) — основоположника наукової мікробіології. Він розкрив мікробну природу бродіння, довів можливість життя у безкисневих умовах, експериментально спростував уявлення про самовільне зародження живих істот, створив наукові основи вакцинопрофілактики і вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації, названий його ім'ям, — пастеризацією тощо.

Починаючи з другої третини ХХ століття розпочалось впровадження крупномасштабного герметизованого обладнання, яке забезпечує проведення процесів у стерильних умовах. Особливо потужний поштовх у розвитку промислового біотехнологічного обладнання був відмічений у період становлення і розвитку виробництва антибіотиків (період Другої світової війни 1939–1945 рр., коли виникла гостра необхідність у проти-мікробних препаратах для лікування хворих з інфікованими ранами). У цей час були вирішені основні завдання з конструювання, створення і впровадження у практику біореакторів, які використовуються й нині.

Однак термін «біотехнологія» прижився лише з середини 70-х років ХХ ст., коли біотехнологія пережила своє друге народження у зв'язку з появою генетичної інженерії. Власне становлення біотехнології як самостійної науки розпочалося з 1972 р., коли П. Берг зі співробітниками у США створили першу рекомбінантну молекулу ДНК.

Звичайно, без фундаментальної роботи Ф. Кріка і Дж. Уотсона (1953) щодо встановлення структури ДНК було б неможливо досягнути сучасних результатів у сфері біотехнології. З'ясування механізмів функціонування і регуляції ДНК, виділення і вивчення специфічних ферментів привело до формування чіткого наукового підходу, до розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт.

Уже в 1982 р. надійшов у продаж людський інсулін, синтезований кишковими паличками, які містили штучно вмонтовану інформацію про цей гормон. Згодом з'явилися інші генно-інженерні препарати: інтерферони, соматотропний гормон людини, інтерлейкін-2 та ін.

У цей період були одержані суперпродуценти антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів; розроблені та впроваджені екологічно чисті безвідходні технології; розроблена і впроваджена у практику спеціальна апаратура; здійснена автоматизація і комп'ютеризація біотехнологічних процесів тощо.

Протягом останніх 10–15 років минулого століття проходив бурхливий розвиток біотехнології, визначались сфери пріоритетного впровадження конкретних результатів технологічних розробок.

1.2. БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

До **хіміко-біологічних процесів** належать ті з них, в яких використовують біологічні об'єкти різної природи (мікробної, рослинної або тваринної), наприклад, при виробництві продукції різноманітного призначення – антибіотиків, вакцин, ферментів, кормового і харчового білка, гормонів, амінокислот, біогазу, органічних добрив тощо.

Об'єкти біотехнології дуже різноманітні й діапазон їх розповсюджується від організованих частин (вірусів) до людини (рис. 1.1.).

Біооб'єкти характеризуються такими показниками, як рівень структурної організації, здатність до розмноження (або репродукції), наявність або відсутність власного метаболізму при культивуванні у належних умовах. Що стосується **характеру** біооб'єктів, то під цим слід розуміти їх структурну організацію. В такому випадку біооб'єкти можуть бути молекулами (ферменти, імуномодулятори, нуклеозиди, оліго- і поліпептиди тощо), організованими частинами (віруси, фаги), одноклітинними (бактерії, дріжджі) і багатоклітинними особинами (нитчасті вищі гриби, рослинні тканини, одношарові культури клітин

савців), цілими організмами рослин і тварин. Але навіть при використанні біомолекули як об'єкта біотехнології її початковий біосинтез здійснюється у більшості випадків відповідними клітинами. Отже, можна стверджувати, що об'єкти біотехнології належать або до мікробів, або до рослинних і тваринних організмів.

Таким чином, незалежно від систематичного положення біооб'єкта на практиці використовують або природні організовані частинки (фаги, віруси) і клітини з природною генетичною інформацією, або клітини з штучно заданою генетичною інформацією, тобто у будь-якому випадку використовують клітини — чи то мікроорганізм, рослина, тварина або людина.

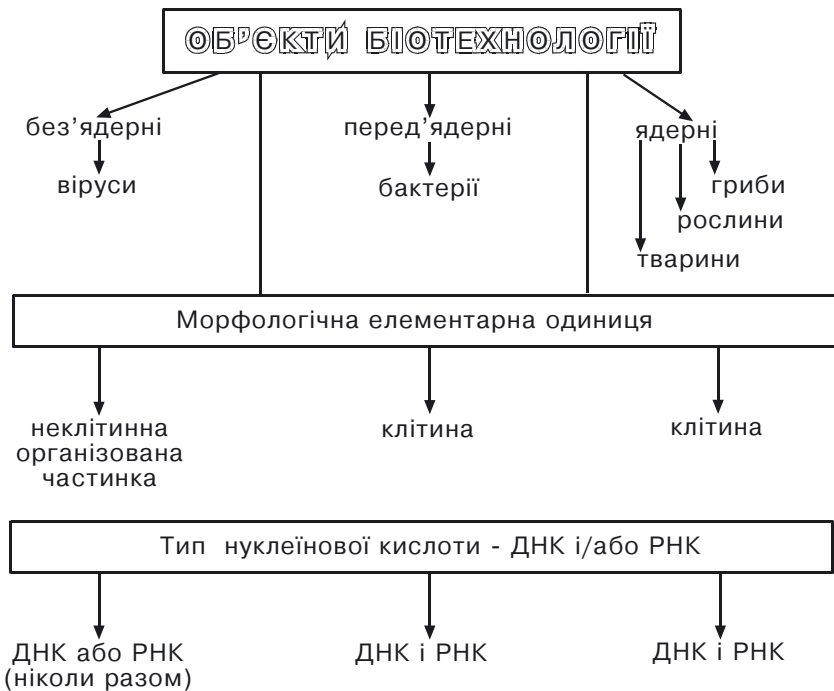


Рис 1.1. Класифікація об'єктів біотехнології
(за Єліновим Н.П., 1995)

Нині більшість об'єктів біотехнології становлять мікроби, світ яких дуже великий і різноманітний. До них належать усі прокариоти – бактерії, актиномицети, рикетсії, синьо-зелені водорості й частина еукариот – дріжджі, нитчасті гриби, простіші й водорості (рис. 1.2). Мікробами серед рослин є мікроскопічні водорості, а серед тварин – мікроскопічні найпростіші.

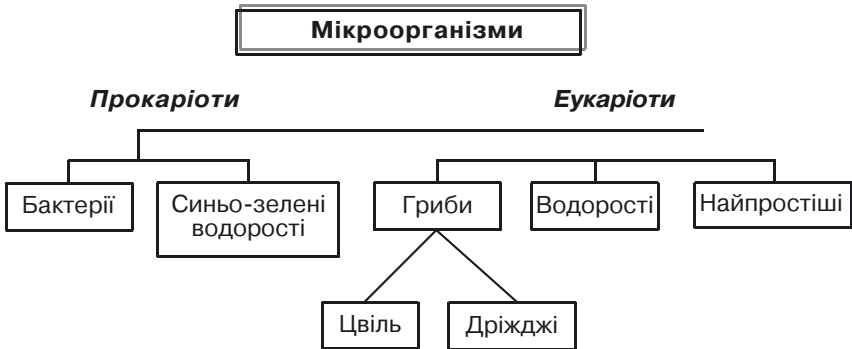


Рис. 1.2. Класифікація мікроорганізмів
(за Дж. Бейлі, Д. Олліс, 1989)

Основою сучасного біотехнологічного виробництва є мікробіологічний синтез, тобто синтез різноманітних речовин за допомогою мікроорганізмів. Об'єкти рослинного і тваринного походження ще не знайшли широкого розповсюдження через їх високу вимогливість до умов культивування, що значно здорожчує виробництво.

Для реалізації біотехнологічних процесів важливими параметрами біооб'єктів є: чистота, швидкість розмноження клітин і репродукції вірусних частин, активність і стабільність біомолекул або біосистем.

При використанні ферментів (в ізольованому або іммобілізованому стані) як біокатализаторів виникає необхідність охорони їх від деструкції банальною сапрофітною мікрофлорою, яка може проникати у сферу біотехнологічного процесу ззовні внаслідок нестерильності системи, наприклад, через негерметичність обладнання.

Швидкість розмноження клітин і репродукція вірусних частин прямо пропорційно відбиваються на збільшенні біомаси і утворенні метаболітів.

Активність і стабільність перебування біооб'єктів в активному стані – найважливіші показники їх придатності для тривалого використання в біотехнології.

Головною ланкою біотехнологічного процесу, який визначає його сутність, є клітина. Саме в ній синтезується цільовий продукт. За влучним висловом Овчіннікова Ю.А. (1985), клітина – це мініатюрний хімічний завод, який працює з колосальною продуктивністю, з граничною узгодженістю і за заданою програмою. В ній щохвилини синтезуються сотні найскладніших сполук, включаючи гігантські біополімери, у першу чергу білки.

Узагальнена схема одержання біотехнологічної продукції наведена на рис. 1.3.

Методи біотехнології. Біотехнології притаманні свої специфічні методи. Це крупномасштабне глибинне культиву-

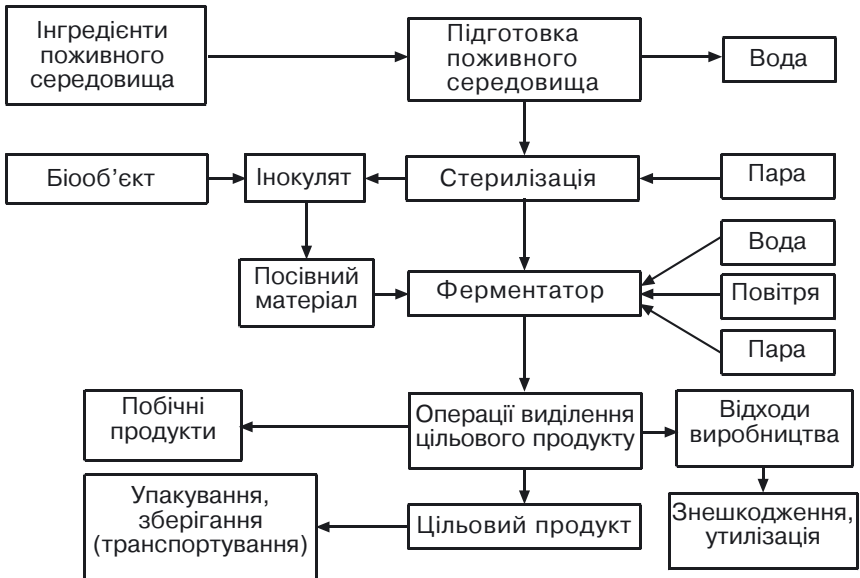


Рис. 1.3. Приблизна узагальнена схема процесів у біотехнології
(за Єліновим Н.П., 1995)

вання біооб'єктів у періодичному, напівбезперервному або безперервному режимі та вирощування клітин рослинних і тваринних тканин в особливих умовах. Біотехнологічні методи культивування біооб'єктів виконуються у спеціальному обладнанні, наприклад, у ферментерах вирощують бактерії і гриби при одержанні антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів тощо.

У подібних ферментерах вирощують деякі клітини людини (бласти) для одержання білка-інтерферону, а також деякі види рослинних клітин. Однак останні частіше вирощують у стаціонарних умовах на середовищі з ущільненою (наприклад, агаризованою) підкладкою у скляних або поліетиленових ємностях.

Інші методи, які використовують у біотехнології, є спільними, наприклад з методами в мікробіології, біохімії, органічній хімії й інших науках. Особливо потрібно виділити методи клітинної і генетичної інженерії, які покладено в основу сучасної біотехнології.

Відмінністю методів, які використовуються у біотехнології, є те, що вони повинні виконуватись, як правило, в асептичних умовах (від грецького *a* – ні, *septicos* – гнилісний), тобто з уникнення можливості потрапляння у середовище, де культивується біооб'єкт, патогенних і сапрофітних мікроорганізмів.

Патогенні види становлять безпосередню небезпеку для діяних у виробництві людей і для споживачів кінцевих продуктів; сапрофітні види можуть виступати конкурентами за поживні субстрати, антагоністами, продуцентами токсичних речовин, включаючи пірогени.

1.3. МЕТА І ЗАВДАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Першочерговими завданнями біотехнології є створення:

- нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів для гуманної і ветеринарної медицини (інтерферонів, інсуліну, гормонів росту людини, моноклональних антитіл, вакцин тощо) для ефективної профілактики, діагностики і лікування людей і тварин;

- ❑ засобів захисту рослин від хвороб і шкідників; бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин; нових високопродуктивних і стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів і гібридів сільськогосподарських рослин, одержаних методами генетичної і клітинної інженерії;
- ❑ цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів тощо) для застосування у тваринництві з метою підвищення продуктивності тварин;
- ❑ нових технологій одержання цінних продуктів для використання у харчовій, хімічній, мікробіологічній та інших галузях промисловості;
- ❑ безвідходних і екологічно безпечних технологій утилізації і біоконверсії сільськогосподарських, промислових, побутових відходів для одержання енергоносіїв (біогазу), високоякісного органічного добрива, білкових та вітамінних кормових добавок;
- ❑ удосконалення і оптимізація апаратури для біотехнологічних процесів з метою досягнення максимальних виходів кінцевих продуктів;
- ❑ підвищення техніко-економічних показників біотехнологічних процесів порівняно з існуючими.

На шляху вирішення поставлених завдань біотехнологію чекають немалі труднощі, пов'язані з виключною складністю організації живого. Будь-який біооб'єкт — це цілісна система, в якій не можна змінити жоден з елементів, не змінюючи інших, не можна довільно перекомбінувати їх. Будь-який вплив на об'єкт викликає не тільки бажані, але й побічні ефекти. Перебудова геному відразу відбивається на багатьох ознаках організму. Окрім цього, екосистема — це свого роду цілісна система, і зміна одного з її компонентів позначається на інших компонентах.

Успіхи, досягнуті у сфері генетичної і клітинної інженерії на найпростіших біологічних системах (прокаріотних організмах), дають надію на подолання цих труднощів.

Розділ 2.

МІЖНАРОДНІ СИСТЕМИ GLP І GMP ЩОДО ЯКОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОДУКТІВ

Система GLP — це зведення правил, які регламентують проведення стандартизації лікарських препаратів та інших біологічно активних речовин, а система GMP — їх виробництво.

2.1. СИСТЕМА GLP

З метою організації якісного проведення доклінічних випробувань лікарських та інших біологічно активних речовин (харчових добавок, агрохімікатів тощо) у промислово розвинених країнах (Англія, Німеччина, США, Франція, Японія та інші) затверджені єдині правила системи GLP (Good Laboratory Practice). Існує група GLP у Європейському центрі з екології і токсикології хімічної промисловості; у США система GLP діє з червня 1979 р. Головним в такій системі є наступне:

- 1) завчасна розробка стандартної методики проведення випробувань або SOP (Standart Operating Procedure) стосовно усіх його етапів;
- 2) призначення керівника і відповідальних за кожен вид випробувань;
- 3) кожному відповідальному виконавцю доручається чітко виконувати усі операції у відведених йому межах;
- 4) результати виконання операцій мають бути внесені у спеціальний протокол, датовані і підписані;
- 5) у разі виконання складних операцій, щоб уникнути помилок, рекомендується удаватися до подвійної перевірки;
- 6) в установленому порядку виконавець доповідає керівнику про перебіг випробувань. Керівник повинен бути компетентним в усіх справах, пов'язаних з випробуваннями;

- 7) фактичні дані, записи і препарати (речовини) мають зберігатися у повному порядку, щоб завжди можна було знайти необхідне;
- 8) остаточний звіт за змістом має відображати отриманні дані, а також супроводжуватись обговоренням, складеним відповідальним виконавцем; на звіті проставляються дата і підписи (відповідального виконавця і осіб, які підтверджують зміст звіту);
- 9) повинна бути служба якісної оцінки випробувань – QAU (Quality Assurance Unit). Особи, задіяні у цій службі, зобов'язані проводити внутрішню інспекцію в установленому порядку і за необхідності видавати рекомендації щодо вдосконалення процесів проведення випробувань.

На систему GLP спираються у випадках випробування речовин: на мікробне зображення; на пірогенність; гостру, підгостру і хронічну токсичність, на специфічну токсичність (канцерогенність), антигенність, лікарську залежність, пошкодження зародкових клітин; подразнення слизових оболонок шкіри і в місці введення речовини; мутагенність, тератогенність — від грецького *teratos* — чудовисько, урод; цитотоксичність; на безпечність для макроорганізму при введенні *in vivo* (абсорбція, розподіл, швидкість виведення, метаболізм); проводять фармакологічні випробування з оцінкою фармакокінетики (дія лікарської речовини, яка вивчається, на організм) і фармакодинаміки (вивчення сили дії лікарської речовини).

У зв'язку з необхідністю проведення згаданих випробувань створюють спеціальні групи: загальну (в тому числі і для контролю за гігієною і санітарією працюючих), мікробіологічну, для вивчення метаболізму, проведення загальнофармакологічних випробувань та загальних клінічних досліджень; патологоанатомічну, проведення експериментів на тваринах, обробки даних (з включення управління ЕОМ), з підготовки проб, аналітичну, з управління дослідженням і, за необхідності, інші. На кожну групу затверджується керівник, який не повинен поєднувати свої прямі обов'язки з роботою в групі інспекцій.

Додержання вимог системи GLP має бути підкріплено досконалістю організації усіх допоміжних служб і достатнім матеріальним забезпеченням. Бажано мати окреме приміщення для

проведення біологічних випробувань, де експериментальні тварини розміщувалися б у відповідних приміщеннях: для гнотобіонтів, заражених, контрольних, призначених для роботи з радіоізотопами, для карантинізації тощо.

У роботі з тваринами мають враховуватися усі інфекційні захворювання, які можуть вплинути на результати експериментів. При цьому необхідно мати на увазі і той факт, що окремі збудники інфекційних захворювань можуть передаватися від людини до тварин і навпаки. До них належать віруси сказу, лімфоцитарного хориомеїнігіту, деякі бруцели, сальмонели, мікобактерії туберкульозу, дизентерійна амеба тощо.

Схвалений препарат (речовина) після лабораторних передклінічних випробувань за системою GLP і подальшої клінічної перевірки дозволяється до випуску в умовах промислового виробництва.

2.2 СИСТЕМА GMP

Для забезпечення виготовлення високої якості продукту Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) у 1968 р. затвердила «Вимоги до практики якісного виробництва при виготовленні і контролі якості ліків і до спеціалістів у сфері фармації». Роком пізніше ці вимоги, які ввійшли (з невеликими змінами і уточненнями) у правила системи GMP (Good Manufacturing Practice), були рекомендовані Асамблеєю ВООЗ для міжнародної торгівлі, а в 1971 р. вони були видані як додатки до другого видання Міжнародної Фармакопеї.

GMP — це єдина система вимог з контролю якості лікарських засобів з початку переробки сировини до виробництва готових препаратів, включаючи загальні вимоги до приміщень, обладнання і персоналу. З 1975 р. правила GMP розширені і вони стосуються різних хімічних і біологічних речовин, ветеринарних препаратів; вихідних матеріалів для використання в дозованих формах, якщо вони включені у законодавства країн-експортерів і країн-імпортерів; і, насамкінець, інформації про безпеку і ефективність перерахованих речовин, матеріалів, препаратів.

З урахуванням видання в 1987 р. провідних вказівок Міжнародної Організації Стандартизації (ISO) серії ISO 9000–9004 за системами якості виникла необхідність переглянути існуючі вимоги GMP. У 1991 р. на спеціальній конференції у Москві був переглянутий проект вимог GMP, який включає три частини:

1. «Управління якістю у промисловому виробництві лікарських засобів: філософія і основні складові».
2. «Практика якісного виробництва і контроль якості».
3. «Додаткові і допоміжні напрями».

Перша частина містить 12 розділів, які стосуються організації контролю за якістю виробництва, санітарії і гігієни, укладення контрактів, стандартних робочих методик, оформлення необхідної документації тощо.

Друга частина містить два розділи — виробництво і контроль якості. Стосовно виробництва лікарських засобів вказано, що воно має ґрунтуватися на принципі чіткого додержання методів ведення технологічного процесу згідно з нормативно-технічною документацією з метою одержання продукту необхідної якості і згідно з дозволом на його виготовлення і продаж. По можливості уникати будь-яких відхилень від методик або інструкцій. За наявності таких відхилень необхідно погодження, дозвіл і підпис призначеної відповідальної особи, а за необхідності залучення служби відділу контролю якості.

Операції з різними продуктами не повинні виконуватись в одному і тому ж приміщенні, поки не буде усунений ризик перемішування або перехресного забруднення.

Доступ у виробничі приміщення можуть мати лише особи, які зайняті на виробництві. Уникати виготовлення немедициної продукції у зонах і на обладнанні, призначеному для виготовлення фармацевтичної продукції. При роботі з сухими матеріалами і продуктами необхідно дотримуватись правил техніки безпеки для попередження виникнення, накопичення і розповсюдження пилу, що може призвести до перехресного забруднення продуктів, що виготовляються, або до їх мікробного забруднення. Мікроби можуть потрапляти у повітря і на частинки пилу із інших матеріалів і продуктів при їх виготовленні, із заб-

руднених обладнання і одягу, шкіри працюючих. Запобігти цьому можна шляхом виготовлення кожного цільового продукту в роздільних зонах (пеніциліни, живі вакцини й інші БАР) або, у крайньому випадку, виготовлення їх у часі порізно; забезпечення відповідними повітряними шлюзами; захисного технологічного одягу; використання засобів ефективної деконтамінації обладнання, стін та ін.; використання «закритих систем» виробництва тощо.

Необхідно перевіряти правильність і надійність з'єднання трубопроводів й іншого обладнання, яке використовується для транспортування продуктів (матеріалів) з однієї зони в іншу. Дистильована або деіонізована вода, яка надходить по трубах, має відповідати санітарно-мікробіологічним нормативам. Операції з технічного обслуговування або ремонту не мають впливати на якість продукції.

Контроль якості продукції стосується процесу забору проб, проведення досліджень, документації та ін. Всі дослідження мають проводитися згідно з затвердженими інструкціями для кожного матеріалу або продукту.

Забір проб здійснюють таким чином, щоб не забруднити їх або не піддати небажаному впливові, який позначиться на якості продукту або, навпаки, щоб матеріал, який відбирається, не був токсичним (шкідливим) для здоров'я оператора.

Для кожної партії продукту до випуску має бути лабораторна документація з підтвердженням відповідності кінцевого продукту специфікаціям.

Із кожної партії цільового продукту залишають проби на зберігання терміном, який перевершує на рік строк придатності продукту. Проби мають зберігатись у такій кількості, щоб можна було за необхідності провести щонайменше два повторних дослідження.

Третя частина вимог GMP включає розділи про стерильні фармацевтичні продукти і практику якісного виробництва основної маси лікарських субстанцій.

Необхідно пам'ятати про те, що особи, які мають підвищену чутливість до конкретної речовини (діючої або допоміжної) не повинні входити у групу виконавців. Для них допустима робота у відділі або цеху упаковки, де відсутній контакт з алергеном.

У 1991 р. затверджені правила GMP стосовно виробництва і контролю якості лікарських засобів. Ці правила відповідають Міжнародній системі GMP і включають наступні розділи: вступ, термінологія, персонал, будинки і приміщення, обладнання, процес виробництва, відділ технічного контролю, атестація і контроль виробництва, окремі вимоги до стерильних лікарських засобів і описані особливості їх виробництва.

Додержання правил GMP забезпечує випуск якісних продуктів і гарантує безпеку споживачам. У 1995 р. за пропозицією Міжнародної фармацевтичної федерації (FIP) ВООЗ затвердила GPP (Good Pharmacy Practice).

Державним департаментом ветеринарної медицини України проводяться заходи щодо гармонізації існуючої законодавчо-нормативної бази з вимогами Європейського фармацевтичного законодавства шляхом введення в дію стандартів, які регламентують процес виробництва ветеринарних препаратів, дистрибуторську діяльність, а також інспекцію виробництва фармацевтичної продукції. Одним із етапів розробки стандартів є їх переклад українською та російською мовами, який здійснюється провідними вченими і спеціалістами України.



Контрольні питання

1. Що таке біотехнологія і на чому вона базується?
2. Коли виникла біотехнологія і завдяки чому вона пережила своє друге народження?
3. Які біологічні об'єкти використовуються у біотехнології? Їх класифікація.
4. Які методи використовуються у біотехнології?
5. Що є завданням біотехнології?
6. Які існують міжнародні системи правил, що регламентують проведення стандартизації лікарських препаратів та інших біологічно активних речовин та їх виробництво?
7. Що таке система GLP і для чого вона застосовується?
8. Що таке система GMP і як вона реалізується?

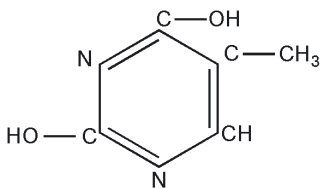
ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

3.1. НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ

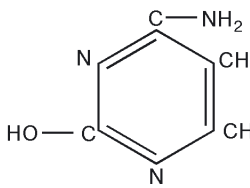
Усі живі організми є носіями двох типів нуклеїнових кислот (НК): рибонуклеїнових (РНК) і дезоксирибонуклеїнової (ДНК). У вірусах присутній тільки один з двох названих типів НК: РНК чи ДНК. НК належать до макромолекулярних сполук, розмір молекул яких коливається в широких межах. Так, молекулярна маса транспортних РНК (тРНК) складає близько $2,5 \cdot 10^4$, тоді як молекулярна маса ДНК досягає колосальних величин — 10^6 – 10^9 . Біологічна роль НК полягає у збереженні, реплікації, рекомбінації та передачі генетичної інформації.

3.1.1. Хімічний склад нуклеїнових кислот

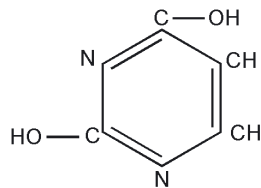
До складу молекул НК входять атоми азоту (15–16 %), фосфору (8–10 %), вуглецю, кисню і водню. З метою ідентифікації компонентів, що входять до складу НК, і їхнього кількісного визначення ДНК і РНК піддають ферментному або найчастіше кислотному гідролізу, у результаті чого виявляють пуринові (у молекулі пурину шестичленне кільце піримідину і п'ятичленний гетероцикл імідазолу знаходяться в конденсованому стані, утворюючи біциклічне похідне) (аденін і гуанін) і піримідинові (тимін, цитозин і урацил) азотисті основи, моноцукри — пентози (рибозу і дезоксирибозу) та фосфорну кислоту:



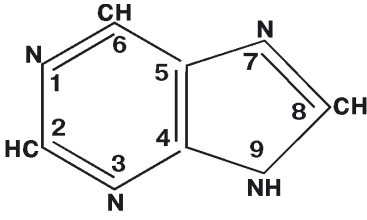
Тимін (5-метил-2,4-діоксипіримідин)



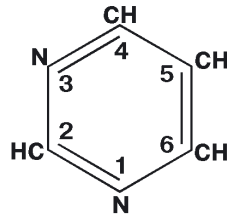
Цитозин (2-окси-4-амінопіримідин)



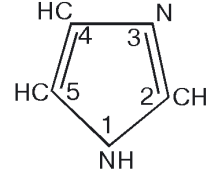
Урацил (2,4-діоксипіримідин)



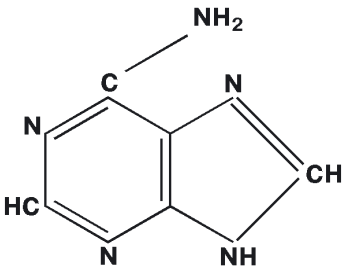
Пури́н



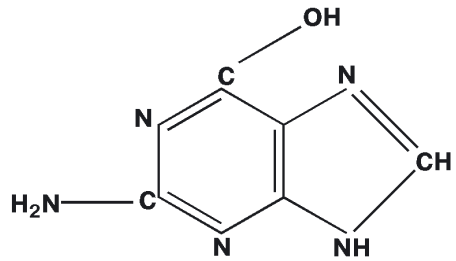
Піри́мідин



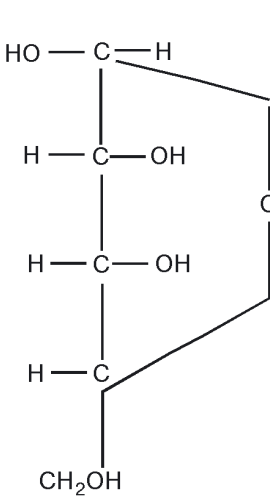
Імідазол



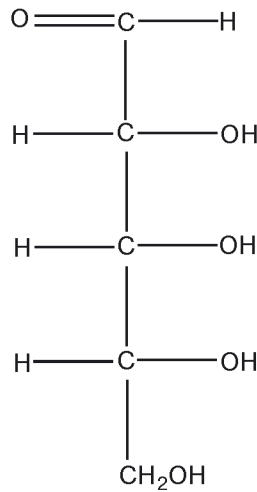
Аденін (6-амінопури́н)



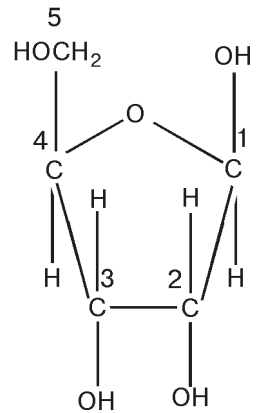
Гуанін (2-аміно-6-оксипури́н)



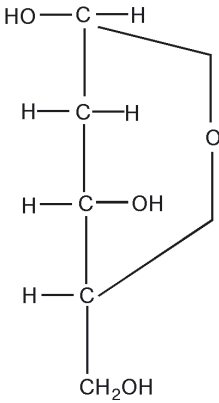
β-D-рибоза



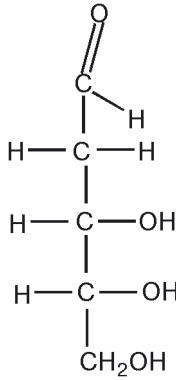
D-рибоза



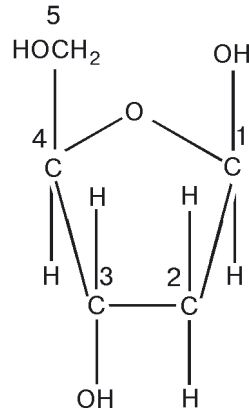
β-D-рибофураноза



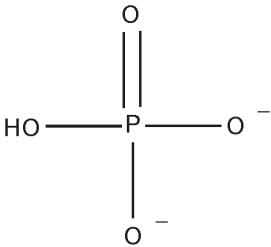
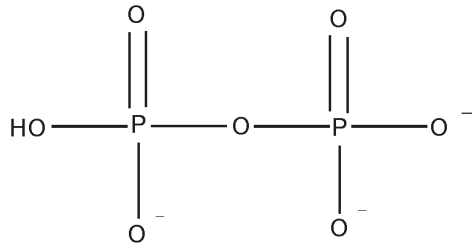
β-D-2-дезоксирибоза



2-дезоксирибоза

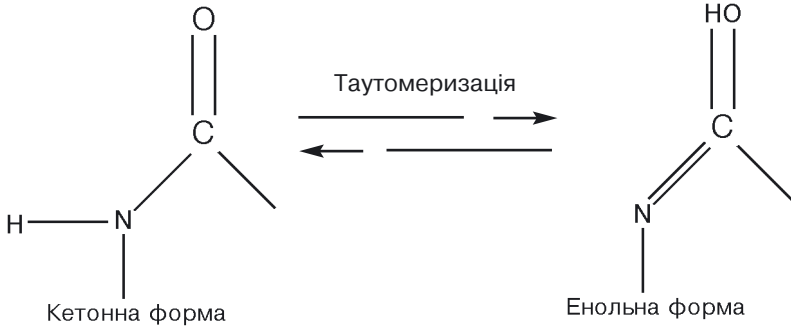


β-D-2-дезоксирибофуранова

Неорганічний фосфат
(Ф_н, або P_i)Неорганічний піфосфат
(ФФ_н, або P_{PPi})

Крім названих похідних пурину і піримідину, в гідролізатах НК міститься кілька десятків інших основ (1-метиладенін, 1-метилгуанін, N₂-диметилгуанін, N₆-диметиладенін, N₇-метилгуанін, 5-метилцитозин, 5-оксиметилцитозин, 4-тіоурацил, дігідроурацил та ін.), які через малу кількість отримали назву екзотичних, або мінорних компонентів. Їхня біологічна роль, очевидно, зводиться до захисту НК від руйнівної дії ферментів. Особливо багато мінорних основ у складі тРНК (близько 60).

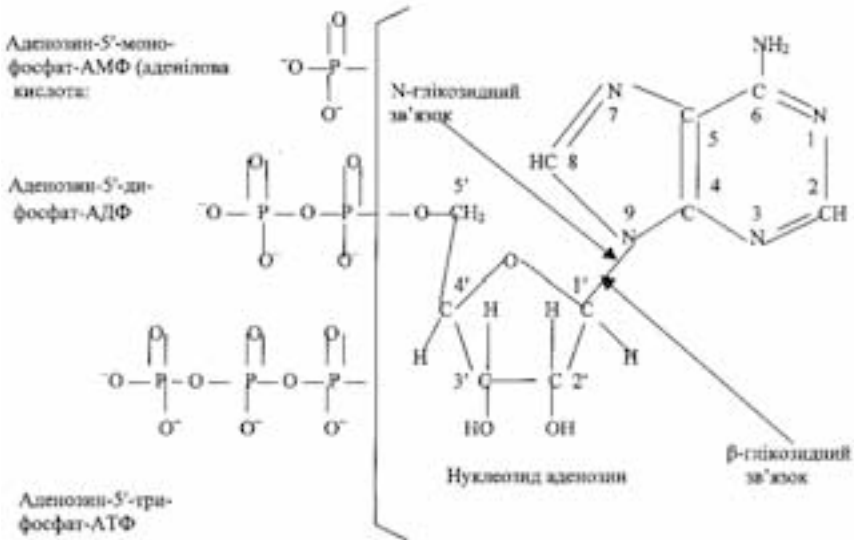
Азотисті основи, що містять ОН-групи (гуанін, цитозин, тимін і урацил), здатні до кето-енольних таутомерних перетворень і залежно від реакції середовища можуть знаходитися в енольній (лактимній) чи кетонній (лактаміній) формі:



За фізіологічних умов більш стабільними є кетоструктури; у кетоформі азотисті основи входять до складу нуклеїнових кислот.

З п'яти вищеназваних пуринових і піримідинових азотистих основ до складу ДНК входять аденін, гуанін, цитозин і тимін. Вони містяться і в РНК, але замість тиміну присутній урацил. Назва НК залежить від пентози, що входить до її складу: у ДНК вуглеводний компонент представлений дезоксирибозою, у РНК — рибозою. Ця відмінність у будові рибози і дезоксирибози (заміна у другого вуглецевого атома рибози ОН-групи на Н) сприяє зміцненню зв'язку між другим і третім атомами вуглецю і створює сприятливі умови для компактного укладання молекули ДНК.

При ферментному гідролізі НК утворюються продукти, що складаються із залишків азотистих основ, рибозного чи дезоксирибозного компонентів та фосфорної кислоти:



Атоми вуглецю пентози мають цифрові позначення зі штрихом, щоб можна було відрізнити їх від вуглецевих атомів, що входять у пуринові чи піримідинові гетероцикли.

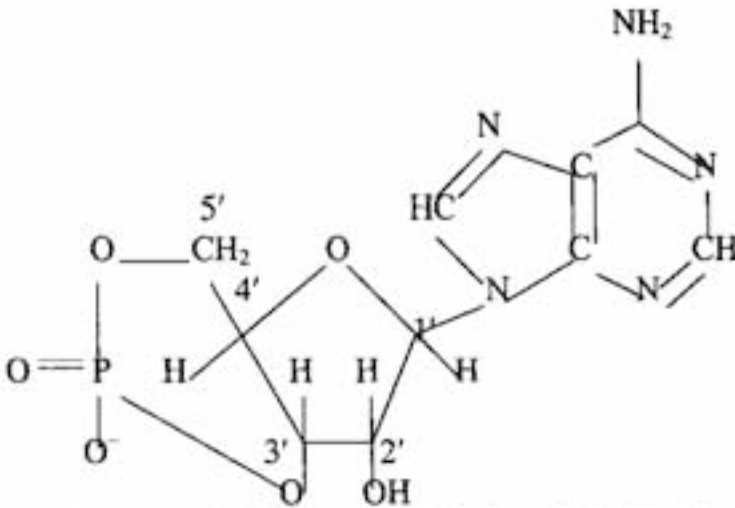
Сполуки, що складаються із залишків тієї чи іншої азотистої основи, пентозного (рибозного чи дезоксирибозного) компонента і фосфорної кислоти, називаються нуклеотидами. Вони є мономерними одиницями олігонуклеотидів і полінуклеотидних структур НК. Відщеплення від нуклеотида фосфорної кислоти супроводжується утворенням відповідного нуклеозиду. Продукти фосфорилювання нуклеозидів, зокрема нуклеозидтрифосфати, використовуються для біосинтезу ДНК і РНК. Нуклеозиди і нуклеотиди одержують назви за азотистими основами, що входять до їх складу. Якщо вуглеводний компонент нуклеозиду представлений дезоксирибозою, то перед назвою відповідного нуклеотида ставиться префікс дезокси, наприклад дезоксигуанозин-5-трифосфат (д-ГТФ). Дані за номенклатурою нуклеотидів, нуклеозидів і азотистих основ представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

Номенклатура азотистих основ, нуклеозидів і нуклеотидів

Азотисті основи	Нуклеозиди	Нуклеотиди		
		Повна назва	Скорочена назва	
			українська	міжнародна
Аденін	Аденозин	Аденілова кислота (аденозин-монофосфат)	АМФ (А)	AMP (A)
Гуанін	Гуанозин	Гуанілова кислота (гуанозин-монофосфат)	ГМФ (Г)	GMP (G)
Цитозин	Цитидин	Цитидилова кислота (цитидин монофосфат)	ЦМФ (Ц)	CMP (C)
Тимін	Тимідин	Тимідилова кислота (тимідин монофосфат)	ТМФ (Т)	TMP (T)
Урацил	Уридин	Уридилова кислота (уридин монофосфат)	УМФ (У)	UMP (U)

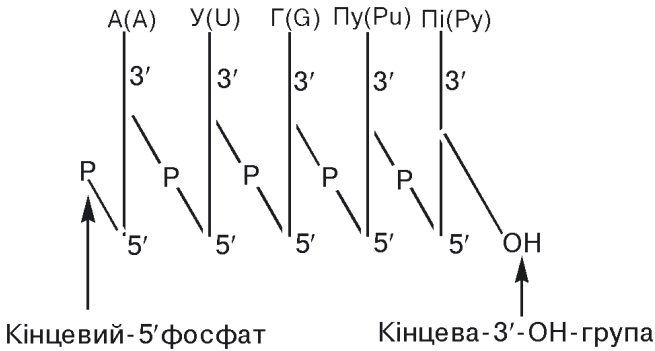
Існують нуклеотиди, що мають циклічну будову. Це насамперед циклічні аденозинмонофосфати (цАМФ чи сАМР), гуанозинмонофосфати (цГМФ чи сGMP) і цитозинмонофосфати (цЦМФ чи сСМР). Циклічні АМФ і ГМФ утворюються з відповідних нуклеозидтрифосфатів під дією ферментів аденілатциклази і гуанілатциклази. Біологічне значення цАМФ полягає в його контролі за активністю ферментів (вторинний медіатор); роль первинного регулятора виконує адреналін, що активує аденілатциклазу. Механізм дії цГМФ і цАМФ подібний, однак при дії на той самий фермент цГМФ чинить протилежний ефект, тобто є інгібітором ферментів. Даних про біологічну активність цЦМФ поки що мало відомо:



Аденозин-3',5'-цикломонофосфат (цАМФ, або сАМР)

3.1.2. Структура нуклеїнових кислот

Первинна структура. Залишки нуклеотидів у поліну-
 клеотидному ланцюзі з'єднані фосфодієфірними зв'язками між
 5'-ОН-групою пентози одного нуклеотиду і 3'-ОН-групою пен-
 този іншого нуклеотиду. При скороченому зображенні формул
 НК вуглеводний компонент має вигляд вертикальних ліній, над
 якими знаходяться символи азотистих основ. Іноді обмежують-
 ся позначенням приналежності азотистих основ до пуринів (Пу,
 Рц) чи піримідинів (Пі, Ру). Фосфодієфірні зв'язки між залиш-
 ками сусідніх нуклеотидів мають вигляд косих ліній, посереди-
 ні яких знаходиться хімічний знак фосфору (Р):



У таких і ще більш скорочених формулах полінуклеотидів 5'-кінець нуклеотидного залишку прийнято розташовувати ліворуч:

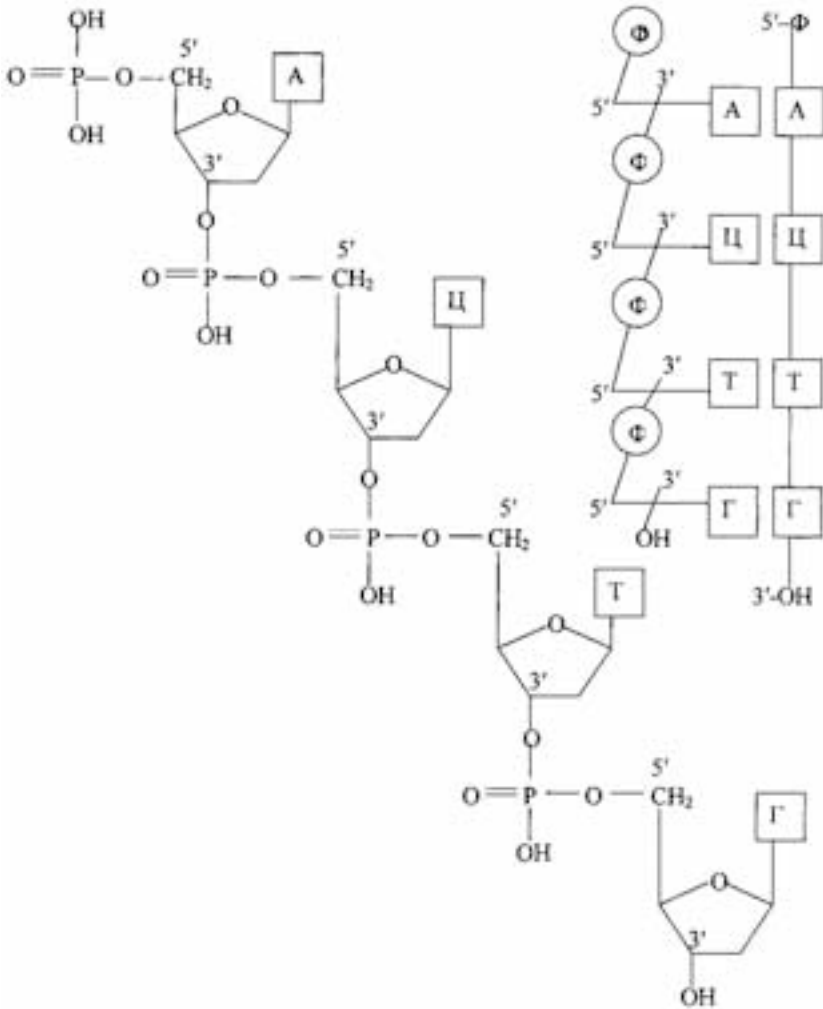


чи



Гідроліз полінуклеотидного з'єднання приведе до утворення гуанілової кислоти як кінцевого нуклеотида з вільним фосфатом у 5'-кінці і вільного аденозину в 3'-кінці.

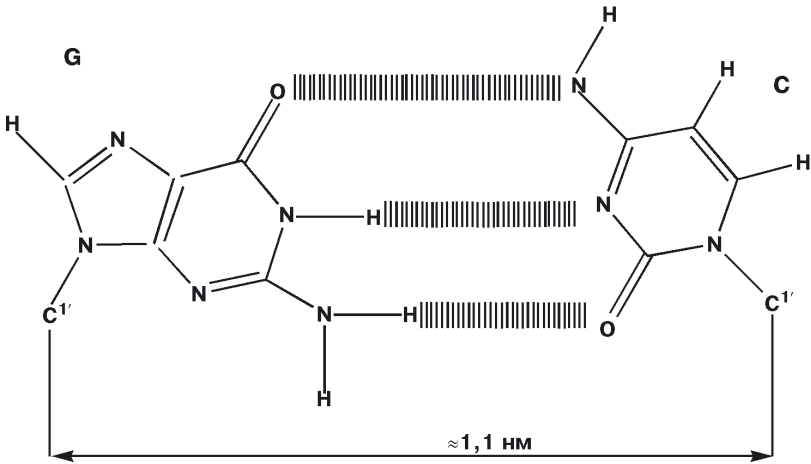
Послідовність розташування чи порядок чергування залишків мононуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі визначає первинну структуру ДНК і РНК. В утворенні первинної структури беруть участь глікозидний зв'язок, що з'єднує азотисті основи з пентозою, ефірний зв'язок між рибозою чи дезоксирибозою і фосфорною кислотою та фосфодіефірний зв'язок між нуклеотидами. Усі ці зв'язки ковалентні, досить міцно стабілізують первинну структуру. При цьому встановлено, що нуклеотиди в полінуклеотидні ланцюги зв'язані в ДНК і РНК за допомогою 3', 5'-фосфодіефірних зв'язків. Послідовність нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі ДНК подається у вигляді різних варіантів схем:



Взаємодії між пури-піримідиновими парами основ, що забезпечують зв'язок поліпептидних ланцюгів у ДНК, представлені на рис. 3.1. Розгалужень у поліпептидному ланцюзі ДНК не виявлено.

Питання щодо встановлення первинної структури ДНК пов'язано з величезними труднощами, які полягають у тому, що молекулярна маса навіть найменших молекул ДНК обчислюється мільйонами дальтон. З огляду на це за ініціативою і участю

Гуанін — — — — Цитозин
 — — — —
 — — — —
 — — — —
 — — — —
 (три водневі зв'язки)



Аденін — — — — Тимін
 — — — —
 — — — —
 — — — —
 (два водневі зв'язки)

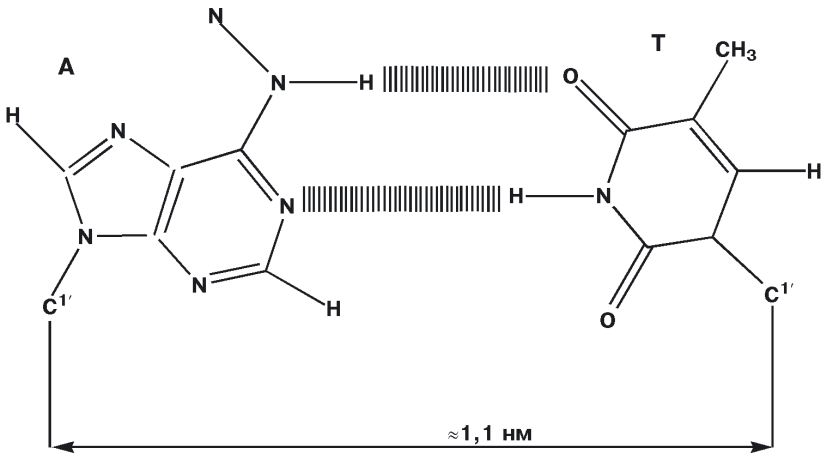


Рис. 3.1. Пурип-піримідинові пари основ у ДНК
 (за Бохінські Р., 1986)

СРСР і США у 1988 році було розпочато виконання важливої Міжнародної програми «Геном людини», кінцевою метою якої стало визначення повної генетичної карти людини і розшифрування нуклеотидних послідовностей не тільки в екзонних, але й в інтронних фрагментах ДНК. У 2001 році, але вже без участі СРСР, який на цей час припинив своє існування, вперше було опубліковано відомості про первинну структуру ДНК людини. У вирішенні цього питання брали участь тисячі науковців з більш ніж 20 країн світу. Вони встановили, що у 23-х парах хромосом ядра соматичної клітини людини знаходяться близько 3,2 млрд. моонуклеотидних пар, не враховуючи нуклеотидний склад мітохондрій. Цікавим є повідомлення про те, що загальна довжина ДНК у ядрах всіх клітин людини досягає астрономічної величини -10^{11} км, що майже в 1000 разів перевершує відстань від Землі до Сонця.

Вторинна структура. При вивченні хімічного складу нуклеїнових кислот були встановлені значні розходження у відносному вмісті азотистих основ у різних ДНК, однак молярне співвідношення між аденіном і тиміном, а також між цитозином і гуаніном у всіх досліджених ДНК залишалось рівним приблизно 1:1, тобто число залишків аденіну дорівнює числу залишків тиміну, а число залишків гуаніну — числу залишків цитозину. На основі цих даних Чаргаффом Є. (1950) була висунута концепція про спарювання основ у ДНК, чи правило комплементарності, відповідно до якого азотисті основи взаємодіють між собою при біосинтезі молекул ДНК у будь-яких організмах: аденін — з тиміном, а гуанін — з цитозином.

Франклін Р. та Уїлкінс М. методом рентгеноструктурного аналізу одержали дані, з яких випливало, що молекули ДНК, напевно, мають будову спіралі, що складається з декількох ланцюгів.

Модель ДНК у вигляді подвійної спіралі була запропонована в 1953 р. Уотсоном Дж. та Кріком Ф. на підставі аналізу отриманих Франклін Р. та Уїлкінсом М. картин рентгеновської дифракції волокон ДНК. Уотсон Дж. та Крік Ф. встановили, що ДНК — це подвійна спіраль, що складається з двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів. У запропонованій структурі найважливішим моментом є спарювання азотистих основ

антипаралельних ланцюгів шляхом утворення між ними водневих зв'язків, що можуть виникнути тільки за умови, що по ходу біспіральної структури ДНК аденін утворить пару з тиміном, а гуанін — з цитозином. З'єднані за допомогою водневих зв'язків азотисті основи називають комплементарними, а процес виборчої взаємодії аденіну з тиміном, гуаніну з цитозином — комплементарністю. Схему спарювання азотистих основ вже можна вважати експериментально доведеною. Послідовність нуклеотидів у ланцюгах біспіральної структури ДНК комплементарна, але не ідентична. Стійкість біспіральної структури ДНК забезпечується за рахунок двох водневих зв'язків між тиміном і аденіном і трьох водневих зв'язків між цитозином і гуаніном (рис. 3.2). Комплементарність окремих азотистих основ приводить до того, що комплементарними виявляються дезоксирибонуклеотидні ланцюги ДНК у цілому. Зі схеми випливає, що в одному ланцюзі зв'язок між нуклеотидами йде в напрямку $5' \rightarrow 3'$, а в іншому — у протилежному напрямку — $3' - 5'$. Антипаралельна спрямованість комплементарних ланцюгів має біологічну основу при реплікації і транскрипції ДНК.

Крім водневих зв'язків між атомами водню, азоту і кисню в комплементарних азотистих основах у стабілізації біспіральної структури ДНК важливу роль відіграють так звані стекинг-взаємодії, що виникають між азотистими основами в зв'язку з гідрофобними силами, що діють на відстані ван-дер-ваальсового радіуса.

Рентгеноструктурний аналіз волокон і кристалів показав, що існує три типи подвійної спіралі ДНК (А-, В- і Z-форма) і один тип подвійної спіралі РНК. А- і В-ДНК є правозакрученими спіралями, а Z-ДНК — лівозакручена форма. В-форма ДНК стійка при відносній вологості, що перевищує 92 %; якщо ж вологість зменшується нижче 75 %, більшість дезоксирибонуклеотидних послідовностей приймає А-форму. Обидві форми нагадують гнучкі сходи, спіральні закручені навколо центральної осі. Залишки дезоксирибози і фосфатні групи, що чергуються, слугують поручнями «драбини», а сходишками є комплементарні пуринпіримідинові пари основ.

Місця приєднання азотистих основ до залишків дезоксирибози в комплементарних ланцюгах ДНК розташовані не чітко

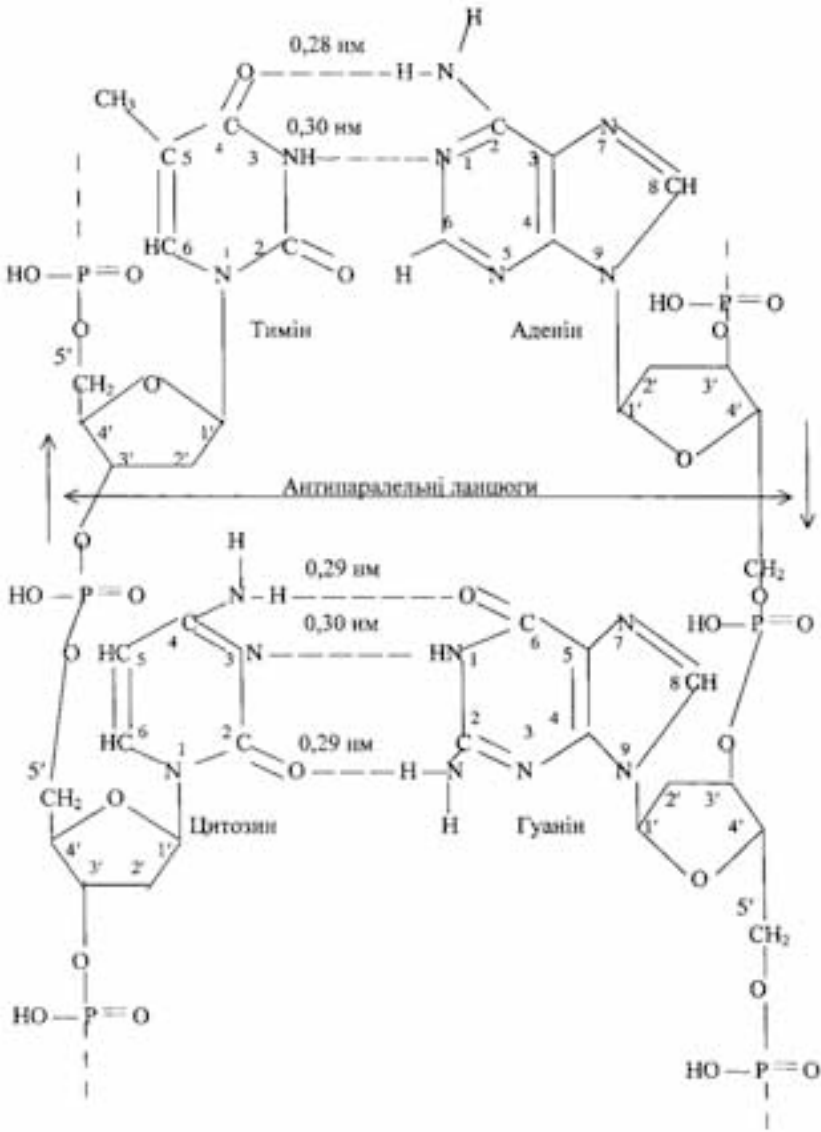


Рис. 3.2. Антипаралельні комплементарні ланцюги фрагмента ДНК
(за Березовим Т.Т. та Коровкіним Б.Ф., 1983)

один проти одного стосовно осі спіралі. Це позначається на всій конформації ДНК. З того боку від осі спіралі, де кут між дезоксирибозними кільцями менше 180° , міститься жолоб, іменований малою чи глікозидною борозною (у її бік спрямовані глікозидні зв'язки, що з'єднують дезоксирибозні залишки з азотистими основами); з протилежного боку знаходиться велика борозна, або неглікозидний жолоб. У біспіральній структурі ДНК фосфатні групи складають ніби стінки великого і малого жолобів, а «краї» пуринових і пірамідинових основ утворюють дно. На дні великої борозни знаходяться атоми азоту і кисню, що можуть з'єднуватися водневими зв'язками з бічними ланцюгами амінокислотних залишків білка і відігравати важливу роль у процесі розпізнавання.

У пуринових і піримідинових основах, що утворюють комплементарні пари, розташування груп, здатних до утворення водневих зв'язків, різне. У парі А-Т у напрямку від аденіну до тиміну спочатку розташовується атом азоту — акцептор водню, далі — NH_2 -група — донор водню і, нарешті, атом кисню — знову акцептор. У комплементарній парі G—C спочатку йде атом азоту — акцептор, далі кисень — знову акцептор і потім NH_2 -група — донор водню. У зв'язку з тим, що кожен комплементарну пару можна розглядати у протилежному напрямку Т-А і С-G, то можливі чотири варіанти сполучень донорських і акцепторних угруповань у ланцюзі ДНК, що можуть розпізнаватися репресором чи іншими регуляторними білками. Отже, інформація, закодована в ДНК у вигляді послідовності азотистих основ, з боку великої борозни може бути розшифрована будь-якою іншою великою молекулою. Мала борозна менш інформативна й у В-формі ДНК вона відіграє іншу роль.

А- і В-форми ДНК відрізняються між собою в основному розташуванням і кутом нахилу пари основ стосовно осі спіралі. У В-формі площини основ майже перпендикулярні осі спіралі, що проходить через центри пар основ. Мала борозна вужча за велику через несиметричність місць приєднання азотистих основ до залишків дезоксирибози, а глибина обох борозен приблизно однакова. В А-формі ДНК площина пари основ відхиляється від перпендикуляра до осі спіралі на $13\text{--}19^\circ$; пари основ зміщені до зовнішньої поверхні, внаслідок чого вісь спіралі ле-

жить у великій борозні, не проходячи через пари основ. Така конфігурація А-форми ДНК зумовила значні розбіжності в глибині борозен: мала борозна виявляється неглибокою, а велика навпаки — глибокою. У В-ДНК на один виток спіралі припадає у середньому 10 пар основ, відстань по осі між сусідніми парами — 0,34 нм; в А-формі ДНК до складу витка входить близько 11 пар основ, а відстань у зв'язку з цим зменшено до 0,29 нм; відстань між витками (крок спіралі) дорівнює 3,4 нм (для моделі Кріка-Уотсона і В-форми) і 2,8 нм — для А-форми. Z-форма містить близько 12 залишків у одному витку. Діаметр подвійної спіралі — 1,8 нм (2 нм між атомами фосфору) для моделі Кріка-Уотсона й А-форми; для В-форми — 1,7 нм. Названі параметри, отримані при вивченні волокон ДНК, є усередненими.

Дані, отримані при дослідженні кристалів ДНК і оброблені математичним шляхом, свідчать про наявність значних відхилень від середніх значень. Порівняння моделі Кріка-Уотсона з характеристиками В- і А-форм ДНК показує, що за кількістю пар основ, які входять в один виток, за розташуванням площини пар основ щодо осі спіралі В-форма збігається з моделлю Кріка-Уотсона; зрушення пар основ щодо осі і наявний у зв'язку з цим центральний канал, розташування дезоксирибозних залишків більше відповідають їхній конформації в А-спіралі ДНК. Такі параметри, як кут спірального обертання (кут повороту між двома сусідніми парами основ), кількість пар азотистих основ, що містяться в одному витку, відстань між сусідніми парами основ по осі спіралі і деякі інші, визначені при рентгеноструктурному аналізі і передбачені на підставі досліджень волокон ДНК, добре узгоджуються.

Викликають інтерес і вимагають пояснення значні відхилення від середніх показників локальних значень кута спірального обертання, кута «пропелера» (кут «пропелера» вимірює поворот двох основ пари в протилежних напрямках навколо з'єднуючої їхньої подовжньої осі), кута «відкриття» (в А-формі спіраль ДНК обгинає центральну вісь, внаслідок чого між парами основ існують щілини, що відкриваються в малу борозну на зразок міхів акордеона) та інших параметрів. Локальні значення кута спірального обертання для В-ДНК коливаються від 28 до 42°, а для А-форми ДНК — від 16 до 44°. На підставі цих

даних висловлюється думка, що такі варіації в конформації спіралі розпізнає репресор чи інший регуляторний білок. Крім того, передбачається, що послідовність залишків нуклеотидів впливає не тільки на генетичну інформацію, але й на регуляцію її експресії, а локальний перехід визначених регуляторних ділянок, скажімо, з правоспіральної В-конформації в лівоспіральну Z-форму зможе істотно впливати на доступність генетичної інформації і на процес її зчитування (наприклад, зміною ступеня суперспіралізації ковалентно замкнутих кільцевих ДНК). ДНК у В-формі знаходиться в процесі реплікації (синтез ДНК на молекулі ДНК), а гібрид ДНК–РНК, що утвориться на певний час, у процесі транскрипції, імовірно, має структуру А-спіралі.

Вторинна структура РНК поки що вивчена недостатньо. Наявність гідроксилу у другого вуглецевого атома рибози призводить до того, що РНК, очевидно, не може утворювати подвійну спіраль В-типу. У гіпотетичній подвійній спіралі В-типу відстань між атомом кисню 2'-гідроксильної групи рибози і деякими з навколишніх її атомів стає настільки малим, що В-форма РНК стереохімічно неможлива; в А-формі 2'-ОН-група рибози розташовується на поверхні спіралі й у зв'язку з цим віддалена від сусідніх атомів. Отже, самокомплементарні двонитчасті ділянки в тРНК повинні бути варіантами А-спіралі. Короткі самокомплементарні двонитчасті ділянки в РНК (так звані шпильки), швидше за все, також мають бути виражені А-формою. Поки що є один приклад В-форми РНК: це синтетичний гібрид, що складається з ланцюга аденілових рибонуклеотидів у ланцюзі тимідилових дезоксирибонуклеотидів. Даних про Z-форму РНК поки що немає. Найбільш ймовірно вторинною структурою всієї молекули тРНК є модель, запропонована Холлі, плоске зображення якої за формою схоже на листок конюшини (рис. 3.3).

Третинна структура. Для вивчення третинної структури ДНК необхідно мати її в інтактному (неушкодженому) вигляді. На сьогодні таким чином виділені деякі ДНК вірусів, мітохондрій і хлоропластів. Довжина двоспіральної молекули в хромосомі людини у витягнутому стані могла б досягти 8 см; насправді її довжина 5 нм. Таке надзвичайно ошадливе упакування досягається за рахунок суперспіралізації вторинної



Рис. 3.3. Схема молекули фенілаланінової тРНК (за Мецлером Д., 1980)

структури. Ступінь суперспіралізації (наявність додаткових супервитків чи суперспіралей) встановлюється за зміною константи седиментації. Суперспіралі часто зустрічаються в кільцевих молекулах ДНК. Так, хромосома *E.coli* — це єдине замкнуте кільце. Кільцеві молекули ДНК часто виявляються в мітохондріях, деяких вірусах, ядрі еукаріот. Кільцеві молекули, як правило, закручуються самі на себе, утворюючи суперспіральні молекули із супервитками. Скручування подвійної спіралі самої на себе призводить до утворення суперскрученої правозакрученої структури. Це явище називається негативною суперспіралізацією. У результаті суперспіралізації на кожен супервиток припадає 20–25 витків подвійної спіралі. Завдяки суперспіралізації дуже довга молекула ДНК (1360 мкм в *E.coli* і 990 тис. мкм у людини) упаковується в малому об'ємі бактеріальної клітини чи ядрі клітини еукаріот. Виділено ферменти ДНК-топоізомерази, що каталізують процес суперспіралізації (ДНК-гірази), а також переводять суперспіралізовані структури в релаксований стан (ДНК-розплітази); факт перебування ДНК у стані суперспіралізації підтверджений за допомогою методу електронної мікроскопії. Процес суперспіралізації ДНК у еукаріот проходить за участю гістонових білків, серед яких залежно від вмісту лізину й аргініну розрізняють п'ять основних класів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Вміст лізину і аргініну в гістонах, %

Гістон	Лізін	Аргінін
H1	24,8	2,6
H2a	10,9	9,3
H2b	16,0	6,4
H3	9,6	13,3
H4	10,8	13,7

Полікатионна природа гістонових білків забезпечує їхню взаємодію з поліаніонним пентозофосфатним каркасом і поряд з водневими зв'язками стабілізує структуру ДНК еукаріот. У ДНК мітохондрій, хлоропластів і прокаріотичних клітин фактором, що стабілізує структуру цих поліаніонних макромолекул, є неорганічні

катиони, а не білок. Значний внесок у стабілізацію структури ДНК вносять гідрофобні взаємодії в щільно упакованих азотистих основах, укладених у серцевині спіралі. Взаємодія ДНК із гістонами приводить до формування нуклеосом — структурних одиниць хроматину (рис. 3.4). У кожній нуклеосомній часточці

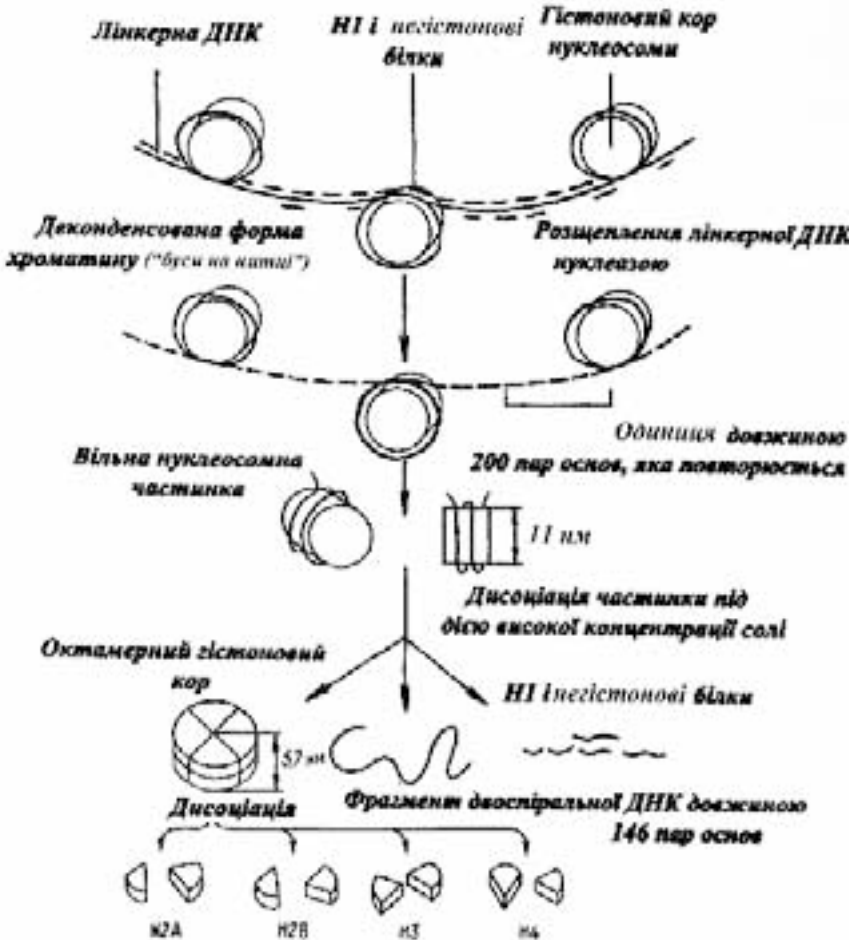


Рис. 3.4. Схема будови нуклеосоми (за Албертсом Б. та ін., 1986)

фрагмент ДНК довжиною 100–200 нуклеотидних пар закручений навколо гістонового кора, що являє собою октамерну структуру, до складу якої входить по дві молекули кожного з гістонів H2a, H2b, H3 і H4. Сусідні нуклеосоми зв'язані між собою ділянками лінкерної ДНК (спейсерні ділянки) довжиною близько 50 пар основ; спейсерні ділянки включають по одній молекулі гістона H1, а також негістонові білки. Висловлюється думка про можливу участь гістонів у регулюванні генної активності. Структурна гетерогенність хроматину і зв'язана з його структурою функціональна активність значною мірою обумовлені ковалентними модифікаціями (ацетилювання, фосфорилювання, метилювання й ін.) амінокислот гістонових білків. Суперспіралізовану молекулу ДНК можна перевести у відкриту (релаксовану) кільцеву форму, розірвавши один чи обидва ланцюги подвійної спіралі за допомогою короткочасної обробки її ферментом. Релаксована форма молекули, що утворюється, седиментує повільніше. Суперспіральність впливає на в'язкість розчинів ДНК і на електрофоретичну рухливість макромолекул. У деяких випадках наявність супервитків можна спостерігати за допомогою електронного мікроскопа. ДНК являє собою динамічну структуру, що легко модифікується. Перехід суперспіральної ДНК у відкриту кільцеву молекулу є необхідним етапом процесу реплікації.

Суперспіральна структура ДНК може бути також виявлена розривом спіралі (одного чи обох ланцюгів) під впливом інтеркалюючих з'єднань (інтеркаляція — це вбудовування плоских ароматичних кілець між парами основ ДНК). До реагентів, які викликають інтеркаляцію, належать деякі лікарські препарати, барвники й інші речовини. Застосування таких речовин пов'язане з певним ризиком, тому що інтеркалюючі сполуки мають мутагенну дію. В міру зростання ступеня інтеркаляції відбувається розкручування витків вторинної структури ДНК: кожне інтеркалююче кільце викликає розкручування спіралі на 26° . В інтактних клітинах інтеркалюючими агентами можуть бути ароматичні кільця бічних ланцюгів амінокислот при взаємодії білків з ДНК. Зміна в щільності супервитків, викликана інтеркаляцією чи зміною іонного оточення, може мати біологічне значення щодо генетичної регуляції і насамперед у дотриманні послідовності

у взаємодії ДНК із внутрішньоклітинними ферментними системами. Можливі й інші способи укладання ДНК у просторі.

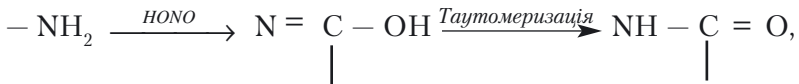
Одноланцюгові рибонуклеїнові кислоти (інформаційна, рибосомна і транспортна) при фізіологічних значеннях рН, іонної сили і температури мають велику кількість комплементарних ділянок (так званих шпильок), що визначають стійкість їхньої третиної структури. Плоска структура нативних молекул тРНК, що нагадує за формою листок конюшини, за рахунок укладання різних частин перетворюється в компактну структуру.

У деяких фагів молекула ДНК побудована з однієї спіралі; у той же час є віруси, у яких РНК складається з двох ланцюгів і за структурою нагадує ДНК.

Таким чином, варто наголосити, що спіраль ДНК містить інформацію двох типів, що кодується і зчитується по-різному: власне генетична інформація, що визначає структуру білка, та інформація, що є свого роду «інструкцією» для вибіркового читання того чи іншого фрагмента запису. В основі збереження і реалізації інформації обох типів лежать фізико-хімічні процеси, багато в чому обумовлені функціональними групами, що входять до складу нуклеїнових кислот. Іонізовані фосфатні групи, що входять до складу нуклеїнових кислот, обумовлюють їхній негативний заряд, завдяки чому ДНК в організмі знаходиться у вигляді комплексів з білками, які несуть позитивний заряд (гістони і протаміни), поліамінами і металами. Наявність вільних ОН-груп біля другого вуглецевого атома рибозного залишку РНК значною мірою визначає конформацію полімерних макро-

молекул. Полярні групи >C=O , >NH і >C-NH_2 азотистих основ нуклеїнових кислот здатні утворювати водневі зв'язки з білками, а також між комплементарними азотистими основами в біспіральній структурі ДНК. У зв'язку з цим ДНК і РНК є реакційно здатними сполуками. Порівняно легко проходять реакції метилювання азотистих основ, завдяки чому уявлення про ДНК як про ланцюг, що містить тільки чотири види нуклеотидів, варто вважати спрощеним. Метильовані азотисті основи гідроксильються і виникають їх оксиметильні похідні. Метилювання відбувається після синтезу полінуклеотида. Метилювання і гідроксильовання метильних похідних мають біологічний сенс.

Метилування захищає ДНК від впливу ферментів при потраплянні в клітину вірусів. Крім того, існує припущення, що метильовані азотисті основи є маркерами деяких специфічних ділянок генетичних копій. Модифікації в молекулі РНК досить розповсюджені. Між азотистими основами здійснюється стекинг-взаємодія, вбудовуються плоскі ароматичні кільця бічних ланцюгів амінокислот та інших ароматичних з'єднань (інтеркаляція). Під впливом азотистої кислоти NH_2 -група азотистих основ переходить в OH -групу:



у зв'язку з чим цитозин перетворюється в урацил, аденін — у гіпоксантин, гуанін — у ксантин; реагує з NH_2 -групою формальдегід. Гідроксиламін ($\text{H}_2\text{N}-\text{OH}$) вступає в реакцію навіть з тими карбонільними ($-\text{C}=\text{O}$) групами, особливо в піримідинах, що є частиною циклічної структури. Урацил і тимін більшою, а цитозин, які входять до складу нуклеїнових кислот, меншою мірою, під впливом ультрафіолетових променів димеризуються і гідруються. Це в остаточному підсумку може викликати мутагенний ефект.

Діапазон змін дезоксирибонуклеотидного складу ДНК у живих організмів дуже широкий: у представників прокариот цитозину і гуаніну міститься 22–74 %; в еукаріотичних організмів — 28–58, а в ссавців — 35–45 %. За вмістом цитозину і гуаніну в ДНК іноді стверджують про філогенетичну спорідненість організмів. Слід при цьому враховувати високу фотохімічну чутливість тиміну до ультрафіолетового світла, у зв'язку з чим високий вміст гуаніну і цитозину спостерігається в бактерій, що живуть у добре освітлених місцях, і низьке — у тих, що живуть у захищеному від сонця середовищі.

Нуклеотидний склад ДНК в організмів одного виду не залежить від віку, умов харчування й інших факторів. Чіткою стабільністю характеризується також кількісний вміст ДНК у розрахунку на одну клітину незалежно від того, з яких тканин вона виділена (винятковими є статеві клітини, де ДНК міститься удвічі менше, ніж у соматичних клітинах); у клітинах однієї тка-

нини в різних видів тварин кількість ДНК має істотні розходження (пікограм на одну клітину): у людини — 6,8; курки — 2,3; крокодила — 5,0; коропа — 3,5; дріжджів — 0,05; кишкової палички — 0,014; вірусу віспи птахів — $2,7 \cdot 10^{-4}$; фага Х174 — $2,6 \cdot 10^{-6}$.

Реплікація ДНК. Побудова моделі двоспіральної молекули ДНК дозволило Д. Уотсону і Ф. Кріку в тому ж 1953 р. сформулювати гіпотезу про механізм реплікації цієї макромолекули. У своєму припущенні, що підтвердилося експериментально в дослідях зі стабільним ^{14}N і важким ^{15}N ізотопами азоту (Месельсон М. і Сталь Ф., 1958), Д. Уотсон і Ф. Крік посилалися на важливі властивості структури і функції ДНК — специфічності спарювання основ і комплементарності ланцюгів. Таким чином, підтвердилося припущення про те, що реплікація ДНК напівконсервативна; при такому способі реплікації один з ланцюгів кожної дочірньої молекули ДНК синтезується заново, а другий ланцюг походить від батьківської молекули. Подвійна спіраль може бути розділена на вихідні комплементарні ланцюги шляхом нагрівання розчину ДНК (рис. 3.5), або за рахунок іонізації азотистих основ при додаванні кислоти чи лугу. При



Рис. 3.5. Схема денатурації і ренатурації ДНК
(за Бохінські Р., 1987)

нагріванні подвійна спіраль при чітко визначеній температурі розкручується майже миттєво — цей процес називається плавленням, а температура, за якої відбувається поділ половини подвійної спіралі, називається температурою плавлення (Тпл), що залежить від співвідношення G-C- і A-T-пар основ. Перевага G-C-пар, з'єднаних трьома водневими зв'язками, обумовлює підвищення Тпл. Ділянки ДНК, у яких A-T-пари переважають, плаваються раніше. Охолодження розчину нижче Тпл призводить до спонтанного утворення вихідної подвійної спіралі. Ця властивість подвійної спіралі, пов'язана з руйнуванням і відновленням водневих зв'язків між комплементарними азотистими основами в комплементарних ланцюгах, відіграє істотну біологічну роль.

У складному процесі реплікації ДНК беруть участь багато білків, що виконують ферментативну функцію. У результаті Корнбергом А. і його співробітниками (1965) був виділений, очищений до гомогенного стану і докладно вивчений фермент ДНК-полімераза I, яка бере участь у реплікації. Для здійснення біосинтетичної функції поряд із ДНК-полімеразою I у середовищі повинні бути присутні: повний набір дезоксирибонуклеозид-5'- фосфатів (dATФ, dГТФ, dТТФ, dЦТФ), іони магнію, затравний ланцюг з вільним 3'-ОН-кінцем (роль затравки виконує попередній ланцюг ДНК чи РНК), матричний ланцюг, у ролі якої може бути одно- чи дволанцюгова ДНК (матричну функцію дволанцюгова ДНК виконує за умови порушення цілісності її дезоксирибозофосфатного каркаса). Синтез полінуклеотидного ланцюга здійснюється в результаті нуклеофільної атаки 3'-ОН-кінцем матриці найближчого до рибозного залишку атома фосфору тільки того дезоксирибонуклеозидтрифосфату, основа якого комплементарна відповідній основі матричного ланцюга. При цьому утвориться фосфодієфірний зв'язок і звільняється ФФн, гідроліз якого задовольняє енергетичні потреби реакції полімеризації. Елонгація ланцюга йде в напрямку 5'>3'. Протягом однієї секунди молекула ДНК-полімерази продовжує ланцюг приблизно на 10 нуклеотидних залишків:



ДНК-полімераза I проявляє також $3' \rightarrow 5'$ -екзонуклеазну і $5' \rightarrow 3'$ -нуклеазну активність. У першому випадку ДНК-полімераза I завжди видаляє з $3'$ -ОН-кінця некомплементарні залишки основ, перед тим як здійснити приєднання чергового нуклеотида, тобто вона здійснює функцію редагування; видалений нуклеотид при цьому не має бути включений до складу подвійної спіралі (Страйер Л., 1985). У випадку прояву $5' \rightarrow 3'$ -нуклеазної активності ДНК-полімераза I гідролізує ДНК тільки на ділянках двоспіральної структури починаючи з $5'$ -кінця. Таким шляхом здійснюється елімінація піримідинових димерів, що утворюються при uszkodженні ДНК ультрафіолетовим випромінюванням. Слідом за ДНК-полімеразою I були виділені і вивчені ДНК-полімерази II і III. Вони, як і ДНК-полімераза I, здійснюють синтез ДНК, починаючи з $3'$ -ОН-кінця в напрямку $5' \rightarrow 3'$, використовуючи для цього ті самі дезоксирибонуклеозидтрифосфатні попередники; крім того, ДНК-полімераза III є, як і ДНК-полімераза I, $5' \rightarrow 3'$ — нуклеазою. Участь ДНК-полімераз у процесі реплікації полягає в тому, що ДНК-полімераза III забезпечує синтез більшої частини новоутвореної ДНК; внесок ДНК-полімерази I зводиться до видалення затравки і заповнення прогалин. Про біологічну роль ДНК-полімерази II поки що відомо небагато. У механізмах реплікації і репарації ДНК бере участь ще один фермент, відкритий у 1967 р., — ДНК-лігаза, що каталізує утворення фосфодієфірного зв'язку за наявності вільної ОН-групи в $3'$ -кінці ланцюга ДНК і фосфатної групи в $5'$ -кінці цього ж ланцюга в каркасі двоспіральної структури ДНК. Завдяки цій реакції усуваються одноланцюгові розриви. Участь ДНК-лігази необхідна також для нормального синтезу ДНК, репарації uszkodжень цієї макромолекули і для з'єднання (сплайсингу) ланцюгів у біотехнології одержання рекомбінантних ДНК.

Було підтверджено експериментальне припущення про чітку локалізацію місця реплікації ДНК. У ДНК *E.coli* таким місцем є унікальна послідовність поблизу гена. Ділянка, в якій одночасно відбуваються розплетення і реплікація ДНК, називається реплікаційноювилкою, від якої одночасно в двох протилежних напрямках здійснюється біосинтез дочірніх ланцюгів ДНК. Зустріч реплікаційних вилок у точці, діаметрально проти-

лежній початку реплікації, свідчить про те, що полімеризація в обох напрямках проходить з однаковою швидкістю.

ДНК-полімерази I, II і III синтезують дочірні ланцюги ДНК у напрямку $5' \rightarrow 3'$. Оскільки батьківські ланцюги антипаралельні, напрямок синтезу в одній з дочірніх ланцюгів має бути $3' \rightarrow 5'$, що суперечить раніше викладеній точці зору. Протиріччя розв'язалося, коли Оказакі Р. визначив, що частина дочірньої ДНК синтезується у вигляді фрагментів довжиною приблизно в 1000 нуклеотидних залишків кожний. Той з дочірніх ланцюгів, що синтезується в напрямку $5' \rightarrow 3'$, називається ведучим і синтезується безперервно; ланцюг, що складається з фрагментів Оказакі, називається відстаючим і також синтезується в напрямку $5' \rightarrow 3'$. У міру синтезу фрагменти Оказакі з'єднуються між собою за допомогою ДНК-лігази, що дозволяє одержати загальний напрямок росту ланцюга $3' \rightarrow 5'$. При цьому процес синтезу і ведучого, і відстаючого ланцюгів ДНК починається з $3'$ -кінця РНК-затравки, що містить вільну ОН-групу. Процес синтезу короткого ланцюга (близько 10 нуклеотидів) РНК-затравки на матриці однієї з ланцюгів ДНК каталізується особою РНК-полімеразою (праймазою), що не потребує затравки. $3'$ -ОН-кінцева група затравки використовується надалі для нарощування ланцюга ДНК за допомогою ДНК-полімерази III, а олігонуклеотидний фрагмент РНК-затравки гідролізується ДНК-полімеразою I; за участю цього ферменту заповнюються відповідними нуклеотидними послідовностями прогалину, що утворилися після видалення РНК-затравки, а ДНК-лігаза зшиває кінці фрагментів. Обов'язкова умова реплікації — необхідність розплетення подвійної спіралі батьківської ДНК у ділянці реплікаційної вилки. У ході розплетення на поділ однієї пари основ за участю ферменту гер (хелікази) витрачається енергія приблизно двох молекул АТФ. Потім одноланцюгові ділянки стабілізуються ОЦ-білком, що їх зв'язує. Позитивні супервитки, що виникають при розплетенні кільцевої ДНК, долаються за участю ферменту ДНК-гірази, яка відіграє роль молекулярного шарніра за рахунок введення в батьківську ДНК негативних супервитків. Складний механізм реплікації необхідний для забезпечення його високої надійності. За даними генетичного аналізу одна помилка з'являється при зчитуванні 10^9 – 10^{10} пар азотистих основ (Страйер Л., 1985).

Синтез РНК. Процес транскрипції в клітинах прокаріот каталізується однією РНК-полімеразою. До складу транскрипційного апарату в клітинах еукаріот входять три РНК-полімерази, одна з яких (РНК-полімераза II) транскрибує гени, що кодують білки; РНК-полімераза I бере участь у біосинтезі високомолекулярної рибосомної РНК, а РНК-полімераза III — у синтезі низькомолекулярних РНК (рибосомна 5S-РНК, тРНК і ін.). Процес транскрипції, початок якого визначається специфічною послідовністю ДНК (промотор), триває в напрямку 5'→3'. Закінчення транскрипції регламентується другою специфічною нуклеотидною послідовністю ДНК (сигнал термінації). РНК-полімерази як бактеріального, так і еукаріотичного походження мають приблизно однакову молекулярну масу — 500 тис., однак будова прокаріотичної РНК-полімерази простіша. До її складу входить п'ять поліпептидних ланцюгів, натомість як РНК-полімераза еукаріотичних клітин складається з 9–11 поліпептидних субодиниць.

На вміст РНК-полімераз у клітині впливає такий інтегральний показник функціонального стану клітини чи організму, як швидкість росту. Однак дані (Албертс Б., та ін., 1986) свідчать про те, що в одній клітині вищих еукаріот знаходиться приблизно 40 тис. молекул РНК-полімерази I і II; кількість молекул РНК-полімерази I приблизно удвічі менше. Середня довжина нуклеотидної послідовності, синтез якої здійснений за участю РНК-полімерази II на транскрипційній одиниці (ділянка ДНК, обмежена специфічним промоторним сигналом і сигналом закінчення транскрипції для РНК-полімерази II), складає в середньому 8 kb. Ця величина більш ніж у 6 разів перевищує той обсяг інформації, що необхідний для синтезу білкової молекули середньої довжини (400 амінокислотних залишків).

Із сумарної кількості РНК, що міститься в цитоплазмі клітини ссавців, 95–97 % — це рибосомна РНК, а близько 3–5 %, або 360 тис. молекул, складає іРНК, тобто одна молекула іРНК припадає на десяток рибосом.

Упакування знову синтезованих молекул РНК шляхом взаємодії з білками додають їм на мікрофотографіях подібності з ДНК-білковими комплексами у складі нуклеосом. Про функціональне значення цієї взаємодії немає переконливих даних.

Висловлюється припущення, що утворення комплексів РНК з ядерними білками необхідно для забезпечення процесингу первинних РНК-транскриптів і їх наступного переміщення в цитоплазму. Полінуклеотидні послідовності, швидкість росту яких складає 30 нуклеотидів за секунду й у біосинтезі яких бере участь РНК-полімераза II, утворюють фракцію гетерогенної ядерної РНК (гяРНК). Багато молекул цієї фракції, що знаходяться у ядрі, піддаються ковалентним модифікаціям, набуваючи при цьому функціональної спеціалізації. Процес ковалентних модифікацій включає добудовування (кепірування) 5'-кінця РНК, синтезованого РНК-полімеразою II, і приєднання до 3-ОН-кінця цієї ж молекули РНК за допомогою полі(А)-полімерази полінуклеотидного фрагмента, що складається з 100–200 залишків аденозинмонофосфату. Названі ковалентні модифікації, що приводять до утворення первинного РНК-транскрипта, очевидно, необхідні для нормального процесингу РНК і транспорту зрілих молекул іРНК із ядра в цитоплазму. Приблизно через 30 хв первинні транскрипти РНК-полімерази II виявляються в цитоплазмі. Їхня загальна кількість складає близько 5 % тієї маси РНК, що входила у фракцію гяРНК. Решта 95 % первинних транскриптів РНК-полімерази II приблизно протягом години від моменту їхнього синтезу руйнуються у ядрі. При цьому розміри первинних транскриптів РНК зменшуються з 6–8 тис. нуклеотидних залишків (фракція гяРНК) до 1,5 тис. (цитоплазматична іРНК). Досягається це в ході процесингу РНК і перетворення її в зрілу іРНК за рахунок відщеплення інтронів (некодуючих послідовностей) розміром від 0,1 до 10 kb, кількість яких може досягати кількох десятків (понад 50 у гені α -ланцюга прокологена). Фрагменти РНК, що залишилися після видалення інтронних послідовностей, з'єднуються між собою у стик (сплайсинг) і у вигляді зрілих іРНК, що складає 1–2 % нуклеотидних послідовностей геному, транспортуються в цитоплазму і транслюються. РНК-транскрипти прокаріот транслюються в тому вигляді, у якому вони синтезуються (рис. 3.6).

Висловлюється думка про можливу участь малих ядерних рибонуклеопротеїнових часток (мяРНП) у механізмі відщеплення інтронних послідовностей і сплайсингу РНК. Важливо

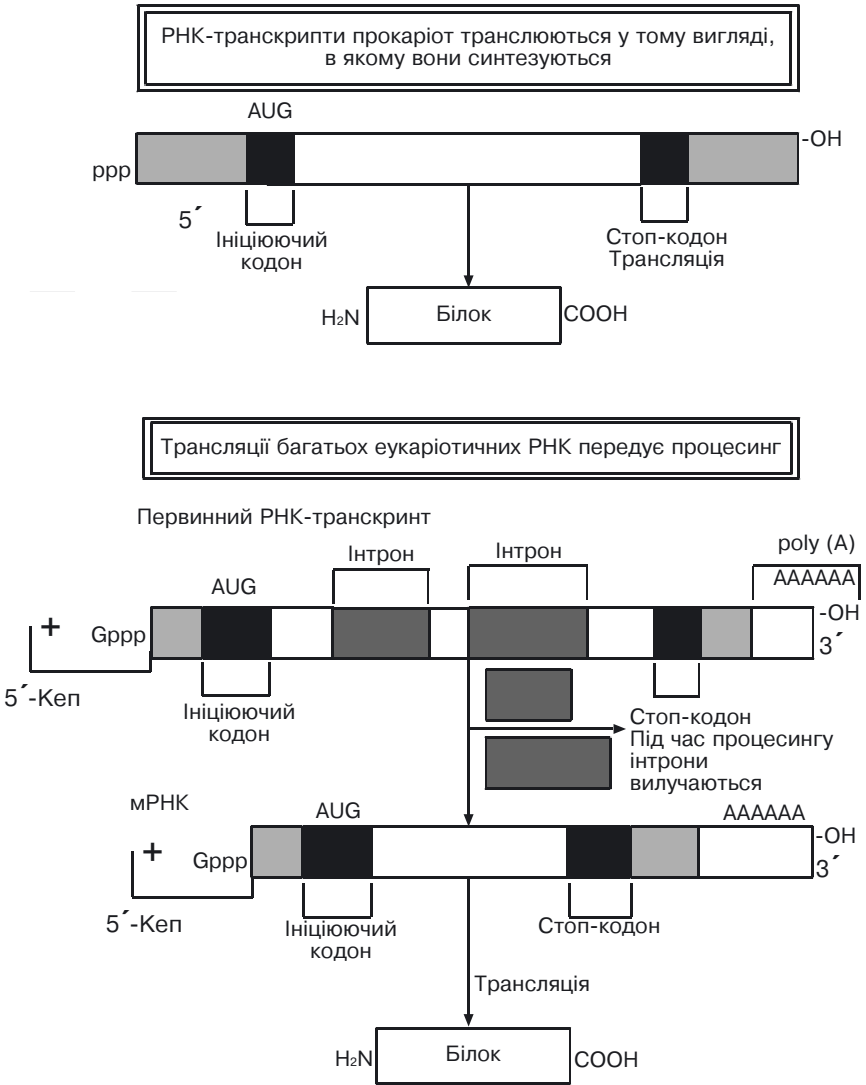


Рис. 3.6. Первинна структура прокариотичних і еукаріотичних РНК транскриптів (за Албертс Б. та ін., 1986)

дотримуватися оптимального співвідношення між конкретними генними продуктами для забезпечення визначеного рівня метаболічної активності. Так, деякі білки (гемоглобін еритроцитів, міоглобін м'язових клітин), що містяться в клітині у великій кількості, кодується генами, представленими в гаплоїдному геномі поодинокими екземплярами. Однак за рахунок трансляції, коли за участі однієї молекули іРНК протягом 1 хв утвориться близько десяти молекул білка, а протягом одного клітинного циклу більше 10^4 білкових молекул, досягається високий рівень гемоглобіну і міоглобіну в спеціалізованій клітині. В іншому випадку кінцевим продуктом генів є рибосомні і транспортні (рРНК і тРНК) НК, потреба в яких досить висока (за один обіг клітинного циклу необхідно синтезувати близько 10^7 молекул кожної з чотирьох типів рибосомних РНК—28S, 18S, 5,8S і 5S, яких би вистачило для збірки 10^7 рибосом). Вихід з цього положення досягається за рахунок кількості копій генів, що кодують відповідні рРНК і тРНК (у гаплоїдних клітинах людини до 200 копій генів рРНК, у жаби *Xenopus* — близько 600).

Розташовані гени у вигляді тандемно повторюваних дезоксирибонуклеотидних послідовностей, розділених ділянками (спейсерами), що не транскрибуються. Первинними транскриптами РНК-полімерази I при транскрибуванні генів рРНК є 45S-РНК (13 kb), з яких утворюється по одному примірнику молекул 28S-РНК (близько 5 kb), 18S-РНК (2 kb) і 5,8S-РНК (0,16 kb), що використовуються при збірці рибосоми, а певна кількість маси первинного транскрипту РНК-полімерази I (близько 6 kb) розщеплюється у ядрі. Місцем утворення рибосом є ядерце. Однак після виходу з ядра в цитоплазму процес дозрівання рибосом продовжується. РНК-полімеразою III транскрибуються кластери тандемно повторюваних генів 5S-РНК, а також гени різних тРНК (Албертс Б. і ін., 1985).

3.2. БІОСИНТЕЗ БІЛКА І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ

3.2.1. Генетичний код

Про те, що ДНК є генетичним матеріалом, стало відомо завдяки дослідженням Ейвері О.Т. та співробітників (1944), що викликали трансформацію бактерій очищеними екстрактами

ДНК пневмококів, а також роботами Херші А.Д. і Чейза М., які дослідили, що при зараженні бактеріальної клітини усередину проникає тільки ДНК бактеріофага, а його білкова оболонка залишається зовні. Зусиллями вчених (біохіміків, біофізиків, генетиків, хіміків і ін.) на початку 50-х років ХХ ст. була розшифрована просторова структура ДНК; хімічний склад цих макромолекул був визначений трохи раніше. Приблизно в цей же час вдалося визначити послідовність амінокислот у білку інсуліні, що складається тільки з 51 амінокислотного залишку. Таким чином, було переконливо доведено, що ДНК — це довгий нерозгалужений полімер, який складається з повторюваних у різній послідовності чотирьох мономерних структур — дезоксирибонуклеотидів, азотисті основи яких представлені аденіном (А), цитозином (С), гуаніном (G) і тиміном (Т). Мононуклеотиди з'єднані між собою ковалентними фосфодієфірними зв'язками, що йдуть від 5'-атома вуглецю одного залишку дезоксирибози до 3'-атому вуглецю наступного пентозного залишку і утворюють ланцюг — лінійну послідовність.

Методом рентгеноструктурного аналізу було встановлено, що ДНК має форму спіралі, яка складається з двох ланцюгів, розташованих таким чином, що азотисті основи виявляються усередині подвійної спіралі (сходинки кручених сходів), а дезоксирибозофосфатний каркас виявляється зовні (поручні цієї драбини). Оптимальне упакування лінійних послідовностей мономерів у полінуклеотидній структурі подвійної спіралі досягається за рахунок взаємодії однієї великої пуринової основи (аденіну чи гуаніну), кожна з яких утворена шляхом конденсації шестичленного і п'ятичленного гетероциклів, з меншою за розміром піримідиною основою (тиміном чи цитозином), які є шестичленими гетероциклами.

Результати модельних дослідів показали, що між гуаніном (G) і цитозином (С), а також між аденіном (А) і тиміном (Т) утворюється більше ефективних водневих зв'язків, чим за будь-яких інших сполучень нуклеотидів. Комплементарне спарювання А з Т і G із С в подвійній спіралі ДНК пояснило раніше отримані результати біохімічних досліджень ДНК про кількісну рівність А з Т і G із С, тобто співвідношення між азотистими основами в наведених парах у всіх досліджених ДНК складало 1:1.

У результаті біохімічного аналізу білків, що є продуктами мутантних генів, було показано, що послідовність чотирьох мономерних структур (аденіну, гуаніну, тиміну і цитозину) у ДНК і двадцятьох амінокислотах у білках колінеарна, тобто послідовність нуклеотидів у ділянці ДНК, що кодує білок, відповідає послідовності амінокислот у цьому білку. Отже, такий стан справ порушив питання, яке стало головним у молекулярній біології, про механізм такого біохімічно складного перетворення, як переведення послідовності нуклеотидів ДНК у послідовності амінокислот білка. Потік інформації від ДНК до білка символічно можна подати так:



Подана схема привернула увагу вчених і надалі сприяла стрімкому розвитку біохімічної генетики. Синтез молекул РНК називається транскрипцією ДНК; утворена на матриці ДНК на одному з її ланцюгів, РНК-копія містить у собі увесь обсяг інформації цієї ділянки ДНК; РНК зберігає здатність до утворення водневих зв'язків між комплементарними основами, тому що урацил, присутній у РНК замість тиміну, спарюється з аденіном так само, як і тимін. Натомість транскрипція відрізняється від реплікації. РНК-копія після завершення її синтезу звільняється від ДНК-матриці, слідом за чим відбувається відновлення вихідної подвійної спіралі ДНК; знову синтезовані молекули РНК мають одноланцюгову структуру, вона коротше ДНК і відповідає довжині тієї ділянки ДНК, якої достатньо для кодування одного чи декількох білків. Одні ділянки ДНК (гени) використовуються для синтезу РНК тисячі разів, тоді як інші не транскрибуються зовсім.

У клітинах еукаріот багато з тих молекул РНК, що утворилися під час транскрипції, перш ніж перетворитися на інформаційну РНК (іРНК) і потрапити в цитоплазму, піддаються значним хімічним змінам. У свою чергу, у цитоплазмі на кожній молекулі іРНК можуть синтезуватися тисячі копій відповідного поліпептидного ланцюга. Якщо при цьому врахувати, що швидкість, з якою проходить процес білкового синтезу, надзвичайно висока (поліпептидний ланцюг, що складається зі ста аміноки-

слотних залишків, у клітині кишкової палички створюється протягом 5 с), то інформація, що міститься у невеликій ділянці ДНК, здатна реалізуватися у вигляді великої кількості певного білка. Так, на матриці одного гена, що кодує фіброїн, відбувається синтез 10^4 молекул іРНК, на кожній з яких одержується 10^5 молекул фіброїну, що є основним компонентом шовку. У цілому за чотири доби одна клітина шовкосинтезуючої залози виробляє 10^9 молекул фіброїну (Албертс Б. і ін., 1986).

Правила переведення послідовності нуклеотидів, що входять у полінуклеотидну структуру ДНК, в амінокислотну послідовність білків (генетичний код) були розшифровані на початку 60-х років ХХ ст. Ніренбергом М., Маттеї Г., Ледером Ф. та іншими дослідниками. У більш ранніх генетичних експериментах було показане кодування амінокислот триплетами нуклеотидів (кодонами). У цьому випадку з чотирьох азотистих основ (А, Т, G, С) можна скласти 64 (4^3) різні триплетні комбінації, яких цілком достатньо для кодування 20 амінокислот. Якщо ж з цього набору скласти сполучення по два нуклеотиди (дублетний код), то цієї кількості явно бракує для кодування всього набору амінокислот. Інкубацією у пробірках суміші, що складається з різних синтетичних полірибонуклеотидів, екстракту з кишкової палички, двадцяти амінокислот, з яких тільки одна мала радіоактивну мітку, вдалося установити весь набір триплетів для кодування усіх амінокислот. Крім того, за допомогою тринуклеотидів з відомою послідовністю азотистих основ була розшифрована нуклеотидна послідовність у всіх кодонах, що обумовлює зв'язування різних аміноацил-тРНК.

Варто також відзначити роботи Корани Х.Г., який запропонував метод хімічного синтезу полі- та олігонуклеотидів, і Холлі Р.У., що розшифрував структуру тРНК з антиковою ділянкою.

Донедавна наявний фактичний матеріал свідчив про універсальність генетичного коду, тобто у всіх організмах — вірусах, прокариотах і еукаріотах ті самі нуклеотидні триплети кодували однакові амінокислоти. В останні роки при вивченні процесу біосинтезу білка в мітохондріях були виявлені відхилення від універсального коду (табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

Невідповідність генетичного коду мітохондрій універсальному коду (за Бохінські Р., 1987)

Кодони	УГА	АУА	АГУ	АГГ	АУУ
Універсальний код	Термінація	Іле	Арг	Арг	Іле
Мітохондріальний код	Три	Мет і ініціація	Термінація	Термінація	Іле і, можливо, ініціація

Для генетичного коду характерна ще його виродженість; у даному випадку це означає, що амінокислоті відповідає більш ніж один кодон. Наприклад, аргініну, лейцину і серину відповідає по шість; гліцину, проліну, валіну, тирозину й аланіну — по чотири, а триптофану і метіоніну — по одному кодону. Внаслідок виродженості генетичного коду помилки, що виникають при реплікації і транскрипції в деяких випадках не супроводжуються перекручуванням генетичної інформації і порушенням експресії, що має біологічне значення. В усіх випадках дво-, три- і чотириразової виродженості зміна відбувається тільки в третьому нуклеотиді триплету. Так, якби аланін кодувався тільки одним триплетом ГЦУ, то будь-яка зміна нуклеотидної послідовності в ньому при реплікації або транскрипції неминуче супроводжувалася б заміною у відповідній поліпептидній структурі аланіну іншою амінокислотою з усіма наслідками, що з цього випливають. Однак завдяки чотириразовій виродженості тільки заміни, що стосуються перших двох нуклеотидів кодона, ведуть до зміни його значення. Специфічність кодонів визначається головним чином його першими двома нуклеотидами. Що стосується третього нуклеотида, який займає положення на 3'-кінці олігонуклеотидної структури, то його специфічність виражена слабше (Ленінджер А., 1985; Бохінські Р., 1987).

Точність синтезу поліпептидного ланцюга досягається за рахунок комплементарного розпізнавання азотистих основ 5'→3'-орієнтованої послідовності кодона іРНК, що має 3'→5'-напрямок послідовності азотистих основ антикодону тРНК.

Слід зазначити, що кількість каталізуючих реакцію активування амінокислот аміноацил-тРНК-синтетаз відповідає кількості різних видів амінокислот, з яких синтезуються білки; що стосується тРНК, то їхня кількість як мінімум повинна досягати 32, тому що деякі амінокислоти здатні взаємодіяти з двома, а то й з трьома різними тРНК, які, у свою чергу, пізнають і зв'язують один, два чи навіть три кодони іРНК. Кодон-антикодонове пізнавання (кодон розташовується на іРНК і має 5'→3'-орієнтацію, антикодон — на тРНК і орієнтований у напрямку 3'→5') передбачає відхилення від класичної взаємодії й утворення водневих зв'язків між парами азотистих основ А — Т, G — C і А — U у ДНК і РНК. Це відхилення сформульоване Кріком Ф. у гіпотезі коливань, біологічний зміст якої має багато спільного з явищем виродженості генетичного коду. Гіпотеза коливань зводиться до здатності третьої азотистої основи, розташованої з боку 5'-кінця антикодону (тРНК), змінювати своє просторове положення, натомість як дві перші основи, що знаходяться в 3'-кінці антикодону, фіксовані більш жорстко. Зміна просторової орієнтації, що знаходиться на 5'-кінці антикодону азотистої основи обумовлює його здатність до утворення не відповідних класичним (А — Т, G — C і А — U) взаємодій між парами основ. Установлено, що третім від 3'-кінця антикодону може бути U, G чи I (рибонуклеозид інозин, у якому азотистою основою виступає гіпоксантин, що утворюється при відщепленні від аденіну його 6-аміногрупи). В табл. 3.4 подано можливі варіанти поєднання пар основ у зв'язку з явищем коливань.

Як видно з табл. 3.4, якщо в антикодоні в положенні коливання знаходиться гіпоксантин (у складі інозину), можливе розпізнавання й утворення водневих зв'язків трьох пар: I — A, I — C і I — U (але така комплементарна взаємодія виявляється більш слабкою порівняно з виникаючою взаємодією при утворенні звичайних пар G — C і A — U); у випадку перебування у позиції коливання G чи U кількість можливих сполучень обмежується двома: G — C, G — U і U — A, U — G. Нові комбінації пар основ не виникають, якщо такими, що коливаються, є аденін і цитозин. У цьому випадку відбувається утворення зв'язків за класичним принципом: A — U; C — G (рис. 3.7).

Таблиця 3.4.
Можливі поєднання пар основ між 5'-кінцем антикодону (tРНК) і 3'-кінцем кодону (іРНК), визначені гіпотезою коливань (за Бахінські Р., 1987)

Основа на 5'-кінці антикодону (tРНК)	Основа на 3'-кінці кодону (іРНК)
I	A, C або U
G	C або U
U	A або G
A*	U
C*	G

* Гіпотеза не передбачає нових комбінацій, якщо ці основи знаходяться в антикодоні.

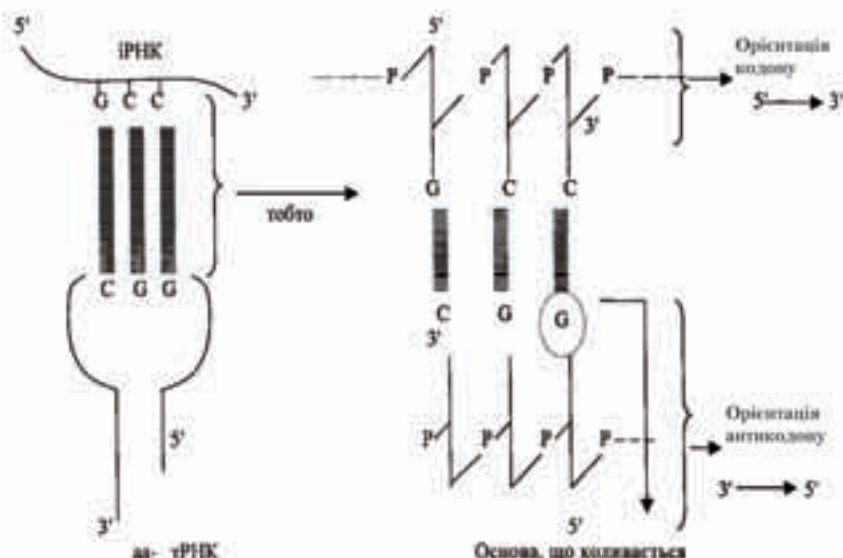


Рис. 3.7. Схема кодон-антикодонних взаємодій у світлі гіпотези коливань (за Бахінські Р., 1987)

Утворення слабких водневих зв'язків при кодон-антикодонному дізнаванні можна показати на прикладі однієї з аргіні-

нових тРНК, антикодон якої (5') I – C – G (3') здатний взаємодіяти з трьома різними аргініновими кодонами:

Кодон (5')C – G – A(3') (5')C – G – U(3') (5')C – G – C(3')



Антикодон (3')G C I(5') (3')G C I(5') (3')G C I(5')

Дві перших основи кодонів (C – G) утворюють міцні (позначені трьома рисками) уотсон-кріковські пари з відповідними азотистими основами антикодону. Азотисті основи, що знаходяться у третьому положенні, (A, U, C) аргінінових кодонів утворюють слабкі водневі зв'язки (дві риси) із залишком інозину (I) в антикодоні. На підставі цього й інших прикладів кодон-антикодонних взаємодій Крік Ф. дійшов висновку, що основи більшості кодонів, які знаходяться у третьому положенні, мають деякий ступінь свободи при утворенні пари з відповідною азотистою основою антикодонів, тобто, за термінологією Кріка Ф., основи, що коливаються. Біологічний зміст явища полягає в тому, що воно дозволяє звести до мінімуму виникаючі помилки. Завдяки неміцності зв'язку, що утвориться між основою, яка коливається, відповідною основою антикодону, тРНК легше звільняється з комплексу іРНК у процесі білкового синтезу. У випадку залучення в сильну уотсон-кріковську кодон-антикодонну взаємодію усіх трьох пар основ міцність зв'язку стала б моментом, що лімітує швидкість білкового синтезу через уповільнення процесу вивільнення тРНК із комплексу з іРНК (Ленінджер А., 1985; Бохинські Р., 1987).

3.2.2. Етапи біосинтезу білка

У синтезі білка беруть участь близько трьохсот різних макромолекул, представлених у клітинах еукаріот більш ніж 70-ма рибосомними білками, 20-ма ферментами активації амінокислот і більш ніж десятьма допоміжними ферментами, майже 100 ферментами, що беруть участь у процесі дозрівання білків (процесингу), а також транспортними і рибосомними РНК у кількості, що перевищує сім десятків. Сьогоднішнім знанням про механізм синтезу білка передували відкриття, зроблені на початку

50-х років XX ст. колективом під керівництвом П. Замечника: білкові молекули утворюються з амінокислот у фракції рибонуклеопротейдних часток, що знаходяться в цитоплазмі (рибосомах). У 1957 р. Замечник П. і Хогланд М. дослідили, що активація амінокислот і їхнє приєднання до молекули тРНК — ферментативний процес, у якому беруть участь специфічні аміноацил-тРНК-синтетаз. Крім того, Крік Ф. обґрунтував роль тРНК у цьому процесі: одним кінцем вона з'єднується з карбоксильною групою активованої амінокислоти, а іншою ділянкою (антикодоном) — із триплетною нуклеотидною послідовністю іРНК, що кодує відповідну амінокислоту. Складний процес біосинтезу білка можна розглядати поетапно (табл. 3.5).

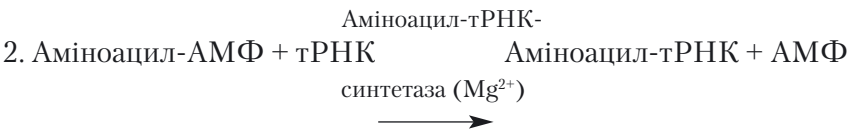
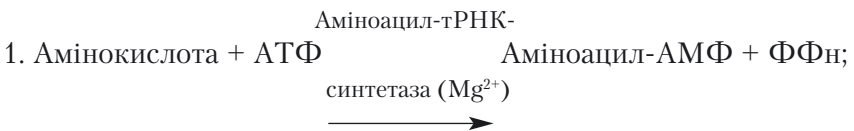
Таблиця 3.5.

Компоненти, що беруть участь на різних етапах біосинтезу білка в E.coli (за Ленінджером А., 1985)

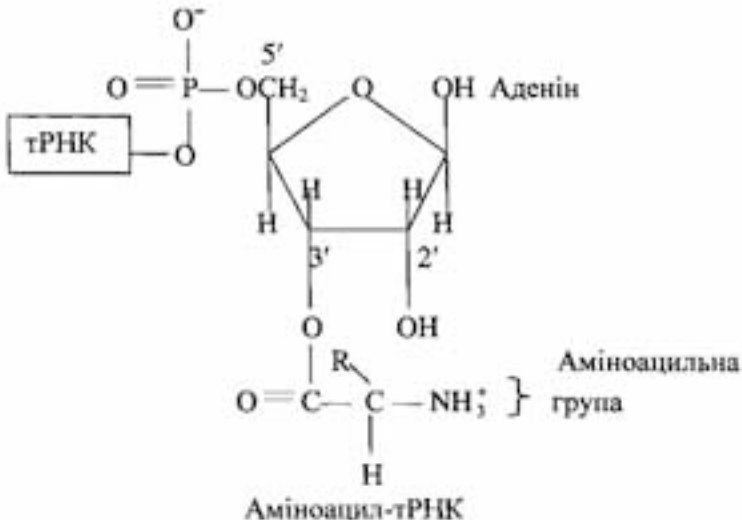
Етапи трансляції	Необхідні компоненти
Активація амінокислот	20 амінокислот, 20 аміноацил-тРНК-синтез, 20 або більше тРНК, АТФ, Mg^{2+}
Ініціація поліпептидного ланцюга	іРНК, N-формілметіоніл-тРНК, що ініціює кодон в іРНК (AUG), 30S-рибосомна субчастина, 50S-рибосомна субчастина, ГТФ, Mg^{2+} , фактори ініціації (IF-1, IF-2, IF-3)
Елонгація	70S-рибосома (ініціюючий комплекс), набір аміноацил-тРНК, відповідних кодонам іРНК, Mg^{2+} , фактори елонгації (T_u , T_s , I G), ГТФ, пептидилтрансфераза
Термінація	АТФ, термінуючий кодон іРНК, фактори звільнення поліпептида (R_1 , R_2 , I S)
Згорання і процесинг	Специфічні ферменти і кофактори

Активація амінокислот. На першому етапі трансляції, що проходить у всіх типах клітин у цитозолі, здійснюється АТФ-залежне перетворення амінокислот на аміноацил-тРНК. Реакція двостадійна: 1. з амінокислоти й АТФ утворюється аміноациладенілат — активована сполука, що являє собою змішаний ангідрид, у якому карбоксильна група амінокислоти з'єднана з фосфатною групою аденолової кислоти (АМФ); 2. аміноацильна група (залишок амінокислоти) аміноациладе-

нілату (аміноацил-АМФ) переноситься на молекулу відповідної тРНК з утворенням аміноацил-тРНК — активованої проміжної сполуки, що бере участь у синтезі білка. Процес активації амінокислот і їхнє наступне приєднання до тРНК каталізуються специфічними аміноацил-тРНК-синтетазами, що називаються ще активуючими ферментами. Кожний з ферментів строго специфічний як стосовно тРНК, так і щодо відповідної їй амінокислоти. Двостадійний процес активації амінокислот здійснюється в каталітичному центрі ферменту:



В усіх випадках на другій стадії активована амінокислота приєднується до залишку аденілової кислоти або аденінового нуклеотиду (А) у триплеті ССА на 3'-кінці молекули тРНК.



Перенесення аміноацильної групи на 2'- чи 3'-ОН-групу рибозного залишку аденінового нуклеотиду ССА-послідовності на 3'-кінці тРНК залежить від амінокислоти й аміноацил-тРНК-синтетази, що каталізує утворення аміноацил-тРНК. Активована амінокислота може дуже швидко переміщатися з 2'- у 3'-положення і назад. Стадія активації і перенесення певної амінокислоти каталізується однією і тією самою аміноацил-тРНК-синтетазою. На активацію кожної амінокислоти витрачається енергія двох високоенергетичних фосфатних зв'язків, що робить сумарну реакцію активації амінокислот практично незворотною. У ході перетворення амінокислот в аміноацил-тРНК-комплекси підвищується реакційна здатність мономерних компонентів, що використовуються у реакції полімеризації; при взаємодії амінокислоти зі специфічною тРНК здійснюється добір необхідних для синтезу поліпептидного ланцюга відповідних амінокислот. Позбавлені спроможності впізнавати коди в іРНК, амінокислоти набувають цієї функції у складі аміноацил-тРНК; одночасно активовані карбоксильні групи амінокислот стають реакційно здатними й утворюють пептидні зв'язки ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$) з аміногрупами сусідніх амінокислот.

Молекули тРНК відіграють роль кінцевих адапторів, що переводять інформацію, укладену в нуклеотидній послідовності іРНК, на мову білка. Не менше значення у процесі декодування має і другий набір адапторів — молекул аміноацил-тРНК-синтетаз.

Таким чином, генетичний код розшифровується за допомогою двох взаємозалежних наборів адапторів, що здійснюють високоспецифічну функцію, у результаті чого кожна амінокислота може зайняти місце, яке визначене її триплетною нуклеотидною послідовністю у молекулі іРНК, тобто своїм кодоном.

На етапах ініціації поліпептидного ланцюга, елонгації і термінації для здійснення реакцій білкового синтезу необхідні рибосоми.

Рибосома. Найкраще вивчені рибосоми *E.coli*. Їхня кількість у прокариотичній клітині перевищує $1,5 \cdot 10^4$, діаметр —

18–20 нм, маса коливається у межах 2500–2800 кДа, коефіцієнт седиментації — 70S. У рибосомах прокариот міститься 65 % рРНК і 35 % білка. Рибосоми становлять майже чверть сухої маси клітини. Рибосоми еукаріотичних клітин значно більші бактеріальних (діаметр — приблизно 21 нм, маса — майже 4000 кДа, коефіцієнт седиментації — 80S, співвідношення між білком і рРНК дорівнює приблизно 1:1, а їхня кількість у еукаріотичній клітині — $\sim 10^5$). Синтез білків, що входять до складу рибосомної структури, відбувається в цитоплазмі, самозборка рибосомних субодиноць — у ядерці за рахунок взаємодії молекул білків і рРНК за участю іонів магнію. Рибосоми прокариот і еукаріот складаються з двох субчастин неоднакового розміру. У рибосом прокариот коефіцієнт седиментації більшої субчастини 50S, а меншої — 30S, їхня маса — відповідно 1800 і 1000 кДа; у рибосом еукаріот коефіцієнт седиментації більшої субчастини знаходиться на рівні 60S, меншої — 40S.

Велика субчастина (50S) прокариотичної рибосоми містить одну молекулу 23S-рРНК (~ 3200 нуклеотидів), одну молекулу 5S-рРНК (~ 120 нуклеотидів) і 34 білка; менша субчастина (30S) — 21 білок і одну молекулу 16S-рРНК.

Подібно до бактеріальної рибосоми, рибосома еукаріотичної клітини дисоціює на велику (60S) і малу (40S) субчастини, що, у свою чергу, можуть дисоціювати на складові їхніх білків і РНК. До складу більшої субчастини входять три молекули РНК (28S, 7S і 5S) і понад 40 різних рибосомних білків; мала субчастина містить одну молекулу 18S-рРНК і приблизно 33 різних рибосомних білків.

Білки великої і малої субчастин рибосоми прокариот мають нумерацію. У 50S-субчастині — від L1 до L34 (від англ. Large — велика), у 30S-субчастині — від S1 до S21 (від англ. Small — мала). Усі білки, що входять до складу рибосом *E. coli*, індивідуалізовані, у більшості з них встановлені амінокислотна послідовність, первинна структура, молекулярна маса, що коливається в межах 6,5–75 тис., визначені також нуклеотидні послідовності рРНК *E. coli*.

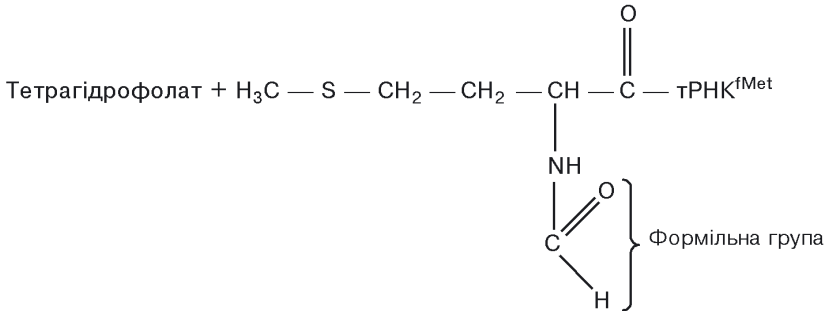
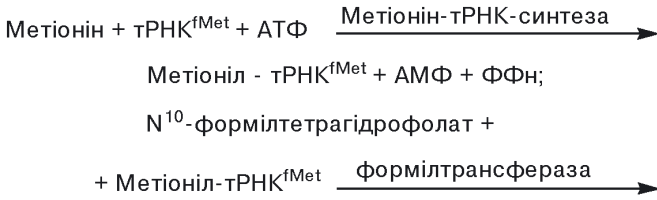
Усі рРНК і більшість білків еукаріотичних рибосом також виділені в чистому вигляді і вивчені. Рибосомні 30S- і 50S-субчастини при відповідних умовах можуть бути реконструйовані

у функціонально активні структури з набору індивідуальних компонентів (білків і рРНК), отриманих при дисоціації субчастин, шляхом самозбірки цих макромолекул; для мимовільного утворення 50S-субчастин необхідна присутність у системі в зібраному вигляді 30S-субчастини.

Висловлюється думка (*Ленинджер А., 1985*), що рРНК виконують роль каркасів для упорядкованого розташування рибосомних поліпептидів, ферментативні й інші специфічні функції яких поки що не встановлені для всіх білків. За даними рентгеноструктурного аналізу й електронної мікроскопії, субчастини в рибосомі розташовані несиметрично, мають неправильну геометричну форму і з'єднані один з одним таким чином, що між ними залишається борозна, через яку проходить молекула іРНК у процесі синтезу поліпептидного ланцюга, а також друга борозна, що утримує зростаючий поліпептидний ланцюг. У першій борозні розміщується 35 нуклеотидів РНК, а в другій — приблизно 30 амінокислот. Рибосоми мітохондрій і хлоропластів відрізняються від цитоплазматичних рибосом еукаріот; вони мають більшу подібність з 70S-частками прокариотичних організмів.

Синтез білків у мітохондріях, хлоропластах і бактеріях проходить за загальною схемою (*Ленинджер А., 1985; Страйер Л., 1985; Албертс Б. та ін., 1986*).

Ініціація поліпептидного ланцюга. Було встановлено, що в *E. coli* й інших прокариот N-кінцевою амінокислотою при збірці поліпептидного ланцюга завжди є залишок N-формільметіоніну. Цей та інші факти стали підставою для припущення про значення формільованого метіоніну як ініціатора в процесі синтезу поліпептидного ланцюга. Формільований метіонін одержується в результаті двох послідовних реакцій. При цьому варто вказати на існування двох тРНК: тРНК^{Met} і тРНК^{fMet}, що здійснюють акцепцію метіоніну, а також звернути увагу на те, що фермент формілтрансфераза (трансформілаза) не спроможний формільовати метіонін, що знаходиться у вільному стані. Однак і в комплексі з тРНК не завжди можливе формільовання залишку метіоніну. Ця реакція можлива тільки в тому випадку, коли тРНК виявляється специфічною тРНК^{fMet}.



$\text{N-формілметіоніл-тРНК}^{\text{fMet}}$, або $\text{fMet-тРНК}^{\text{fMet}}$.

Комплекс метіоніну з іншою тРНК — метіоніл-тРНК (тРНК^{Met}) не формілюється і використовується для включення метіоніну у внутрішні ділянки синтезованого поліпептидного ланцюга. Хоча первинна структура тРНК^{fMet} і тРНК^{Met} різна, загальним для них є наявність того самого антикодону UAC, завдяки чому обидві тРНК здатні взаємодіяти з кодоном AUG. Однак антикодоновий триплет комплексу фMet — тРНК^{fMet} взаємодіє з кодоном AUG тільки в тому випадку, якщо той розташований на початку кодуючої послідовності іРНК. Розташування кодону AUG усередині нуклеотидної послідовності іРНК передбачає взаємодію з ним неформільованого Met-тРНК^{Met}. Наявність N-формільної групи в залишку метіоніну в складі ініціаторного комплексу фMet-тРНК^{fMet} обумовлює взаємодію останнього з особливим місцем ініціації на рибосомі, з яким не вступає в реакцію ні Met-тРНК^{Met}, ні жодна інша аміноацил-тРНК; блокування аміногрупи метіоніну формільним залишком перешкоджає включенню такої амінокислоти у внутрішні ділянки поліпептидного ланцюга.

У поліпептидних ланцюгах, синтезованих у рибосомах еукаріотичних клітин, N-кінцевою амінокислотою завжди є

метіонін, що приєднується за допомогою спеціальної ініціюючої метіоніл-тРНК; у мітохондріях і хлоропластах еукаріот так само, як і в бактеріях, синтез білка починається з N-формілметіоніну, що підтверджує висловлену точку зору про походження цих субклітинних структур, які знаходяться в клітинах еукаріот, від бактерій.

На етапі ініціації поліпептидного ланцюга істотним моментом є тристадійний процес утворення ініціюючого комплексу (рис. 3.8). Спочатку в результаті взаємодії 30S-субчастини і фактора ініціації IF-3 утворюється структура, у якій білок IF-3 перешкоджає її асоціації з 50S-субчастиною. Приєднання до 30S-субчастини іРНК досягається за допомогою особливого ініціюючого сигналу, що являє собою багату пуриновими основами (A, G) послідовність, центр якої знаходиться на відстані приблизно 10 нуклеотидів від 5'-кінця ініціюючого кодона (5') AUG(3') іРНК, тож трансляція не може розпочатися безпосередньо на 5'-кінці іРНК. Перший трансльований кодон, як правило, розташовується на відстані майже 25 нуклеотидів від 5'-кінця. Ініціюючий сигнал, представлений короткою ділянкою (6–10 нуклеотидів) іРНК, у результаті взаємодії з комплементарною послідовністю нуклеотидів, розмічених із 3'-кінця 16S-РНК 30S-субчастини, сприяє фіксуванню іРНК у потрібному для ініціації положенні. Завдяки цій взаємодії забезпечується правильне розташування ініціюючого кодону AUG на 30S-субчастині. Потім до комплексу, що складається із 30S-субчастини, фактора IF-3 і іРНК, приєднуються раніше зв'язані з формілметіоніл-тРНК^{fMet} білковий фактор ініціації IF-2 і ГТФ (2-а стадія). У результаті подальшого приєднання до 50S-рибосомної субчастини раніше виниклої макромолекулярної комплексної структури, що складається з 30S-субчастини, білкового фактора ініціації IF-3, іРНК, ГТФ, білкового фактора ініціації IF-2, N-формілметіоніл-тРНК^{fMet}, виникає функціонально активна 70S-рибосома. При її утворенні на стадії приєднання 50S-субчастини молекула ГТФ, яка зв'язана з IF-2, гідролізується до ГДФ і Фн, які разом з IF-3 і IF-2 утворюють комплекс. Таким чином, точне місце початку синтезу білка (кодон AUG, генетичний сигнал ініціації) визначається в результаті спарювання лідерної послідовності азотистих основ з боку

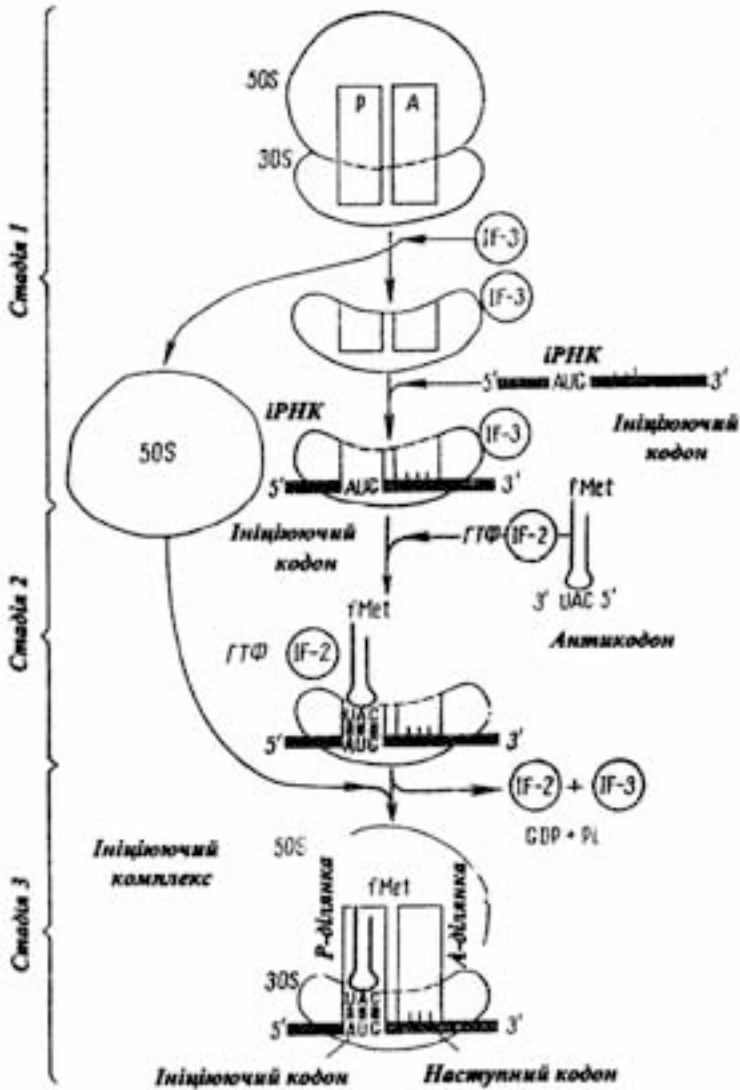


Рис. 3.8. Схема тристадійного процесу утворення ініціуючого комплексу (за Ленінджером А., 1985)

5'-кінця кодона AUG іРНК із нуклеотидною послідовністю, що розташовується з 3'-кінця 16S-рРНК 30S-субчастини, а також комплементарною взаємодією кодона AUG іРНК з антикодоном (3')UAC(5') N-формілметіоніл-тРНК^{fMet}.

Для надання правильного положення у функціонально активному ініціюючому 70S-комплексі N-формілметіоніл-тРНК^{fMet} останній приєднується до пептидильної ділянки (Р-ділянки) 70S-комплексу; друга ділянка для приєднання аміноацил-тРНК називається аміноацильною (А-ділянка). Утворюються вони за рахунок сполучення специфічних ділянок 30S- і 50S-субодиниць. У такому стані (Р-ділянка зайнята ініціюючою фMet-тРНК^{fMet}, А-ділянка — вільна) ініціюючий комплекс готовий до продовження процесу трансляції.

Елонгація. Елонгація синтезу поліпептидного ланцюга є циклічним процесом, що включає три стадії. Цикл починається взаємодією ГТФ з одним із трьох факторів елонгації — Tu, що є розчинними білками цитоплазми. Аміноацил-тРНК, антикодон якої комплементарний наступному за ініціюючим кодоном у напрямку 5'–3' іРНК, взаємодіючи з ГТФ-Tu утворює потрійний комплекс аміноацил-тРНК — Tu — ГТФ, що за допомогою активованого фактора елонгації (Tu — ГТФ) вводиться у вільну А-ділянку функціонально активної 70S-рибосоми і зв'язується з цією ділянкою. Правильність положення аміноацил-тРНК контролюється двічі (рис. 3.9). З одного боку, це комплементарна кодон-антикодонова взаємодія, з іншого — специфічний

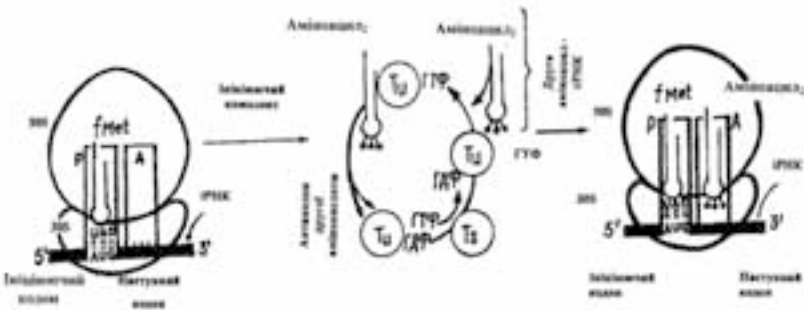


Рис. 3.9. *Схема першої стадії елонгації*
(за Ленінджером А., 1985)

зв'язок між ділянками молекул тРНК і рРНК. Тільки при дотриманні цієї умови процес елонгації може продовжитися.

Наступна реакція — гідроліз ГТФ і елімінація з 70S-рибосоми Ту — ГДФ-комплексу. Залишок ГДФ з останнього витісняється іншим фактором елонгації Тс. Новий комплекс Ту-Тс розпадається під впливом ГТФ, а ГТФ-Ту, що утворюється, знову доставляє комплементарну аміноацил-тРНК в А-ділянку, що звільнилася, 70S-рибосоми. ГТФ-Ту не вступає в реакцію з фМет-тРНК^{fMet}, у зв'язку з чим вона не потрапляє в А-ділянку і внутрішні кодони AUG не зчитуються з ініціюючої тРНК. До моменту початку другої стадії циклу елонгації Р-ділянка виявляється зайнята фМет-тРНК^{fMet}, а в А-ділянці розташовується відповідна аміноацил-тРНК. Усе підготовлено для вступу залишків амінокислот у реакцію й утворення пептидного зв'язку (рис. 3.10).

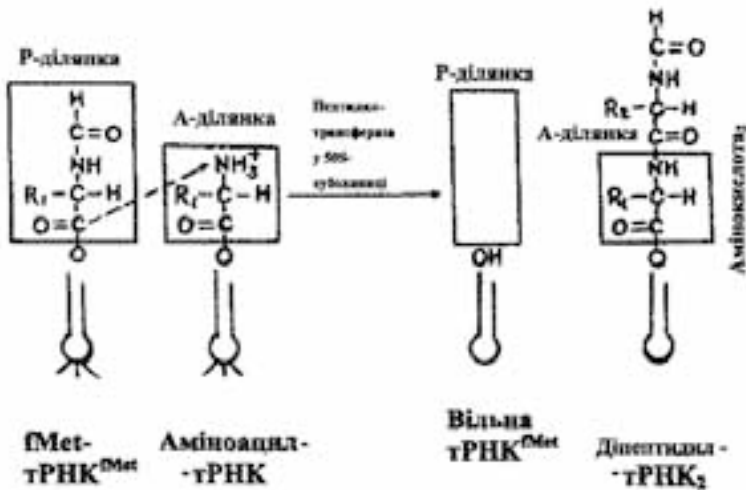


Рис. 3.10. Схеми утворення пептидного зв'язку
(за Ленінджером А., 1985)

Цю реакцію каталізує пептидилтрансфераза, що є одним з білків 50S-субодиниць, активність якої реалізується в присутності K^+ . Активованій залишок формілметіоніну, що знаходиться у складі фМет-тРНК^{fMet} і розташований у Р-ділянці,

переноситься на аміногрупу аміноацил-тРНК, що займає А-ділянку. Нова сполука, що виникла внаслідок цієї реакції (діпептидил-тРНК), включає залишки двох амінокислот, з'єднаних пептидним зв'язком, і розташовується в А-ділянці 70S-рибосоми; у Р-ділянці залишається звільнена від активованого амінокислотного залишку ініціююча тРНК^{fMet}.

Третя стадія елонгації — транслокація — пов'язана з трьома переміщеннями (рис. 3.11). У зв'язку з переміщенням 70S-рибосоми на відстань в один кодон уздовж іРНК у напрямку її 3'-кінця; діпептидил-тРНК, що знаходиться в А-ділянці, переміщується в Р-ділянку, завдяки чому вільна тРНК відокремлюється від Р-ділянки й надходить до цитоплазми. Таким чином, у пептидильній ділянці виявляється діпептидил-тРНК, а аміноацильна ділянка знову підготовлена для зв'язування чергової аміноацил-тРНК, антикодон якої комплементарний наступному кодону іРНК, що знаходиться в зоні аміноацильної ділянки 70S-рибосоми.

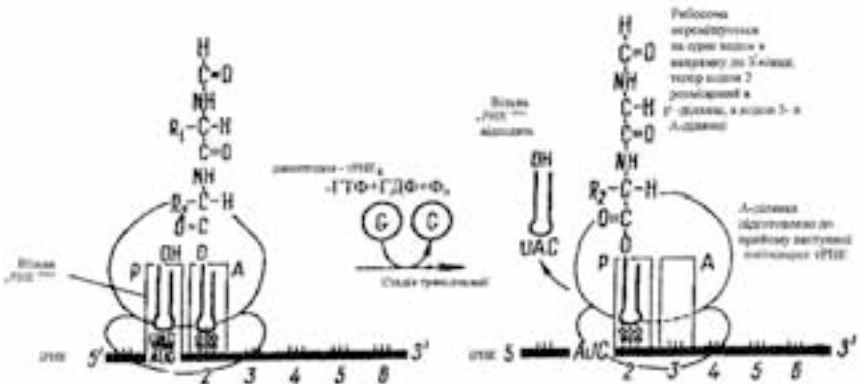


Рис. 3.11. Схеми транслокації
(за Ленінджером А., 1985)

Починається новий тристадійний цикл елонгації, у результаті завершення якого буде утворена трипептидил-тРНК. Переміщення рибосоми уздовж іРНК на один кодон називається

транслокацією. Пересування здійснюється за участю третього фактора елонгації G, чи транслокази, і енергії, що утвориться при гідролізі ще однієї молекули ГТФ. На утворення однопептидного зв'язку (приєднання однієї амінокислоти) витрачається енергія гідролізу двох молекул ГТФ.

Термінація. У синтезі поліпептидного ланцюга настає момент, коли А-ділянка рибосоми зайнята одним з кодонів UAA, UGA чи UAG. У цьому випадку кодон-антикодонової взаємодії не відбувається, тому що нормальні клітини не містять тРНК з антикодонами, комплементарними сигналам термінації. Термінуючі триплети не кодуєть амінокислот і називаються в зв'язку з цим безглуздими кодонами.

З високою специфічністю термінуючі триплетні послідовності іРНК вступають у взаємодію з білковими факторами звільнення R_1 , R_2 і S (рилізінг-факторами); перший з них розпізнає кодон UAA чи UAG, другий — UAA чи UGA. Взаємодія одного з рилізінг-факторів з термінуючим кодоном в місці розташування аміноацильної ділянки 70S-рибосоми активує пептидилтрансферазу і змінює її специфічність, у результаті чого настає гідролітичне відщеплення поліпептиду від поліпептидил-тРНК, акцепція активованим пептидилним залишком H_2O і вивільнення знову синтезованої білкової молекули, відділення від Р-ділянки, що звільнилася, тРНК, дисоціація 70S-рибосоми на 30S- і 50S-субодиниці і їхня підготовка до синтезу нової білкової молекули (Ленинджер А, 1985; Страйер Л., 1985).

На одній молекулі іРНК одночасно можуть знаходитися декілька функціонально активних рибосом; при цьому одна рибосома на іРНК займає місце, еквівалентне 80 нуклеотидам. Завдяки такій можливості ефективність використання іРНК значно збільшується. Кілька рибосом, що одночасно знаходяться на одній і тій самій іРНК, формують полірибосомну структуру чи полісому, у складі якої кожна з рибосом функціонує автономно і синтезує свій поліпептидний ланцюг.

Упаковка і процесинг поліпептидного ланцюга.

Первинна структура (послідовність амінокислот) є визначальним моментом у формуванні тривимірної структури, завдяки якій білок стає функціонально активним. Однак нерідко білкова молекула набуває біологічно активної конформації тільки в

результаті процесингу чи ковалентної (посттрансляційної) модифікації, що проходить у різних білків по-різному і включає реакції видалення чи приєднання атомних груп. Так, формільна група, що входить до складу N-кінцевого N-формілметіоніну, у білків бактеріального походження в ході процесингу деформілюється. Під дією особливих амінопептидаз відбувається гідролітичне відщеплення одного чи декількох N-кінцевих амінокислотних залишків, у зв'язку з чим у багатьох остаточно сформованих білках їх не вдається знайти. У процесі посттрансляційного дозрівання відщеплюються поліпептидні N-кінцеві лідерні послідовності, що виконують роль специфічних сигналів, за допомогою яких білок досягає місця свого призначення. Дуже часто N-кінець поліпептидного ланцюга піддається модифікаційним змінам ще тоді, коли синтез решти поліпептидного ланцюга продовжується.

З інших найбільш розповсюджених реакцій, за участю яких відбувається модифікація поліпептидної структури і тим самим здійснюється вплив на формування її остаточної конформації, варто назвати ацетилювання аміногрупи N-кінцевої амінокислоти, фосфорилування НО-груп залишків оксіамінокислот (серину, треоніну, тирозину), що призводить до збільшення негативного заряду відповідних білків, карбоксилювання залишків аспарагінової і глутамінової кислот, метилювання залишків лізину і карбоксильних груп деяких залишків глутамінової кислоти, приєднання бічних вуглеводних ланцюгів, додавання простетичних груп, а також утворення дисульфідних містків.

3.2.3. Регуляція синтезу білка

Здатність бактерій швидко пристосовуватися до умов, що змінюються, і ощадливо використовувати різноманітні поживні речовини досягається контролем білкового синтезу на рівні транскрипції за рахунок зміни швидкості утворення іРНК. Інший шлях регуляції швидкості протеїносинтезу здійснюється на рівні трансляції. Механізм його вивчений недостатньо і для бактерій він має другорядне значення.

У клітинах еукаріот провідну роль відіграє контроль біосинтезу білка на рівні трансляції. За рахунок регуляції швидкості синтезу ферментів у клітині створюється таке співвідношен-

ня їхніх концентрацій, яке забезпечує оптимальний рівень метаболізму, адекватний умовам навколишнього середовища. При цьому варто враховувати ту обставину, що деякі ферменти незалежно від напруги метаболізму містяться в клітинах бактерій у постійній концентрації (конститутивні ферменти); кількість інших, залежно від умов, змінюється в тисячу і більше разів (індуковані ферменти).

У першому випадку як приклад можна назвати ферменти гліколізу, у другому — β -галактозидазу, що здійснює гідролітичне розщеплення лактози на глюкозу і галактозу.

Молекулярні і генетичні механізми регуляції швидкості білкового синтезу в прокариот були розроблені Жакобом Ф. та Моно Ж. (1961–1964) і сформульовані в гіпотезі оперона, що одержала повне підтвердження в результаті прямих біохімічних досліджень. Було виявлено, що клітини *E.coli* у середовищі, що містить замість глюкози лактозу, починають синтезувати у великих кількостях, які перевищують первинний вміст більш ніж у 10^3 разів, β -галактозидазу і два інших зв'язаних з нею функціонально ферменти — β -галактозидпермеазу і білок А. Лактоза в даному процесі виступає як індуктор, а сам процес має назву координованої індукції.

Для пояснення механізму дії індуктора Жакоб Ф. Та Моно Ж. запропонували схему (рис. 3.12). На ній три структурних гени (*lac*-гени) *z*, *y* і *a* та ланцюг ДНК, що їм передує, включає дві регуляторні ділянки — промотор (*p*) і оператор (*o*), а також регуляторний ген *i*, який кодує білок-репресор, розташовані поруч. Ці гени були названі опероном. Крім *lac*-оперона у бактерій ідентифіковані й інші, переважаючи за складністю лактозний. Так, *his*-оперон кодує дев'ять ферментів, необхідних для біосинтезу амінокислоти гістидину.

Транскрипція *lac*-оперона може індукуватися лактозою. Індуктор взаємодіє з другим специфічним центром білка-репресора (першим центром білок-репресор зв'язується з опероном). Утворення індуктор-репресорного комплексу призводить до зниження спорідненості репресора до оператора і відділення комплексу від оператора. Звільнена від білкової репресії ділянка ДНК (оперон) стає доступною для РНК-полімерази, за допомогою якої здійснюється транскрипція *z*-, *y*- і *a*-генів, потім

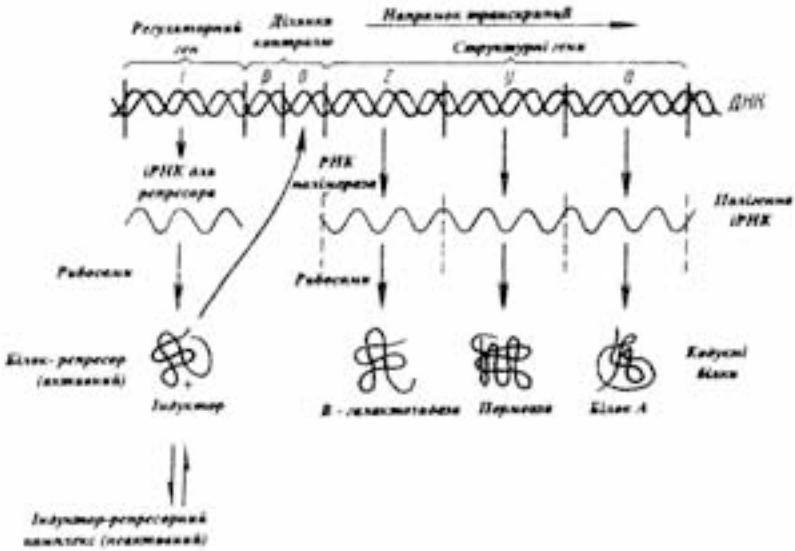


Рис. 3.12. Схема регуляції синтезу білка
(за Жакобом Ф. та Моно Ж., 1964)

відбувається трансляція іРНК, завдяки чому з'являється доступ до нового джерела вуглецю й енергії — лактози. Заміна лактози в традиційному поживному середовищі для *E. coli* субстратом D-глюкозою, що легко метаболізується, супроводжується дисоціацією комплексу індуктор-репресор, що веде до відновлення в останнього властивої йому високої спорідненості до взаємодії з оператором та інгібування процесу транскрипції структурних генів *lac*-оперону.

Молекулярна маса виділеного Гілбертом У. та Мюллер-Хіллом В. (1967) *lac*-репресора — майже 150 тис., а в клітині *E. coli*, як правило, знаходиться лише близько 10 молекул цього білка. До складу деяких оперонів входить ще промотор, що включає 85 пар нуклеотидних залишків; розташований він між інгібіторною ділянкою (ген *i*) та оператором. Частина промотора, що розташована ближче до оператора (близько 40 пар залишків нуклеотидів), є місцем зв'язування РНК-полімерази. Функціональна роль нуклеотидної послідовності, що знахо-

диться з боку і-гена (близько 38 пар залишків азотистих основ), полягає в зв'язуванні особливого білка, що активує катаболітний ген, — БАК, чи САР (від англ. catabolite protein activator). Під контролем САР-ділянки знаходиться місце зв'язування РНК-полімерази. Коли в середовищі відсутня глюкоза, білок САР і циклічний АМФ, (цАМФ чи сАМР) утворюють комплекс, який при з'єднанні із САР-ділянкою ДНК, створює необхідні стеричні умови для надходження РНК-полімерази в ділянку первинного зв'язування і подальшого просування ферменту через зону вільного від інгібування оператора (індуктор-репресорний комплекс не здатний інгібувати оператор) до λ -генів і їх транскрипції.

Наявність у середовищі глюкози в кількості, що забезпечує потребу клітини, супроводжується зменшенням умісту сАМР; створюється перешкода для утворення САР–сАМР-комплексу, що не дозволяє РНК-полімеразі зв'язатися з оператором і розпочати транскрипцію структурних z -, y - і a -генів. Таким чином, сАМР виконує роль зонда, що чутливо реагує на наявність в середовищі глюкози. Концентрація сАМР залежить від відношення активностей аденілатциклази, яка каталізує реакцію утворення сАМР з АТФ, і фосфодіестерази, що здійснює гідроліз сАМР. Описаний механізм регуляції синтезу ферментів дозволяє клітинам прокариот підтримувати метаболізм на рівні, що забезпечує досягнення максимального ККД.



Контрольні питання

1. Носіями яких видів нуклеїнових кислот є усі живі організми?
2. Яка біологічна роль нуклеїнових кислот?
3. Хімічна будова нуклеїнових кислот.
4. Від чого залежить хімічний склад нуклеїнових кислот?
5. Хімічна будова пуринових основ.
6. Хімічна будова піримідинових основ.

7. Яка відмінність у будові ДНК і РНК?
8. Яка відмінність функцій ДНК і РНК?
9. Основна функція ДНК.
10. Які сполуки називаються нуклеотидами?
11. Хімічна будова нуклеозидів.
12. Назвіть типи РНК і їх функції.
13. Які рівні структурної організації мають нуклеїнові кислоти?
14. Чим визначається первинна структура нуклеїнових кислот?
15. Вторинна структура нуклеїнових кислот.
16. Що таке генетична карта людини?
17. Коли вперше було встановлено первинну структуру ДНК людини?
18. Що таке правило комплементарності?
19. Що зумовлює комплементарність основ фрагментів ДНК?
20. Коли і ким була запропонована вторинна структура ДНК?
21. Що таке вторинна структура ДНК?
22. Чим забезпечується стабільність біспіральної структури ДНК?
23. Які типи подвійної спіралі є у ДНК та РНК?
24. Чим відрізняються між собою різні ДНК?
25. Яку особливість має третинна структура нуклеїнових кислот?
26. Чим зумовлена третинна структура нуклеїнових кислот?
27. За участю яких ферментів відбувається суперспіралізація ДНК у еукаріот?
28. Назвіть білки, які беруть участь у суперспіралізації ДНК.
29. Які амінокислоти переважають у складі білків, що забезпечують суперспіралізацію ДНК?
30. Що таке нуклеосоми?
31. Способи укладання ДНК у просторі.
32. Чим зумовлюється укладання ДНК у просторі?
33. Яку інформацію містить спіраль ДНК?
34. Що таке нуклеофільні групи?
35. Які групи називаються електрофільними?
36. Як відбувається реплікація ДНК?
37. За участю яких ферментів відбувається реплікація ДНК?
38. Що є обов'язковою умовою реплікації ДНК?

39. Що таке реплікаційна вилка?
40. Що означає транскрипція РНК?
41. Які ферменти беруть участь у забезпеченні процесу транскрипції?
42. Що таке РНК-транскрипти?
43. Яка відмінність у трансляції прокаріотичних та еукаріотичних РНК-транскриптів?
44. Що називається генетичним кодом?
45. Яка особливість будови гена?
46. Коли і ким був розшифрований генетичний код?
47. Чи є генетичний код універсальним для всіх організмів?
48. За участю яких чинників відбувається проходження інформації від ДНК до білка?
49. Що таке кодон-антикодонове пізнавання і взаємодія?
50. Сутність гіпотези коливань.
51. Назвіть етапи біосинтезу білка.
52. Що таке активація амінокислот і місце її локалізації?
53. Які компоненти клітин беруть участь у біосинтезі білка?
54. Що таке адаптори?
55. Що таке рибосома?
56. Як відбувається ініціація поліпептидного ланцюга?
57. Що таке ініціюючий комплекс?
58. Стадії формування ініціюючого комплексу.
59. В чому полягає процес елонгації?
60. Що таке транслокація?
61. Що таке термінація?
62. Що таке процесинг поліпептидного ланцюга?
63. Як відбувається упаковка і процесинг поліпептидного ланцюга?
64. Назвіть основні чинники, що впливають на упаковку і процесинг поліпептидного ланцюга.
65. Назвіть шляхи регуляції синтезу білка.
66. Назвіть молекулярні і генетичні механізми регуляції швидкості білкового синтезу в прокаріот.
67. Яка роль індукторів і механізм їх дії?

КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

4.1. КУЛЬТУРА ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИН

Досягнуті молекулярною біологією і генетичною інженерією успіхи останнім часом значною мірою стали можливими завдяки застосуванню порівняно простих (а тому доступних широкому колу експериментаторів), відтворених і результативних методів, де як об'єкти дослідження широко використовуються бактерії, нижчі гриби і бактеріофаги. При цьому мікробні клітини і фаги розмножуються *in vitro* на агаровому середовищі, утворюючи відповідно колонії і бляшки, які являють собою потомство однієї особи (мікробної клітини чи вірусної частки). Розробка методів, що дозволяють одержувати і надалі підтримувати культури клітин еукаріотичних багатоклітинних організмів, у яких одноклітинний організм цілком зберігає геном вихідного виду й одночасно в багатьох відносинах поводить себе як мікроорганізм, є свого роду фундаментом, на якому зводиться будова клітинної інженерії і біотехнології.

Однією з основних властивостей клітинних культур є обмежена тривалість життя навіть за умови постійного перенесення їх на свіже поживне середовище (після 50–100 поділів клітинні культури гинуть). Не є винятком і такі клітини, які добре переносять культивування — фібробласти. Чим менше вік джерела, з якого отримані клітини для культивування в культурі, тим більше разів вони здатні ділитися перш ніж загинути. Так, якщо донором є плід, то кількість поділів клітин, що знаходяться у культурі, досягає 50; однак тільки до 30 разів діляться клітини, взяті для культивування у немовляти.

Для пояснення старіння і загибелі клітин запропоновано кілька гіпотез, одна з яких пов'язує старіння з нагромадженням соматичних мутацій, порушенням транскрипції і трансляції, біосинтезом значної кількості неактивних чи частково активних

молекул, що призводить до збільшення кількості аномальних продуктів обміну. Однак наводяться дані про те, що віруси в старій і молодій клітинній культурах розмножуються однаково успішно. У зв'язку з цим висловлюється думка про те, що апарат біосинтезу білка клітини-хазяїна, що бере участь у процесі репродукції вірусів, функціонує в старих культурах клітин так само добре, як і в молодих.

Гіпотеза запрограмованої загибелі клітин передбачає, що смерть клітин — це результат реалізації генетичної програми. Наявні експериментальні дані підтверджують, що загибель клітин у культурі й організмі настає після кількості поділів, які збігаються, і є наслідком реалізації генетичної програми. Висловлюється думка, що однією з причин загибелі клітин, у яких порушене співвідношення між швидкістю поділу й інтенсивністю обміну, є нагромадження ліпофусцину, що утворюється внаслідок розпаду білкових структур, ліпідів і гему. У клітинах, що діляться, накопичується ліпофусцин, який розподіляється між дочірніми клітинами. Крім того, речовини, що входять до складу ліпофусцинових гранул, використовуються повторно (Зенгбуш П., 1984). Процесу нагромадження ліпофусцину в загибелі клітин відведена важлива роль, але нема пояснення, чому настільки тривале життя в культурі ракових клітин. Анеуплоїдні (клітини, у яких число хромосом у ядрах не є кратним гаплоїдному набору), а також багато ліній пухлинних клітин є винятком з цього правила.

З 1951 р. культивується лінія анеуплоїдних (60–70 хромосом) пухлинних клітин, відомих як клітини HeLa. Вони були отримані з пухлинної тканини померлої від раку матки негрятянки. На сьогодні ця культура клітин в умовах лабораторій за показниками росту перевершує інші лінії, отримані згодом від хворих на рак людей білої раси. Фермент глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа негрів і людей з білою шкірою при гель-електрофорезі поводить не однаково, що покладено в основу маркування клітин HeLa. Що стосується рослинних клітин, то наявні дані до розмноження черешками свідчать про необмежену здатність клітин рослин до поділу.

Для підтримки функціонально активного стану клітин у культурі важливою була розробка відтворених умов культиву-

вання, особливо необхідність стандартизації складу поживного середовища. Так, у середовище для культивування фібробластів миші вводили кінську сироватку, екстракт із курячих ембріонів і солі. Ігол М.Г. (1955) запропонував багатокомпонентну суміш, відому як середовище Ігла (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Склад середовища Ігла

Компоненти	Концентрація		Компоненти	Концентрація	
	мг/л	мМ		мг/л	мМ
<i>Солі</i> (збалансований сольовий розчин Ерла)					
NaCl	6800	100			
KCl	400	5	<i>Вітаміни</i>		
CaCl ₂	200	1	Біотин	1	10 ⁻³
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	0,5	Холінхлорид	1	10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	150	1	Інозит	2	2·10 ⁻³
NaHCO ₃	2000	20	Нікотинамід	1	10 ⁻³
<i>Амінокислоти</i>			Фолієва кислота	1	10 ⁻³
Arg-HCl	21	0,1			
Cys	12	0,05	Пантотенат кальцію	1	10 ⁻³
Gln	292	2,0			
His-HCl	9,5	0,05	Рибофлавін	0,1	10 ⁻⁴
Ile	26	0,2	Тіамін	1	10 ⁻³
Leu	26	0,2	<i>Добавки</i>		
Lys-HCl	36	0,2	Глюкоза	1000	5
Met	7,5	0,05	Пеніцилін	0,005%	
Phe	18	0,1	Стрептоміцин	0,005%	
Thr	24	0,2	Феноловий червоний	0,0005%	
Trp	4	0,02			
Tyr	18	0,1	Сироватка (діалізована)	5%	
Val	24	0,2			

Відомі модифікації цього поживного середовища, а також прописи середовищ, запропоновані іншими авторами. Якщо ви-

моги до складу поживного середовища з боку клітин не дуже суворі, то допустимі коливання реакції середовища невеликі (оптимум рН знаходиться у межах 7,2–7,4); зменшення чи збільшення рН на 0,2–0,4 супроводжується загибеллю клітин у культурі. При тривалому культивуванні зростають вимоги до буферних розчинів. Перевага надається гліцилгліциновому, трис-(гідроксиметил)-амінометановому і 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфоокислотному (ГЕПЕС) буферам. Вплив сироваткового компонента середовища Ігла на функціональний стан клітин у культурі тим ефективніший, чим менше вік тварини, від якої ця сироватка отримана (краще використовувати сироватку ембріонів).

Для забезпечення стерильності, що є надзорською контрольною умовою, останнім часом практикується використання стерильного пластмасового посуду (флаконів, чашок, піпеток) одноразового використання. У зв'язку з тим, що поділ деяких типів клітин у культурі настає лише тоді, коли вони прикріплені до субстрату, матеріал варто піддавати спеціальній обробці при підготовці до процедури культивування.

Зростаючі в культурі і прикріплені до субстрату клітини найчастіше сплюснені і мають витягнуту веретеноподібну форму; клітини, що ростуть у суспензії, мають, як правило, сферичну форму.

Клітинну масу для культивування одержують шляхом триптичної обробки відповідного органу; останній розпадається на окремі клітини, що з дотриманням усіх обмежень, викликаних необхідністю дотримання стерильності, переносять на поживне середовище для культивування. Поодинокі еукаріотичні клітини, які не здатні ділитися, швидко гинуть. Враховуючи таку властивість при культивуванні вдаються до створення шару живильних клітин, для чого призначені для клонування клітини наносять на шар клітин, що втратили після опромінення здатність ділитися, але ще на певний час зберегли метаболізм. Цього виявляється достатньо, щоб нанесені на цей шар клітини почали ділитися. Однак кількість клітин, що вступили у фазу поділу, віднесена до кількості нанесених на живильне середовище завжди менша 100 %. При додаванні до живильного середовища деяких речовин-мітогенів здатність клітин до поділу підвищується.

Серед мітогенів розрізняють групу речовин (фактори росту), що містяться у сироватці крові в незначних кількостях, які мають властивості гормонів. Ідентифіковані фактори росту нервів (ФРН), епідермісу (ФРЕ), фібробластів (ФРФ) є білковими речовинами, молекулярна маса яких коливається від 6045 (ФРЕ) і 13,4 тис. (ФРФ) до 130 тис. (ФРН). Спектр їх дії набагато ширший, ніж стимулювання мітозу.

Крім факторів росту, мітогенною дією володіють речовини, названі лектинами. Їхньою загальною властивістю є здатність специфічно зв'язувати залишки цукрів. Залежно від кількості ділянок, з якими вступають у взаємодію цукри, розрізняють дво- і полівалентні лектини. Основним джерелом лектинів є бобові (1,5–3 % усіх білків), хоча з бактерій, безхребетних (равлик) і хребетних (електричний вугор) також виділені ці речовини. З насіння рицини отриманий рицин, з конвалії мечоподібної — конканавалін А (Con A), з насіння квасолі — фітогемоглютинін (ФГА). При насиченні моноцукрами середовища, що містить лектини, останні втрачають здатність взаємодіяти з вуглеводоємними рецепторами поверхні, тому що специфічні ділянки лектинів, з якими могли б вступити в реакцію вуглеводні рецептори клітинної стінки, займають раніше додані моноцукри. Клітини в культурі ведуть себе по-різному. Одні (фібробласти) легко піддаються культивуванню, інші (клітини епітелію, нейрони) поділяються значно важче.

Визначальним параметром поводження клітин у культурі є так зване контактне гальмування, чи регуляція клітинного росту, що залежить від кількості клітин на одиниці площі. Максимальна щільність, що може бути доступна для нормальних клітин у культурі, досягає $10^4/\text{см}^2$ особин; кількість ракових клітин на два порядки вища ($10^6/\text{см}^2$). Крім того, нормальні клітини, що ростуть на субстраті, являють собою моношарове утворення: ріст клітин пухлини характеризується безладністю, у зв'язку з чим виникає багатшарове утворення. Висловлюється думка, що причиною гальмування клітинного поділу є вилучення мікросередовища. Мітогени (речовини, що стимулюють клітинний поділ) і халони (речовини, що гальмують процес поділу) також виступають як регулятори клітинного росту. Такі властивості клітин, як адгезія (зчеплення клітин між собою і субстра-

том) і контактне гальмування, значною мірою залежать від характеру розподілу на клітинній поверхні і рухливості в мембрані вуглеводовмісних рецепторних молекул. За допомогою лектинів, що сприяють аглютинації клітин, встановлено, що рецептори на поверхні пухлинних клітин розподілені нерівномірно (вони утворюють скупчення). Розподіл рецепторів на клітинній поверхні, їх кількісні і якісні характеристики значною мірою призводять до того, що адгезія і контактне гальмування в ракових клітинах проявляються слабше, а аглютинації під дією лектинів вони піддаються легше, ніж нормальні диференційовані клітини.

4.2. БІОТЕХНОЛОГІЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН

Причиною встановленого ще в минулому столітті факту багатоядерності клітин як патологічних (пухлини, ділянки з запаленням, що утворюються при коров'ячій віспі та ін.), так і нормальних (м'язові волокна) тканин могло бути, з одного боку, поділ ядер без одночасного поділу клітин (наприклад, формування плазмодія слизуватого гриба *Physarium*), з іншого — злиття декількох клітин (міобластів) і утворення багатоядерної клітини — м'язового волокна. Злиття відбувається не тільки серед диференційованих клітин у багатоклітинних організмах, але й між клітинами в культурі. Зливатися можуть клітини різного типу, що належать до того самого виду (наприклад, мишачі фібробласти і мишачі лімфобласти), так і клітини тварин різних видів (наприклад, миша/людина; хом'як/курка; комар/людина). У першому випадку батьківські клітини, що зливаються, розрізняються між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями, а продукти злиття є внутрішньовидовими гібридами. В другому випадку утворюються міжвидові гібриди, а вихідні батьківські клітини, від злиття яких ці гібриди з'являються, насамперед відрізняються генотипічно, а іноді й фенотипічно. Багатоядерні клітини (полікаріони), що утворюються в результаті злиття клітин двох різних типів (А і В), представлені трьома

комбінаціями — АА, ВВ і АВ. Полікаріони, що містять ядра тільки одного клітинного типу (АА і ВВ), називаються гомокаріонами; полікаріони, у складі яких присутні ядра обох батьківських типів (АВ), належать до гетерокаріонів. Злиття в гетерокаріонах ядер після злиття клітин є результатом виникнення клітинного гібрида (рис. 4.1).

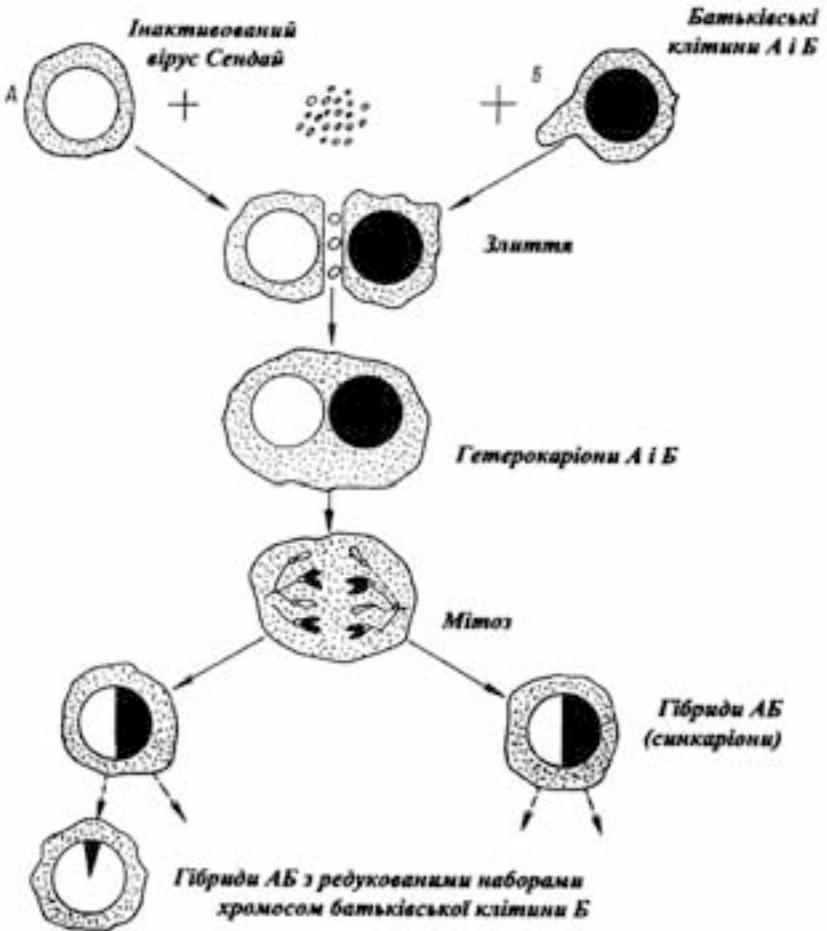


Рис. 4.1. Схема злиття двох одноп'ядрних клітин А і В, які належать тваринам двох різних видів (за Рінгерцем Н. та Севіджом Р., 1979)

Овчинников Ю.А. (1982) знайшов вирішення проблеми за допомогою методу гібридизації соматичних клітин. Гібридизація широко використовується в генетиці, біології клітини, біології розвитку, вірусології, біології пухлин та інших галузях біологічної науки, а також на практиці.

Метод одержання і культивування гібридних клітин може бути використаний для вирішення практичних питань охорони здоров'я, тому що за продуктами експресії хромосоми, що залишилися в геномі синкаріона з батьківської клітини людини, визначаються ознаки генетичних спадкових захворювань. За допомогою методу гібридизації соматичних клітин вдається реактивувати онкогенний вірус. При злитті клітин-вірусоносіїв з нормальними, але чутливими до пухлинного вірусу клітинами в синкаріонах, що утворилися, настає реактивація вірусу, який інтенсивно розмножується в кількостях, достатніх для його виявлення.

Цей методичний прийом використовують для виявлення в пухлинних клітинах онкогенного вірусу. Утворення синкаріонів, наступне вивчення клітинних гібридів у культурі, а також при введенні їхньої суспензії тваринам та поява пухлин, що спостерігається не у всіх випадках, подає необхідну інформацію для з'ясування механізмів виникнення раку. Наприклад, вирішувати питання про злоякісність або доброякісність одержаного з пухлинної і нормальної клітин синкаріона можливо, очевидно, залежно від наявності чи відсутності в гібридній клітині певних хромосом.

Антисироватки зі специфічними антитілами, отриманими звичайними методами, широко й успішно використовувалися для ідентифікації, очищення або для руйнування певних клітин, що знаходяться в оточенні клітинних популяцій, які розрізняються між собою. Специфічні антисироватки використовувалися при вивченні клітинних ліній і факторів, що беруть участь у процесах проліферації і диференціації, а також для ідентифікації компонентів синапсів, що являють собою місця міжклітинної взаємодії у нервовій системі.

За допомогою методик з використанням антисироватки була встановлена специфічна локалізація калмодуліну, клатрину і тубуліну в синаптичних ділянках, що дозволило сформулювати

більш обґрунтовану думку про функції цих молекул, що беруть участь в забезпеченні життєдіяльності всіх клітин. Крім того, за допомогою антисироваток у місцях нервово-м'язового з'єднання були виявлені специфічні для цієї ділянки антигени, що відіграють важливу роль у функціонуванні цього синапсу. Стає очевидною потенційна можливість методу застосування антисироваток для розкриття механізмів диференціації нерва і м'яза в цій спеціалізованій ділянці.

Антисироватки виявилися найбільш ефективними реагентами, а їхнє застосування дало можливість виявляти локалізацію клітин, що синтезують і містять нейропептиди і непептидні медіатори, а також ферменти, що беруть участь у їхньому біосинтезі. Висока чутливість імуноцитохімічних методів дозволила ідентифікувати і визначити локалізацію більше двох десятків медіаторів.

Участь багатьох органічних молекул у регуляції специфічних клітинних функцій вдалося встановити також за допомогою імунологічних досліджень. Потенційні можливості методу неможливо реалізувати через недоліки, властиві антисироваткам, отриманим у результаті імунізації тварин гетерогенними імуногенами. Ефективність антисироваток зменшується через наявність не тільки молекул, які цікавлять у даний момент дослідника, але й інших антигенів. Так, є підстави вважати, що окрема клітина імунної системи, що синтезує імуноглобулін (Ig), і її нащадки відтворюють тільки один вид антитіла. Ця унікальна властивість імунної системи була покладена в основу при розробці методу щодо зниження гетерогенності стандартних антисироваток. Імунізацію тварин проводять гетерогенними чи поліспецифічними антигенами. Однак надалі в культурі вирощують клони окремих синтезуючих імуноглобулін клітин, що продукують окремі моноспецифічні чи моноклональні антитіла, вільні від домішок антитіла до сторонніх антигенів. Ідентифікація клітин, які утворюють антитіла, не має особливої складності; що стосується розмноження їх у культурі, то, як було сказано раніше, це вдається зробити протягом нетривалого часу. Гібридні клітини, отримані злиттям пухлинних і секретуючих імуноглобулін клітин імунної системи — гібридами, поєднують у собі здатність до тривалого розмноження в культурі зі

здатністю біосинтезу моноклональних антитіл. Уперше гібридами були отримані шляхом злиття антитілоутворюючих клітин селезінки (спленоцитів) миші, імунізованої баранячими еритроцитами, з мієломними клітинами, у яких була відсутня гіпоксантинфосфорибозилтрансфераза (фермент, що бере участь у реакціях метаболізму пуринів). Щоб збільшити імовірність злиття батьківських клітин і підвищити вихід гібридом, як допоміжний засіб використовують віруси з аглютинуючими властивостями. Вірусні частки накопичуються на поверхні батьківських клітин, що вступають у контакт; на поверхні контактуючих клітин з'являється велика кількість мікроворсинок, що у місцях дотику зливаються, утворюючи цитоплазматичні містки. Зони злиття поступово розширюються, заповнюючи всю площу мембрани в ділянці клітинного контакту.

Köhler G., Milstein C. (1975), що першими запропонували спосіб одержання гібридом, для злиття батьківських клітин використовували вірус Сендай, що належить до групи вірусів паргрипу, інактивованого ультрафіолетовим випромінюванням. Замість вірусів використовуються ліпіди, іони кальцію в лужному розчині (рН 10,5), фосфоліпаза C. Останнім часом знайшов широке застосування поліетиленгліколь. Такі речовини, як цитохалазин В, інгібітори енергетичного обміну, а також засоби, що викликають місцеву анестезію, навпаки, блокують процес злиття клітин.

Клітини селезінки, що не взяли участі в утворенні гібридом, через певний час гинули, тому що не були здатні до проліферації і виживання в культурі. Мієломні клітини, що залишилися у культурі, під впливом доданого в середовище аміноптерину гинули, тому що процес синтезу пуринів *de novo* припинявся. Гібридомні клітинні лінії були життєздатними в культурі завдяки присутності гена, що кодує біосинтез ферменту гіпоксантинфосфорибозилтрансферази, за участю якого гіпоксантин перетворюється на пуринові нуклеотиди. Гени батьківської мієломи забезпечують гібридомній культурі постійний поділ.

Лінія гібридомних клітин, що синтезує антитіла проти баранячих еритроцитів, була ідентифікована методом їхнього гемолізу. Крім того, виявилось, що в популяції гібридомних клітин кількість клонів, продукуючих антитіла проти баранячих

еритроцитів, у 100 разів перевищувало кількість клонів у вихідній батьківській популяції спленоцитів (10 % у гібридомній популяції проти 0,01 % у популяції спленоцитів). Цей приклад указує на здатність стимульованих антигеном клітин забезпечувати одержання функціонально активних гібридів.

При гібридомній технології придатною є така система добору, за якої життєдіяльними залишалися б тільки гетерокаріони. З цією метою підбираються вихідні батьківські клітинні лінії, що мають дефекти в генах, які перешкоджають їх поділу і росту. Одночасно внаслідок взаємної комплементациї гетерокаріони зберігають здатність до поділу (*Зенгбуш П.*).

Найбільш розповсюдженою є система добору за допомогою селективного середовища, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище ГАТ). Вихідні батьківські клітинні лінії, використані для одержання клітинних гібридів, містять дефектні ферменти; гіпоксантингуанозинфосфорибозилтрансферазу (ГГФРТ), резистентну до 8-азагуаніну (АГ), чи тимідинкиназу (ТК), резистентну до 5-бромдезоксидуридину (БДУ). Вихідні батьківські клітини не можуть рости в середовищі, що містить гіпоксантин — перетворений пурин, тимідин — перетворений піримідин і аміноптерин (середовище ГАТ). Аміноптерин блокує синтез гіпоксантину і тимідину, а під час відсутності ферменту ГГФРТ і (чи) ТК клітини не можуть використовувати ці речовини, що містяться у середовищі. З вихідних ліній батьківських клітин, що знаходяться в середовищі ГАТ, резистентних до АГ (ГГФРТ⁻/ТК⁺) і резистентних до БДУ (ТК⁻/ГГФРТ⁺), здатність до поділу будуть зберігати лише клітинні гібриди, утворені в результаті злиття вихідних клітинних ліній. Лінії ГГФРТ⁻ і ТК⁻ вже отримані для мишей, пацюків, золотавого і китайського хом'яків, а також для людини. За методикою, аналогічній описаній, з використанням поліетиленгліколю замість вірусу Сендай для індукування процесу злиття батьківських клітин отримані антитіла для великої кількості антигенів. На кількість у селезінці В-лімфоцитів, що взаємодіють з певним антигеном, впливає тривалість інтервалу між останньою імунізацією тварини і моментом узяття спленоцитів. Остання обставина впливає на чистоту утворення гібридом, що синтезують відповідні антитіла.

Крім описаних, є дані про можливість одержання гібридом шляхом злиття з мієломними клітинами селезінкових клітин, імунізованих антигенами *in vitro*. Кількість антигену для одержання імунної відповіді в цьому випадку значно зменшується. Для перетворення лінії клітин, що секретує антитіла, немає потреби проводити їхню гібридизацію з мієломними клітинами. За допомогою вірусу Епштейна-Барра можлива пряма трансформація клітин, які секретують антитіла, специфічні до дифтерійного і правцевого токсинів. Тривала підтримка у функціонально активному стані клітинної культури Т-лімфоцитів за допомогою додаткових ростових факторів свідчить про те, що в недалекому майбутньому можна буде одержувати безперервно клони В-лімфоцитів, які спроможні до безперервного поділу.

Як зазначає Овчинников Ю.А. (1982), гібриди є тільки одним з варіантів використання культури клітин у біотехнології. За допомогою гібридомної біотехнології можлива регуляція імунної відповіді за рахунок одержання моноклональних антитіл заданої специфічності.

Моноклональні антитіла є тим видом біотехнологічної продукції, яку з успіхом використовують як у науково-дослідній роботі, так і для задоволення потреб виробництва. Моноклональні антитіла застосовуються при проведенні ідентифікації молекул, що цікавлять дослідника, для очищення потрібних антигенів (для детального аналізу їхньої структури і функцій), для з'ясування механізмів диференціації клітин в онтогенезі і поділу різних типів клітин імунної системи. Моноклональні антитіла, що секретуються культурою гібридомних клітин, є високоефективним і високочутливим діагностичним препаратом. Вони можуть використовуватися як профілактичні та лікувальні засоби, а також для одержання імуносорбентів, ферментних препаратів, інтерферонів, гормонів та інших біологічно активних речовин (можна використовувати культури тваринних і рослинних клітин).

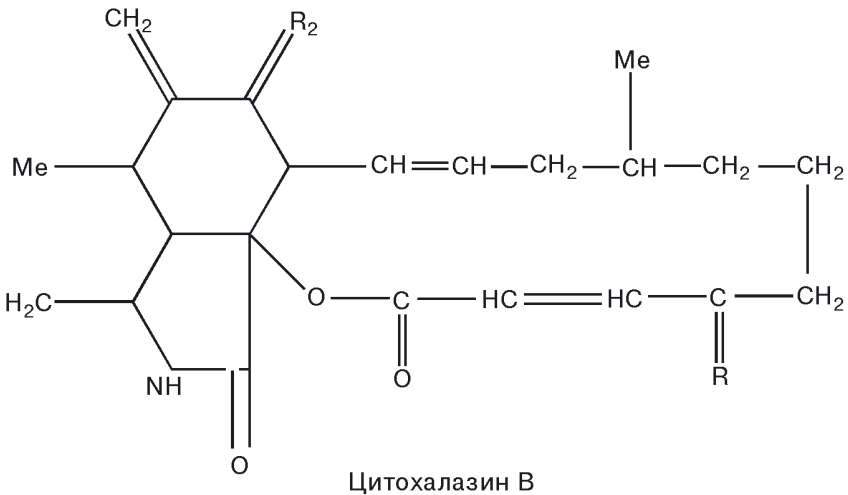
4.3. БІОТЕХНОЛОГІЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЯДЕР

Більшість досліджень, виконаних в останні роки з гібридизації соматичних клітин еукаріотичних організмів (переважно ссавців) у клітинній культурі, переконливо довели, що в гібридній клітині, які має змішаний геном у зв'язку з гетерогенною природою батьківських клітин, відбуваються стабільні зміни в експресії генів синкаріона порівняно з процесом експресії у вихідних батьківських клітинах. Так, при злитті клітин щурачої гепатоми, що синтезує і екскретує альбумін, з мишачими фібробластами, що не секретують цей білок, були отримані гібридні клітини, частина клонів яких синтезували альбумін тільки пацюка, чи тільки миші, або альбуміни обох вихідних батьків (пацюка і миші).

На підставі результатів цього й інших подібних експериментів з гібридизації соматичних клітин було висловлене припущення про те, що в клітинах ссавців є речовини, здатні прямо чи побічно впливати на клітинне ядро, змінювати його функціональний стан за допомогою позитивної або негативної регуляції експресії певної частини генів. Однак комплекс об'єктивних причин (гетерогенність генома найчастіше зі значним дефіцитом хромосом, а також із хромосомними перебудовами, що відбулися, які знаходяться в оточенні гетерогенної цитоплазми), властивих методу гібридизації соматичних клітин, не дозволив ідентифікувати речовини, що беруть участь в експресії генома, а також установити їхню хімічну будову і механізм дії. До цього часу вчені мали у своєму розпорядженні дані про те, що речовини, які містяться в цитоплазмі тварин, беруть участь у регулюванні експресії генів клітинного ядра.

Виявилось, що в ядрах попередньо вилучених з диференційованої клітини і поміщених у цитоплазму яйцеклітини починалися процеси клітинного диференціювання і в багатьох випадках розвивався нормальний організм, тобто ядра спеціалізованих клітин містили повний обсяг необхідної для розвитку повноцінного організму інформації. Так, злиття ядер, вилучених з клітин кишкового епітелію пуголовка, з позбавленої ядра яйцеклітиною в багатьох випадках приводило до розвитку жаби. Ці експерименти, виконані на амфібіях, показали, що цито-

плазма регулює активність ядра; у спеціалізованих клітинах багато функцій ядра гальмуються компонентами цитоплазми. Інгібуючий вплив, що надходить до ядра з боку цитоплазми диференційованої клітини, опинившись у придатному за хімічним складом цитоплазматичному оточенні (яйцеклітина), усувається, і в ядрах можуть знову проходити процеси, що визначають клітинну диференціацію (*Gurdan J.B., 1977*). Експерименти з трансплантації ядер були проведені на амфібіях. У розробці методів пересадки клітинних ядер ссавців істотну роль відіграло використання цитохалазинів — речовин, синтезованих грибами.



Висловлюється думка, що цитохалазин В, руйнуючи структуру мікрофіламентів, сприяє унікальному розташуванню ядра, коли воно залишається з'єднаним із клітиною тонкою стеблинкою цитоплазми. При центрифугуванні в більшості таких клітин розривається «пуповина» стеблинки й утворюються енуклеювані (без'ядерні) клітини (цитопласти); ядра, що відокремилися при центрифугуванні (каріопласти, чи міні-клітини), оточені тонким шаром цитоплазми і плазматичною мембраною.

Ефективність енуклеації контролювали, забарвлюючи (наприклад, за методом Гімза) клітинний моношар, що знаходиться на поверхні однієї з чашок або дисків.

Наступна операція, спрямована на одержання популяції цитопластів, — відділення їх від цілих клітин, що залишилися, тому що в деяких випадках (лінія клітин мишачої гепатоми Нера-2) ефективність енуклеації не перевищує 50 %. З цією метою, енуклеювані (цитопласти) і цілі клітини, що містяться на поверхні пластикових чашок і скляних дисків, знімали, обробляли трипсином, внаслідок чого в 1 мл сольового розчину з фосфатним буфером містилося 10^6 цілих клітин і цитопластів. Клітинно-цитопластичну суміш нашаровували на 14 мл лінійного градієнта ренографіну-76, який знаходився в центрифужній пробірці, об'ємна концентрація якого змінювалася від 15 до 30 %, і центрифугували при 1000 g і температурі 25 °C протягом 5 хв. Чітко розмежовані шари цілих клітин і цитопластів видаляли з центрифужної пробірки і використовували за призначенням.

Отримані в градієнті щільності ренографіну-76 цитопласти не забарвлювалися трипановим синім, що слугувало контролем ефективності поділу. Вони зберігали здатність знову прикріплюватися до поверхні культуральної чашки і могли використовуватися надалі для реконструювання життєздатних клітин шляхом злиття з гетерологічними каріопластами.

Методи енуклеації, застосовані для одержання каріопластів, відрізняються від тих прийомів, що забезпечують успіх при одержанні цитопластів. Клітини, призначені для виділення каріопластів, за 2 дні до енуклеації висівають на вирізані з культуральних флаконів пластикові пластинки, які перед поміщенням у 50-мілітрову центрифужну пробірку, заповнену звичайним поживним середовищем, склали так, щоб їхні поверхні з прикріпленими клітинами знаходилися зовні. Мишачі фібробластні лінії А9 центрифугували при 9,5 тис. g і 35 °C протягом 15 хв. Призначення цієї процедури зводилося до того, щоб в осаді каріопластів, який має бути отриманий, зменшити кількість цілих клітин. Після відокремлення слабо прикріплених до субстрату клітин, пластинки з клітинами моношару, що залишилися, переносили в пробірки, де концентрація цитохалазину В з розрахунку на 1 мл звичайного поживного середовища досягає 10 мкг. Вміст пробірок інкубували при 37 °C протягом 15 хв; тривалість центрифугування при 35 °C і 7 тис. об./хв — 45 хв. Надосадову рідину, що утворилася, зливали, а осад, представле-

ний в основному каріопластами, ресуспендували в звичайному поживному середовищі.

У виготовлених за описаною методикою препаратах каріопластів знаходяться фрагменти цитоплазми, каріопласти, що загинули, та цілі клітини. Відокремлення фрагментів цитоплазми проводиться осадженням у градієнті фіколау 1–6% концентрації при 1 g і 37 °C протягом 90 хв у зволоженій атмосфері, що містить 5 % CO₂. Фрагменти цитоплазми, що знаходяться у верхньому шарі, відсмоктують і видаляють, а осад каріопластів, що утворився після вилучення і розведення поживним середовищем, знову осаджують центрифугуванням і ресуспендують у свіжому живильному середовищі. Цілі клітини (їх 0,4–4 %) видаляють шляхом дворазового 90-хвилинного інкубування суспензії каріопластів у культуральних чашках.

Інкубування протягом 3 годин дозволяє різко зменшити забруднення каріопластів цілими клітинами, що обов'язково для усіх експериментів з трансплантацією ядер.

Наступна операція — відокремлення життєздатних каріопластів від тих, що загинули. Вона включає ресуспендування осаду в поживному середовищі до концентрації 10⁷ міні-клітин у 1 мл, нашаровування суспензії на Ficoll-раque (розчин містить 5 % фіколу і 9 % діатризоату натрію), що знаходиться в центрифужних пробірках, і обережне додавання зверху 1 мл середовища так, щоб додане середовище і суспензія каріопластів утворили два самостійних шари. Наступне центрифугування при 800 об./хв (130 g) протягом 75 хв при кімнатній температурі дозволяє одержати осад, що на 99 % складається із загиблих каріопластів; на межі живильного середовища і Ficoll-раque знаходиться шар, що складається на 98 % з життєздатних каріопластів.

Для очищення каріопластів використовують й інші методи, зокрема частки танталу розміром 1–3 мкм. До часу енуклеації практично всі клітини містять більш ніж по 12 часток танталу. У зв'язку з тим, що щільність танталу більш ніж у 15 разів перевершує щільність клітини, компоненти, що містять частки танталу, осаджуються значно швидше каріопластів, у яких тантал відсутній. Очищення каріопластів іноді здійснюється за допомогою цитофлуориметра-сортера.

Властивості цитопластів і каріопластів. Установлено здатність цитопластів синтезувати білки, підтримувати реплікацію вірусу везикулярного стоматиту і поліовірусу, синтез РНК і білка, контрольований вірусом сказу, звільняти вірус SV40 із трансформованих клітин. Цитопласти містять усі види органел, властиві нормальній клітині, зберігають характерну для цілих клітин здатність прикріплюватися до субстрату й утворювати складчасту мембрану, пересуватися і здійснювати піноцитоз.

Навколо каріопластів знаходиться шар, на частку якого припадає близько 10 % клітинної цитоплазми, що містить компоненти ендоплазматичного ретикулума, деяка кількість мітохондрій і рибосом; центріолі в каріопластів, на відміну від цитопластів, відсутні.

Близько 10 % каріопластів деяких клітинних ліній здатні відновлювати весь обсяг утраченої при енуклеації цитоплазми і знову перетворюватися на життєздатні клітини.

Здатність каріопластів регенерувати втрачену в процесі енуклеації цитоплазму і формувати життєздатні колонії клітин залежить від кількості цитоплазми, що оточує ядро. У фракції каріопластів, біля ядер яких зосереджено 2–4 % тієї кількості цитоплазми, що міститься в інтактній клітині (дрібні каріопласти), тільки один з 10^6 очищених елементів може сформувати життєздатну колонію клітин.

Трансплантація ядер і реконструювання клітин. Після енуклеації клітин моношар цитопластів у пластикових чашках діаметром 60 мм чи скляних дисках діаметром 14 мм інкубують у поживному середовищі при 37 °С протягом 1–2 годин, а потім — 20 хв і охолоджують до 4 °С. При цій температурі моношар двічі відмивають розчином Ерла (рН 8,0), потім 20 хв. обробляють 0,5 мл охолодженого розчину Ерла з вірусом Сендай, інактивованим опроміненням протягом 5 хв (ультрафіолетовою лампою на відстані 15 см), після чого шар цитопластів знову двічі промивають тим же розчином, який потім видаляють.

Каріопласти, суспендовані в сольовому розчині на фосфатному буфері, додають до моношарової культури цитопластів з таким розрахунком, щоб на один цитопласт припадало 100 каріопластів. Для адсорбування каріопластів на цитопластах, по-

критих вірусними частками, інкубують при 4 °С протягом 45 хв; через кожні 3–5 хв чашки злегка погойдують. Для злиття каріопластів і цитопластів чашки чи скляні диски переносять у термостат і витримують там при 37 °С протягом 45 хв. Після закінчення цього часу моношар на чашках кілька разів інтенсивно відмивають розчином Ерла чи поживним середовищем без сироватки, щоб видалити каріопласти, які не злилися. Потім у чашки наливають поживне середовище, придатне для культивування того типу клітин, що були використані як донори каріопластів. Цитопласти, що не злилися з ядрами, гинуть і приблизно через 2 дні відокремлюються від поверхні чашки.

Для одержання незабруднених цитопластами культур рекомендується центрифугування гібридних клітин у градієнті щільності ренографіну.

Використання поліетиленгліколю для стимулювання процесу злиття каріопластів і цитопластів при конструюванні клітинних гібридів обмежене через його токсичність, що значно перевищує токсичність вірусу Сендай.

Для ідентифікації гібридних клітин, визначення ефективності трансплантації ядер і наявності батьківських клітин у гібридній популяції використовують мутантні клітинні лінії.

Ефективність реконструювання клітин за рахунок злиття каріопластів і цитопластів залежить від багатьох факторів. Так, тільки близько 10 % цитопластів, отриманих шляхом енуклеації клітин пацюка лінії НТС, зливалися з каріопластами, виділеними з клітин миші лінії А9. Коли гібридизації піддавали цитопласти, отримані з фібробластів курячих ембріонів, і каріопласти, що являли собою перебуваючі у спокої ядра еритроцитів, ефективність реконструювання перевищувала 90 %. Висока ефективність злиття ізольованих перебуваючих у спокої ядер еритроцитів птахів з енуклеюваними цитопластами, а також досвід щодо активування ядер еритроцитів птахів, зокрема курей, шляхом злиття цих еритроцитів із клітинами HeLa чи з іншими клітинами, що мають активний метаболізм, дозволили досліджувати роль ядерно-цитоплазматичних взаємодій в експресії генів гібридних еукаріотичних клітин. Виявилося, що не всі гібриди, що утворилися, були життєздатними. Приблизно 9 % реконструйованих клітин можуть рости і ділитися (*Хайтауер М.*,

Льюкас Дж., 1985). У гібридних клітинах відразу після злиття починаються морфологічні зміни. Через кілька днів реконструйовані гібридні клітини майже не відрізняються від вихідних батьківських, які було використано як донори ядер.

Трансплантація ізольованих інтерфазних ядер, укладених у ліпідну оболонку, у соматичні клітини.

У літературі є дані про введення молекул, у тому числі ДНК, у клітини за допомогою «тіней» еритроцитів (Рекстейнер М., 1985) і ліпосом (Штраубингер Р., Папахаджопулос Д., 1985). Так, Серовим О.Л. (1985) у лабораторії генетичних основ онтогенезу Інституту цитології і генетики СО АН СРСР була виконана експериментальна робота щодо включення в штучні мембрани ізольованих інтерфазних ядер з метою забезпечення збереження генетичного матеріалу від деградації та індукування процесу трансформації ізольованих ядер у реципієнтні клітини. За даними Серова О.Л., інтерфазні ядра, виділені з культури фібробластів норки, суспендували в багатокомпонентному буферному розчині, що включає різні концентрації KCl, NaCl, трис-HCl, EDTA, сахарози і спермідину.

Для створення штучної мембрани навколо ядер використовували фосфатидилетаноламін у концентрації 10–20 мг/мл і фосфатидилхолін, отриманий із жовтків курячих яєць, у концентрації 150–200 мг/мл органічного розчинника. Запропонований Серовим О.Л. метод заснований на утворенні фосфоліпідної мембрани при проходженні ізольованих ядер через тришарову систему, що знаходиться в центрифуговій пробірці з розчином 1М сахарози, яка міститься на дні центрифугової пробірки, водним розчином 0,25 М сахарози, що формує верхній шар, і шаром органічного розчинника, що складається з хлороформу, діоксану і етилацетату в співвідношенні 0,25:0,23:0,51 і фосфатидилхоліну в концентрації 150–200 мг/мл зазначеного органічного розчинника, що займає в центрифуговій пробірці положення між верхнім і нижнім шарами сахарози.

На межі трикомпонентного органічного розчинника з верхнім сахарозним шаром молекули фосфатидилхоліну орієнтовані своїми гідрофільними кінцями убік водного шару; на межі органічного розчинника з нижнім сахарозним шаром молекули фосфоліпиду також будуть орієнтовані своїми полярними голів-

ками до водяної фази більш щільного нижнього сахарозного шару. Під час центрифугування ядра при переході з водного (0,25 М сахарози) у шар органічного розчинника на межі поділу фаз зустрічаються з полярними гідрофільними голівками молекул фосфатидилхоліну, який формує одношарову ліпідну мембрану на поверхні інтерфазних ізольованих ядер. На межі органічного шару з більш щільним шаром 1М сахарози ядра, що вже мають на своїй поверхні одношарову ліпідну мембрану, орієнтовану гідрофобними кінцями назовні, зустрічаються із шаром молекул фосфатидилхоліну, гідрофобні кінці яких спрямовані убік органічної фази і взаємодіють з гідрофобними кінцями ліпідного моношару ядер, утворюючи при цьому другий шар мембрани на поверхні інтерфазних ядер.

Сформований ліпідний бішар міцно утримується на поверхні інтерфазних ядер і не змивається при багаторазових пересадженнях шляхом центрифугування через розчин 1М сахарози. За допомогою радіоавтографії і флуоресцентної мікроскопії було показано, що ліпідний бішар рівномірно розподіляється на поверхні ядра, формуючи додаткову мембрану чи мембрани (при зазначених умовах центрифугування вільні ліпосоми в ядрі фракцію потрапити не можуть).

У результаті додаткових експериментів було показано, що штучно створена мембрана не є досконалою (Сєров О.Л.). Такий висновок, зроблений на підставі виявлення виходу з ядер, оточених фосфатидилхоліновою мембраною, АТФ і проникнення в ці ядра екзогенної ДНКазі. Одночасно було встановлено, що в обох випадках утворена мембрана блокувала транслокацію як макромолекул (ДНКазі), так і звичайних молекул порівняно невеликих розмірів (АТФ). Тим часом відомо, що природні ядерні мембрани проникливі навіть для полімерних молекул; штучна мембрана, створена з фосфатидилхоліну, зовсім непрониклива як для великих полярних молекул, так і для макромолекулярних структур.

У результаті проведених експериментів була висловлена думка, що фосфатидилхолін екзогенного походження формує мембранну структуру навколо ядра, у зв'язку з чим воно виявляється заключеним у ліпосому, яка, будучи додатковою мембраною, накладає певні обмеження на перенесення деяких

молекул у ядро і назад, але цілком ці процеси не припиняються. При введенні інтерфазних ядер норки, що оточені штучною мембраною, в культуру ЛМТК — клітин миші, які характеризуються дефіцитом ферменту тимідинкінази (ТК), встановлене перенесення у реципієнтні мишачі клітини порівняно великих фрагментів ДНК із ядер норки, а більшість досліджених трансформаторів характеризувалися стабільним ТК⁺ фенотипом.

Пропонований метод перенесення генетичного матеріалу за допомогою інтерфазних ядер, що знаходяться у ліпосомі, завдяки високій частоті трансформації в порівнянні з методом перенесення генів у складі сумарної клітинної ДНК свідчить про можливу захисну функцію ядерних білків донора, що захищають ДНК від деградації, а також про участь цих білків в інтеграції донорського хроматину і хроматину реципієнтних клітин.

Біотехнологія одержання цибридів. Цибридами називаються продукти, що утворюються при злитті цілих клітин однієї мутантної лінії з цитоплазмою енуклеюваних клітин іншої клітинної лінії. Для одержання цибридів проводили енуклеацію клітин, попередньо маркірованих флуоресціюючими гранулами зеленого кольору, що додаються в поживне середовище за допомогою цитохалазину В, концентрацію якого довели до 5 мкг/мл середовища.

Іонгкінд І. та Веркерк А. (1985) позначили фібробласти людини флуоресцентними барвниками, інкубуючи проліферуючі клітинні культури протягом 2 днів у середовищі F10 Хема, що містить у 1 мл $2-10^7$ гранул барвника, 100 мкг стрептоміцину і 100 одиниць пеніциліну, з додаванням 10 % сироватки плода корови. Під час інкубації клітини, що знаходяться у культурі, фагоцитували гранули; гранули прикріплені до зовнішньої поверхні клітинної мембрани, змивали сольовим розчином. Як показали результати проведених досліджень, маркірування флуоресціюючими гранулами сповільнює ріст клітин.

Енуклеювану суспензію клітин (цитопластів) забарвлюють також флуоресцентними бісимидазоловими барвниками фірми Hoechst; флуоресціюючі цитопласти виділяють методом сортування у потоці за допомогою клітинного сортера. Чистота фракції цитопластів досягала 99,7 %, а 90 % отриманих після сортування цитопластів мають здатність до включення ³Н-лейцина.

Маркіровані тим чи іншим способом цитопласти зливаються з цілими клітинами, також попередньо позначеними флуоресціюючим барвником, що відрізняється за кольором від барвника, який був використаний для позначення енуклеюваних клітин (цитопластів); співвідношення цитопластів і цілих клітин при одержанні цибридів – 3:1. Як агент, індукуючий процес злиття цитопластів і цілих клітин, використовують поліетиленгліколь (ПЕГ 1000), диметилсульфоксид чи інактивованій вірус Сендай. Продукти злиття (цибриди) мають двоколірну флуоресценцію. Їх виділяють за допомогою потокового клітинного сортера FACS II, оснащеного аргонним лазером, при довжині хвилі 488 нм і постійному виході 100 мВт. Шланги сортера, через які здійснюється подача зразка, стерилізуються 70 %-ним етанолом, а несуча рідина для стерилізації пропускається через бактеріальні фільтри (Millipore, пори 0,22 мкм). Якщо в клітинній суспензії після злиття цитопластів і цілих клітин було багато грудок, їх диспергують, пропускаючи через наконечник (діаметр 70 мкм) клітинного сортера.

Вихід фракції цибридів після проведеного сортування визначають, зливаючи контрольні цитопласти, що є носіями гіпоксантифосфорибозилтрасферазної (ГФРТ⁺) активності, з фібробластами, отриманими від хворих на синдром Леша – Ніхана (ГФРТ⁻). Через 20 годин після злиття клітини з двоколірною флуоресценцією (цибриди) при сортуванні зміщують на покривні скельця, інкубують 20 годин із ³H-гіпоксантином, фіксують і досліджують радіоавтографічним методом. Включення гіпоксантину в цибридну фракцію показує, що за допомогою вірусу Сендай не менш 90 % клітин, які пройшли сортування, можна віднести до справжніх цибридів (ГФРТ⁺).

Для визначення активності ферментів і концентрації субстратів у надто малому об'ємі матеріалу (5–10 тис. цибридів) були розроблені мікрометоди, засновані на застосуванні флуориметрії, що дозволяють виявити мікрограмові кількості речовин у незначних кількостях ліофілізованих клітин. Ультрамикрометод, заснований на проведенні мікрофлуориметрії, дає можливість вимірювати активність ферментів навіть в поодиноких клітинах. За допомогою цих методів з'явилася можливість вивчати комплементацию ферментів у цибридів чи інших клітин, а також з'ясувати роль ядра і цитоплазми в механізмі комплементации.

4.4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГЕНІВ У СОМАТИЧНІ КЛІТИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ

Можливість перенесення чужорідної генетичної інформації в соматичні клітини тварин за допомогою метафазних хромосом була доведена Мак-Брайдом О.У. та Озером Х.Л. (1973). Отримані результати перенесення генів, що кодують тимідинкіназу і гіпоксантинфосфорибозилтрансферазу, у соматичні клітини за допомогою метафазних хромосом були підтверджені дослідями *in vitro* іншими дослідниками (рис. 4.2).

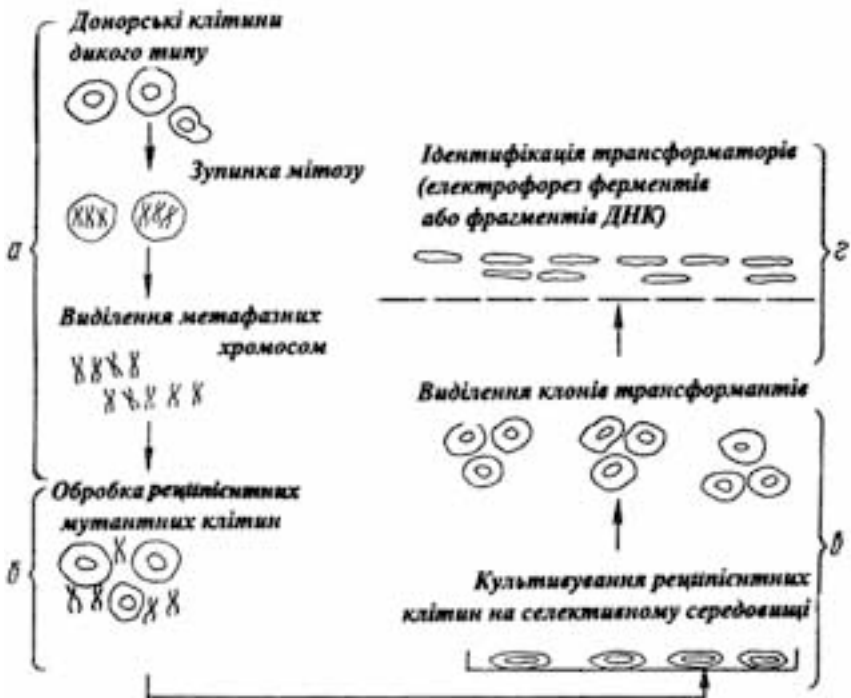


Рис. 4.2. Схема перенесення генів у соматичні клітини з допомогою метафазних хромосом
(за Серовим О.Л., 1985)

З генетичного матеріалу, носіями якого є окремі ізольовані хромосоми, можливе створення «бібліотек» рекомбінантних ДНК. Цей прийом може бути використаний як для картування генів, так і для їхнього виділення. Спроможність методу ізольованих хромосом, який використовують для проведення картування, перевершує метод гібридизації соматичних клітин, але поступається за обсягом і глибиною інформації, що одержують за допомогою прийомів конструювання рекомбінантних ДНК. Ізольовані хромосоми були використані для картування гена α -глобіну людини. Отримані цим методом результати узгоджуються з раніше установленим фактом локалізації гена α -глобіну в хромосомі 16. Щоб широко використовувати метод ізольованих хромосом у вирішенні різноманітних проблем біології і пов'язаних з її досягненнями прикладних наукових напрямів (від вивчення механізмів генної регуляції до проблем медицини і галузей сільського господарства), необхідно мати достатній набір селективних середовищ. Для кожної хромосоми потрібні селектовані маркери такої специфічності і доступності, як для виділення трансформантів (трансформанти — це клітини чи клітинні клони, у яких міститься перенесений за допомогою метафазних хромосом генетичний матеріал). Чужорідний генетичний матеріал, перенесений у реципієнтні клітини, називається трансгеном. Якщо обсяг цього матеріалу такий, що його присутність у реципієнтній клітині визначається цитогенетичним шляхом, говорять про макротрансгеном. Мікротрансгеном — це та кількість перенесеного за допомогою метафазних хромосом генетичного матеріалу, що цитогенетичним шляхом установити неможливо. При цьому варто мати на увазі, що така хромосома людини, як 16, містить ген, який кодує аденінфосфорибозилтрансферазу, 17-ген, що кодує тимідинкіназу, і X-хромосома — ген, що кодує гіпоксантинфосфорибозилтрансферазу.

Перенесення генетичного матеріалу в реципієнтні клітини є багатоступінчастим процесом. Для одержання великої кількості мітотичних клітин їх затримують у стадії мітозу (синхронізація клітин), а потім виділяють метафазні хромосоми, суспензією яких обробляють реципієнтні клітини. Наступна стадія — виділення, розмноження й аналіз трансформантів (ідентифікація ознаки донорського геному в трансформантах). Джерелом мета-

фазних хромосом (донорські клітини) найчастіше є фібробласти первинних культур чи фібробластоподібні клітини первинних ліній клітин жаби, китайського хом'ячка, миші, пацюка, людини, генотип яких відноситься до дикого типу. Еукаріотичні клітини, у яких з донорських клітин за допомогою метафазних хромосом переноситься генетичний матеріал (реципієнтні клітини), є мутантними лініями. У їхніх клітинах не реалізується гіпоксантинофосфорибозилтрансферазна, тимідинкіназна, аденозинфосфорибозилтрансферазна, аргінінсукцинатсинтезазна активність. Про перенесення, що відбулося, макро- чи мікротрансгенома з донорської в реципієнтну клітину свідчить встановлення в останній раніше відсутньої ферментативної активності і здатності цих клітин рости на відповідних селективних поживних середовищах. Перенесений з донорських клітин, що є носіями таких кодуючих генами властивостей, як резистентність до високих концентрацій метатрекса, що виступає як інгібітор дегідрофолатредуктази, а також таких ознак злоякісності, як здатність рости на агаровому середовищі або при низьких концентраціях сироватки, генетичний матеріал у нормальних за цими ознаками реципієнтних клітинах обумовлює індукування властивостей, притаманних донорським клітинам. Це, з одного боку, підтверджує факт перенесення, що відбулося, а з іншого — є прийомом вивчення морфології і біохімії хромосом.

Щоб досягти успіху в перенесенні генів за допомогою метафазних хромосом, насамперед необхідно одержати в моношаровій культурі велику кількість мітотичних клітин. Для цього використовується прийом, що полягає в синхронізації клітин за допомогою введення в середовище колхіцину чи колцеміду (0,06 мкг/мл). Завдяки цьому прийому клітини затримуються на стадії мітозу і в клітинній популяції кількість їх досягає 94–97 %. Зупинені на стадії метафази клітини моношарової культури бувають слабо прикріплені до субстрату і при струшуванні легко відокремлюються від нього і спливають. Клітини ссавців культивуються в культурі при температурі 37 °С, а для вирощування курячих клітин температуру доводять до 41 °С.

Для виконання наступної операції (руйнування клітинної мембрани) метафазні клітини поміщають у гіпотонічний роз-

чин. Висока ефективність руйнування клітинних мембран і звільнення метафазних хромосом досягається при використанні гомогенізаторів типу Даунса чи шприців (5 мл) з тонкою голкою (№ 22), через яку пропускають клітинну суспензію. При виконанні цих операцій використовується нейтральний буферний розчин (рН 7), що складається з трис-НСІ (0,02 моль/л), гексиленгліколю чи детергентів (тритон Х-100, твін-80), а для стабілізації хромосом вводять іони Ca^{2+} ; Mg^{2+} . Усі операції виконуються в стерильних умовах.

Процедура руйнування клітин контролюється фазовоконтрастним мікроскопом. Перевага надається обережному руйнуванню клітинних мембран, тому що при грубій процедурі виділення ушкоджуються не тільки клітинні мембрани, але й хромосоми, структура яких надалі не відновлюється.

Контрольованим параметром при виділенні метафазних хромосом є температурний режим. Відокремлені тим чи іншим способом синхронізовані мітотичні клітини інкубуються у свіжому середовищі при 4 °С, що приводить до інактивації трипси-ну, розчинення можливих залишків колцеміду і спонтанного руйнування тих мікротрубочок, що збереглися після обробки колцемідом. Це знижує здатність хромосом до агрегації і зменшує їхнє забруднення. Наступне центрифугування клітинної суспензії, видалення надосадової рідини пастерівською піпеткою і відмивання осаду нейтральним буферним розчином проводяться при 4 °С. Утворений після чергового центрифугування осад ресуспендують в охолодженому буферному розчині й інкубують 10–15 хв на водяній бані при 37 °С. Операції з руйнування клітин і звільнення метафазних хромосом здійснюються при температурі 37 °С і проводяться якнайшвидше. Для наступних етапів перенесення хромосом необхідна низька температура (4 °С). Кислі буферні системи при одержанні метафазних хромосом використовують рідше, тому що висока концентрація іонів водню в поєднанні з двовалентними катіонами сприяє агрегації залишків цитоплазми, що заважає одержанню чистих препаратів хромосом.

Щоб уникнути забруднення ізольованих метафазних хромосом інтерфазними ядрами і незруйнованими клітинами, проводять цитологічний аналіз отриманих препаратів. У препаратах

ізолюваних хромосом, вільних від забруднюючих компонентів, відношення білок : ДНК дорівнює 2,2, а РНК : ДНК – менше 0,1; ізолювані метафазні хромосоми при температурі 5 °С витримують тривале зберігання без будь-яких помітних змін морфологічних властивостей, хоча молекулярна маса хромосомної ДНК неухильно зменшується, що, очевидно, є наслідком забруднення препаратів хромосом ендонуклеазами. Тому для перенесення генів, як правило, використовують метафазні хромосоми, що містять високополімерну ДНК з молекулярною масою не менше 100 млн., відразу після їхнього виділення.

Клітини-реципієнти на стадії логарифмічного росту обробляють концентрованою суспензією очищених метафазних хромосом. Відношення кількості донорських хромосом, що додаються, до кількості хромосом, що містяться в геномі реципієнтних клітин, складає 1:1. В експериментах за звичай використовується 5–10 млн реципієнтних клітин.

Частота перенесення селектованого гена-маркера ГФРТ китайського хом'яка в клітини миші складає 10^{-7} – 10^{-6} у перерахунку на одну реципієнтну клітину. Для збільшення частоти перенесення генів до суспензії метафазних хромосом у нейтральному фосфатному буфері додають таку кількість хлористого кальцію, щоб його кінцева концентрація досягла 0,125–0,250 М. Відбувається спільне осадження фосфату кальцію і метафазних хромосом. При додаванні їх до моношару реципієнтних клітин підвищується ефективність перенесенню функціонального гена в 10 разів, а сполучення описаного методу з наступною інкубацією моношару реципієнтних клітин у середовищі з 7–10 % кінцевою концентрацією диметилсульфоксиду підвищує ефективність перенесення генів у 100 разів. Використання інактивованого вірусу Сендай при інкубуванні реципієнтних клітин, що знаходяться на стадії метафази, із суспензією донорських хромосом, підвищує ефективність перенесення приблизно в 10 разів, а укладення ізолюваних метафазних хромосом у штучну ліпідну мембрану дозволяє довести ефективність перенесення до 10^{-5} з розрахунку на одну реципієнтну клітину.

Як уже було зазначено, реалізація потенційних можливостей методу перенесення метафазних хромосом у реципієнтні клітини значною мірою гальмується через труднощі, що вини-

кають при їхній ідентифікації. В останні роки запропоновані методи, що дозволили значно підвищити об'єктивність ідентифікації хромосом. Серед цих методів варто назвати послідовне диференціальне фарбування хромосом за Гімза й акрихіном на G/Q-смуги; поділ ізольованих метафазних хромосом на групи за їх розмірами при центрифугуванні в градієнті сахарози. Для масового виділення однотипних хромосом пропонується використання методу фракціонування в градієнті щільності з наступним сортуванням отриманої фракції методом проточної цитометрії. Отриманий таким шляхом хромосомний матеріал призначений для подальшого використання в біологічних експериментах. Фракція, збагачена після центрифугування в градієнті сахарози однотипними хромосомами, потім сортується методом проточної цитометрії, що значно підвищує ефективність цього прийому сортування.

У каріотипі більшість хромосом незначно розрізняються за кількістю ДНК, а використовувані для проточного цитометричного сортування стандартні прилади не можуть ідентифікувати хромосоми, що розрізняються за вмістом ДНК менш ніж на 3–5 %. У зв'язку з цим можна виділити не індивідуальні хромосоми, а їхні основні групи. Так, каріотип людини цим шляхом розділяється на хромосомні групи А, В, С, D, Е, F, і G. Збільшення можливості методу проточної цитометрії до 1 % рівня розходжень, що виявляються у хромосомах у вмісті ДНК, дозволяє при аналізі 24 хромосом людини одержати вже не 7, а 18 окремих піків.

Донорські хромосоми проникають у реципієнтні клітини завдяки фагоцитозу. Є дані, які свідчать про те, що метафазні хромосоми потрапляють у ядро реципієнтних клітин у недеградованому стані і що ці хромосоми в геномі реципієнтної клітини можуть зберігатися тривалий час і мають здатність до автономної реплікації. Однак у лізосомах цитоплазми реципієнтних клітин значна частина донорського хромосомного матеріалу деградує на стадії проникнення.

Результати біохімічного і цитогенетичного аналізів трансформантів дозволяють говорити про два види трансформованого фенотипу. У випадку стабільного фенотипу перенесена ознака при рості трансформантів на неселективному середовищі

зберігається протягом декількох тижнів чи місяців; нестабільний фенотип при вирощуванні трансформованих клітин на не селективному середовищі втрачається. В останньому випадку незважаючи на те, що перенесений у реципієнтну клітину генетичний матеріал метафазних хромосом знаходиться у ядрі і експресується, фізичний зв'язок його з ядром відсутній. Крім того, нестабільний фенотип у популяції трансформованих клітин губиться зі швидкістю 0,1–10 % і більше за клітинний поділ, що також свідчить про незавершеність процесу трансформації.

При більш-менш тривалому культивуванні клітини з нестабільним трансформованим фенотипом поступово переходять у стабільні трансформанти. Дані про можливість переходу сформованого стабільного фенотипу в нестабільний у літературі не наводяться. Що стосується процесу формування стабільного трансформованого фенотипу, то є підстави говорити про включення донорського генетичного матеріалу в хромосоми реципієнтних клітин з одночасним зменшенням обсягу перенесеного в реципієнтні клітини генетичного матеріалу (обсяг цього матеріалу коливається від 1 % (макротрансгеном) до 0,07–0,8 % (мікротрансгеном) і залежить від багатьох факторів).

Один із провідних спеціалістів щодо перенесення генів за допомогою метафазних хромосом Серов О.Л. (1985) вважає, що вивчення таких питань, як механізм включення донорського генетичного матеріалу в геном реципієнтної клітини і механізм клітинної компетенції до трансформації, дозволить за допомогою спрямованого введення генетичного матеріалу здійснювати значні зміни фенотипу реципієнтних клітин.

4.5. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГЕНІВ У ЕУКАРІОТИЧНІ КЛІТИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ ДНК (ДНК-ТЕХНОЛОГІЯ)

Для перенесення генів у соматичні клітини використовують як тотальну ДНК, отриману шляхом очищення препаратів ДНК зі сперми лосося, або ДНК з клітинних ліній найчастіше миші, китайського хом'ячка і людини, так і клоновані гени. При трансформації соматичних клітин, що ростуть у культурі, і му-

тантних ліній, створених на основі клітинних культур, препаратами сумарної ДНК і клонованими генами в більшості випадків як донорські маркерні гени використовуються ТК, HPRT, APRT і DFR, що кодують відповідно ферменти ТК (тимідинкіназу), ГФРТ (гіпоксантинфосфорибозилтрансферазу), АФРТ (аденінфосфорибозилтрансферазу) і ДФР (дегідрофолатредуктазу). Таким чином, для трансформації клітин ссавців у культурі необхідне джерело донорської ДНК, середовище з придатним буфером і маркіровані реципієнтні клітини і (чи) придатне селективне середовище для рідких трансформантів.

При обробці клітинної культури препаратами екзогенної ДНК трансформується приблизно одна з мільйона чи одна з 100 мільйонів (10^{-6} – 10^{-8}) реципієнтних клітин. Одночасно варто нагадати, що частота трансформації соматичних реципієнтних клітин при використанні як вектора метафазних хромосом була, як правило, на один-два порядки вищою. Вирішальне значення для досягнення високої частоти трансформації соматичних клітин екзогенної ДНК мають джерело високомолекулярної ДНК-носія, належним чином забуферене середовище і стан свіжовисіяних реципієнтних клітин.

В експериментах з трансформації як донорську зазвичай використовують отриману із соматичних клітин ДНК, розміри якої перевищують 100 кб, а оптимальною вважається концентрація 500 мкг/мл.

Для підвищення ефективності трансформації Серов О.Л. (1985) пропонує обробляти DEAE-декстраном препарати очищеної вірусної ДНК, що підвищує стійкість останньої до температурної денатурації, гідролітичної дії ДНКаз, що міститься в реципієнтній клітині. Це в остаточному підсумку обумовлює підвищення ефективності трансформації. В останні роки сторазового підвищення ефективності трансформації удалося досягти за рахунок обробки культури соматичних реципієнтних клітин ДНК-кальцій-фосфатним комплексом (преципітатом). Успіх трансформації залежить від реакції середовища, при якій відбувається осадження екзогенної ДНК-кальцій-фосфатним преципітатом, від концентрації ДНК, узятій для утворення комплексу, від обробки реципієнтних клітин диметилсульфоксидом, тривалості інкубації в культурі соматичних реципієнтних клітин з

кальцій-фосфатним преципітатом ДНК. Деякі з перерахованих параметрів не мають універсального трансформуючого ефекту, а збільшують число трансформованих реципієнтних клітин тільки стосовно конкретних клітинних ліній.

Схеми добору для рецесивних і домінантних генів різні. ДНК-кальцій-фосфатний преципітат проникає в реципієнтну клітину в результаті адсорбції комплексу на поверхні клітинної мембрани і активного фагоцитозу, що відбувається в перші години інкубації кальцій-фосфатного преципітату ДНК реципієнтними клітинами. При цьому встановлено, що адсорбція та фагоцитоз є енергозалежними процесами і при інгібуванні клітинного дихання вони пригнічуються. На першу годину інкубації кальцій-фосфатний преципітат ДНК виявляється на цитоплазматичній мембрані, потім у вакуолях цитоплазми, а через 8 год після початку інкубації невелика частина екзогенної донорської ДНК досягає ядра реципієнтних клітин, що знаходяться у культурі. На всіх етапах проникнення в клітину екзогенна ДНК залишається зв'язаною з кальцій-фосфатним преципітатом, а розміри і структура донорської ДНК у клітині-реципієнті зберігаються протягом 24 год з моменту початку інкубації.

Перенесення генів у складі сумарної ДНК у реципієнтні соматичні клітини можливе за допомогою таких переносників, як ліпосоми (фосфоліпідні пухирці) чи тіні еритроцитів, у які попередньо поміщають тим чи іншим способом виділений препарат нуклеїнової кислоти. Цим способом можна одержати більшу кількість трансформованих соматичних клітин, ніж при перенесенні ДНК іншими методами. Крім того, трансформація реципієнтних клітин препаратами сумарної ДНК, попередньо укладеної в ліпосоми, відрізняється порівняною простотою.

Ліпосоми мають слабку токсичність, вони здатні захищати нуклеїнові кислоти, що знаходяться всередині й інші макромолекули від деградації. Немає істотних обмежень на виготовлення ліпосом таких розмірів, що дозволили б укласти в них біополімери з молекулярною масою, що коливається в широких межах (від очищених генів до хромосом). Для забезпечення вибіркової спорідненості до певних реципієнтних клітин і збільшення здатності приєднувати до мембран певних клітинних популяцій поверхні ліпосом можна модифікувати за допомогою гліколіпідів, лекти-

нів або ковалентно зв'язаних антитіл. Висловлюється думка, що використання ліпосом для введення ДНК підвищує ефективність трансформації соматичних клітин і дозволяє проводити дослідження з трансформацією тих клітин, для яких інші способи перенесення ДНК неприйнятні.

З відомих методів виготовлення ліпосом найбільш придатним для перенесення сумарної ДНК у реципієнтні соматичні клітини є метод випарювання з оберненням фаз, коли в ліпосомі може включатися ДНК масою 10^8 дальтон. З метою підвищення ефективності перенесення ДНК ліпосомами в соматичні клітини використовують диметилсульфоксид, етиленгліколь, гліцерол, поліетиленгліколь. Остання з названих речовин підвищує здатність ДНК, що знаходиться в ліпосомах, трансформувати реципієнтні клітини в 10 разів, однак ще більш ефективними є помірні концентрації гліцеролу, у якому витримуються клітини після їхнього контакту з ліпосомами. Є дані про те, що екзогенна ДНК вірусу SV40, поміщена в негативно заряджені ліпосоми, виявляється на три порядки інфекційнішою, ніж у випадку її включення в нейтральні ліпосоми. Що стосується динаміки процесу, то найбільш ефективна трансформація соматичних клітин ДНК, укладеної в ліпосоми, відбувається в перші 30 хв інкубації. Є також приклади, що свідчать про високу ефективність трансформації рослинних протопластів препаратами очищеної ДНК Ті-плазмід, укладеної в ліпосоми.

В останні роки успішно розробляється питання про компетенцію до трансформації препаратами екзогенної ДНК реципієнтних соматичних клітин, що знаходяться у культурі. Переконливі приклади свідчать, з одного боку, про генетичну природу високої компетенції клітин до трансформації, з іншого — показують, що ефективність перенесення екзогенної ДНК залежить від фізіологічного стану реципієнтних клітин, їхньої тканинної природи і диференціації.

Перенесення клонованих і очищених генів у соматичні клітини. При вивченні процесу трансформації соматичних і статевих клітин Серов О.Л. найчастіше використовував клонований ген ТК вірусу герпеса (*Herpes simplex*), для чого обробляв геномну ДНК вірусу рестрикційними ендонуклеазами HpaI і BamHI. Отримані в результаті ферментативного

гідролізу фрагменти ДНК, які містять 8,3 тис. і 3,4 тис. пар нуклеотидних послідовностей, включають ген ТК; іРНК, що утворюється при транскрипції інтактного гена ТК вірусу герпеса, являє собою послідовність, що складається майже з 1,3 тис. залишків нуклеотидів. Крім того, було встановлено, що при біосинтезі ферменту тимідинкінази 107-нуклеотидна ділянка, починаючи від 5¹-кінця, іРНК не транскрибується. Фрагменти геномної ДНК вірусу герпеса, що включають ген ТК, клонують, використовуючи як вектор плазмиди і фаги.

Трансформацію соматичних і статевих клітин геном ТК здійснюють за допомогою рекомбінантних ДНК, сконструйованих шляхом вбудовування фрагментів ДНК вірусу герпеса, що містять ген, який кодує тимідинкіназу. Щоб збільшити ефективність трансформації, соматичні чи статеві клітини обробляють очищеними чи клонованими генами шляхом осадження донорської ДНК кальцій-фосфатним методом. У цьому випадку вдається домогтися введення очищеного або клонованого гена в одну з кожних 10⁵–10⁷ оброблених реципієнтних клітин.

Більш ефективним у порівнянні з описаним методом перенесення генів є введення мікроголкою ДНК, що знаходиться в розчині, у ядра реципієнтних клітин. У цьому випадку трансформується 50–100 % оброблених клітин. Така ж частота трансформації досягається й у тому випадку, коли ядро тільки проколюється мікроголкою. ДНК, що представляє очищений чи клонований ген, у цьому випадку не вводиться безпосередньо в ядро, а використовується для обробки клітин ссавців, що знаходяться в культурі. З інших методів, за допомогою яких переносяться клоновані чи очищені гени в соматичні реципієнтні клітини ссавців, варто вказати на можливість обробки реципієнтних клітин включеними в ліпосоми препаратами ДНК чи високими концентраціями поліетиленгліколю; в останньому випадку вдається домогтися частоти трансформації, порівняної з показником, досягнутим при застосуванні методу мікроін'єкції розчину ДНК у ядро реципієнтної клітини.

Варто також звернути увагу на метод котрансформації, який набуває широкого розповсюдження при введенні в реципієнтні клітини чужорідних неселектованих генів чи фрагментів ДНК. Розробляється також спосіб трансформації реципієнтних

клітин за допомогою електричного розряду в полі високої напруги.

Якщо при трансформації як донорський використовується очищений або клонований ген, що кодує тимідинкіназу, то реципієнтними є мутантні клітини, які знаходяться в культурі, у геномі котрих відсутній ген ТК, а для поділу трансформованих і нетрансформованих клітин використовують селективне середовище ГАТ (рис. 4.3). Трансформовані геном ТК реципієнтні клітини здатні рости на середовищі ГАТ, нетрансформовані — гинуть. Істотний вплив на частоту перенесення клонованого гена ТК вірусу герпеса в еукаріотичні реципієнтні клітини робить наявність чи відсутність ДНК-носія. Трансформація клонованим геном ТК вірусу герпеса реципієнтних клітин китайського хом'ячка без ДНК-носія виявилася більш ніж у 200 разів нижчою порівняно з дослідями, у яких клонований ген ТК вірусу герпеса в реципієнтні клітини переносили за участю ДНК-носія. Роль ДНК-носія, на думку дослідників, полягає в захисті

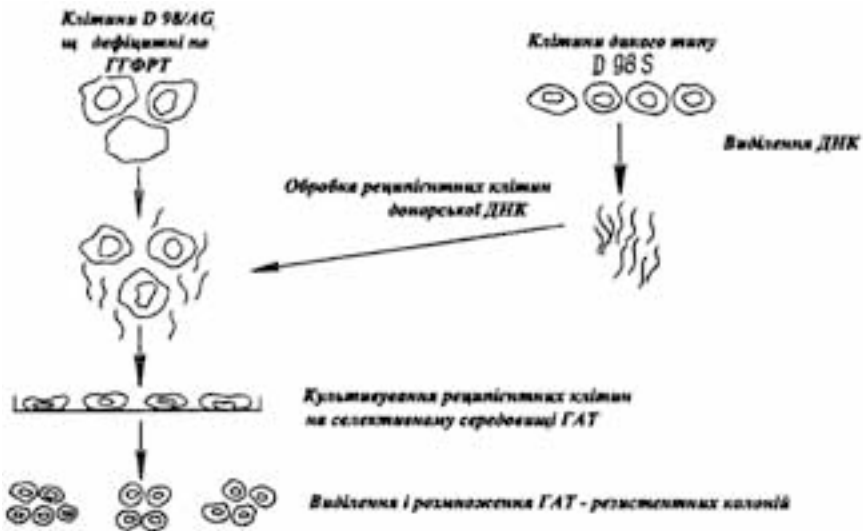


Рис.4.3. Схема експериментів по трансформації соматичних клітин з допомогою ДНК
(за Шибальською Є. та Шибальським В., 1982)

клонованого чи очищеного гена, що переноситься, від деградуючого впливу гідролітичних ферментів реципієнтних клітин. Успіх введення очищених чи клонованих генів у соматичні клітини за допомогою кальцій-фосфатного методу значною мірою залежить від концентрації донорської ДНК. Хоча чимало механізмів участі ДНК-носія в забезпеченні успіху трансформації реципієнтних клітин очищеним чи клонованим генетичним матеріалом, а також роль ДНК-носія у формуванні трансгенома залишаються нез'ясованими, факт зміни структури очищених чи клонованих генів, введених у реципієнтні клітини в присутності ДНК-носія, вважається установленим. Установленим, мабуть, варто вважати також те, що структурні зміни екзогенного клонованого генетичного матеріалу при формуванні трансгенома спостерігаються лише в тому випадку, якщо одночасно в реципієнтну клітину надходить ДНК-носіє. Роль останньої полягає в тому, що структурні зміни, яким піддаються селектовані гени від подальшої деградації захищаються ДНК-носієм шляхом включення селектованого генетичного матеріалу в структуру ДНК-носія і створення трансгенома, що має нові властивості. За відсутності ДНК-носія селектовані гени, в яких під впливом в основному ферментативної дії клітин-реципієнтів відбулися структурні зміни, елімінують, а в реципієнтній клітині залишаються введені інтактні очищені чи клоновані гени.

У зв'язку з цим у трансформованих клітинах одночасно можуть знаходитися інтактні молекули екзогенної ДНК і молекули ДНК, в яких відбулися структурні зміни. Трансформовані за допомогою сумарної ДНК реципієнтні клітини характеризуються фенотипом, що може мати стабільний чи нестабільний прояв. Є дані, які свідчать про те, що стабілізація трансформованого фенотипу є наслідком ампліфікації донорського гена чи включення цього гена в геном реципієнтної клітини, хоча поряд з цим є можливість функціонування механізмів, що перешкоджають включенню екзогенної ДНК у геном клітини-реципієнта.

Появу стабільних трансформантів спостерігали при інтеграції донорського генетичного матеріалу, у тому числі ДНК клонованих генів, у хромосоми реципієнтних клітин, що приводило до дестабілізації останніх і виникнення у зв'язку з цим великої кількості хромосомних перебудов. В утворених у резуль-

таті інтеграції донорських генів, введених у геномний матеріал реципієнтних клітин як за допомогою тотальної ДНК, так і очищених чи клонованих генів, у стабільних трансформантах через їхню нестійкість настає процес дестабілізації. Цей процес не завжди є наслідком втрати інтегрованого донорського гена, іноді змінюється експресія донорського гена, у зв'язку з чим трансформований фенотип не реалізується.

Взаємозв'язок між станом трансгеному (стабільне – нестабільне), частотою інтеграції донорського генетичного матеріалу в геном реципієнтної клітини і частотою порушення стабільності трансгеному в стабільних трансформантах, з одного боку, та ступенем диференціації і станом каріотипу реципієнтних клітин – з іншого, прослідковується досить чітко. Так, лінії реципієнтних клітин, що мають змінені гетероплоїдні каріотипи (фібробластоподібні клітини), здатні зберігати у своїх геномах донорський генетичний матеріал, що автономно реплікується, з нестабільним трансформованим фенотипом і дестабілізувати трансформований фенотип у стабільних клонах. Навпаки, у реципієнтних клітинах із близьким до нормального чи нормальним каріотипом (статеві клітини) немає умов, що сприяють перебуванню трансгеному в нестабільному автономному стані. Тому при трансформації реципієнтних статевих клітин екзогенною ДНК спостерігається велика кількість стабільних трансформантів.

4.6. ВВЕДЕННЯ ГЕНІВ. БІОТЕХНОЛОГІЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ СТАТЕВИХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН ЧУЖОРІДНИМИ ГЕНАМИ

Успіхи молекулярної біології, генетичної і клітинної інженерії дозволили вже сьогодні вирішувати питання спрямованої трансформації еукаріотичних організмів, у тому числі ссавців. Стратегічна мета спрямованої трансформації: конструювання геномів вищих організмів (рослин і тварин). Одним із прийомів генетичної і клітинної інженерії є введення генів у статеві клітини. Внаслідок трансформації статевих клітин відбуваються фенотипічні зміни трансформанта на рівні усього організму, а

також передача генетичної інформації, що набула зміни, від батьків до нащадків.

Серов О.Л. наводить дані про виявлення донорського генетичного матеріалу в організмі, що розвився з трансформованих статевих клітин, поводження трансгеному і насамперед експресію донорського гена в ході розвитку реципієнтної клітини (статевої), зміни фенотипу, у тому числі і на рівні цілого організму, що обумовлено присутністю в геномі реципієнта трансформанта (донорського генетичного матеріалу).

Гордон Д.В. зі співробітниками (1980) вперше успішно трансформували запліднену яйцеклітину миші клонованим геном ТК вірусу герпеса.

Для введення донорського генетичного матеріалу використовували реципієнтні яйцеклітини протягом 12–14 год на початку запліднення. Яйцеклітини, що знаходяться в цей час на стадії двох пронуклеусів, вилучали з яйцеводів вимиванням. За донорський матеріал слугували рекомбінантні ДНК, сконструйовані на основі плазмід (pST6, pST12, pST9 і ін.), до складу яких входив ген ТК вірусу герпеса, що кодує тимідинкіназу і ту ділянку вірусу SV40, який містить нуклеотидні послідовності, що несуть на синтезованій іРНК сигнали початку реплікації, і нуклеотидні послідовності, що є промотором ранніх білків.

Наступний етап трансформації — введення в пронуклеус заплідненої реципієнтної яйцеклітини за допомогою мікроголки і мікроманіпулятора 1 мкл розчину рекомбінантної ДНК. Як вказує Серов О.Л., з оброблених у такий спосіб яйцеклітин тільки 6–10 % здатні до подальшого розвитку, а з цієї кількості приблизно половина досягає зрілого віку. Аналіз рестрикційного спектра ДНК народжених із трансформованих яйцеклітин мишенят дозволив зробити висновок про те, що плазміди можуть виконувати векторну функцію при введенні клонованих генів у статеві клітини, а з трансформованих яйцеклітин розвиваються особини, що протягом внутрішньоутробного і постнатального онтогенезу зберігають донорський генетичний матеріал.

Пізніше була показана можливість трансформації запліднених яйцеклітин за допомогою мікроін'єкцій клонованих генів β -глобіну людини і вірусу герпеса, що кодує тимідинкіназу (ТК). У цьому випадку експериментатори вводили в запліднену

яйцеклітину близько 2,5 тис. копій плазмід PtkH β 1, до складу рекомбінантної молекули ДНК якої входив фрагмент із 7,9 тис. нуклеотидних пар, що кодує β -глобін людини (ген β -глобіну людини), і фрагмент ДНК, який містить нуклеотидну послідовність з 3,6 тис. пар нуклеотидів, що кодує ТК вірусу герпеса.

В отриманих із запліднених трансформованих яйцеклітин ген β -глобіну людини знаходився в кількості 3–50 копій, а ген, що кодує тимідинкіназу вірусу герпеса — у кількості 3–20 копій. Крім того, виявлення донорського генетичного матеріалу (ген ТК вірусу герпеса) у складі фракції високомолекулярної ДНК, виділеної з клітин реципієнтного організму, дає підстави вважати, що донорський генетичний матеріал був інтегрований у геном реципієнта. У дослідних мишей, одержаних із ін'єкційованих чужорідним генетичним матеріалом (плазмідна PtkH β 1, гени ТК вірусу герпеса і ген β -глобіну людини) запліднених яйцеклітин, чітко виявлявся також ген β -глобіну людини.

У ході цих експериментів був установлений факт передачі донорського генетичного матеріалу, знайденого в клітинах селезінки мишей, що розвинулися з трансформованих чужорідних ДНК яйцеклітин, в організм потомства, отриманого при спарюванні трансформантів з нормальними мишами. Дуже важливим моментом варто вважати виявлення функціональної активності чужорідних генів, які знаходяться в організмі трансформантів, що виявляється насамперед експресією цих генів.

Прямий шлях уведення клонованих генів у ембріони, що знаходяться на ранніх стадіях розвитку, без використання вірусних чи плазмідних векторів дав позитивні результати. Донорські гени у функціонально активному стані (вони експресувались) були виявлені в соматичних клітинах, отриманих із запліднених яйцеклітин після їхньої трансформації фрагментом ДНК, що кодує ген кролячого β -глобіну. При трансформації запліднених яйцеклітин або ембріонів на ранніх стадіях розвитку чужорідним генетичним матеріалом у складі плазмідних векторів чи без них, далеко не всі клітини рослинного чи тваринного організму-трансформанту, що розвинулись із трансформованої заплідненої яйцеклітини чи ембріона, містять чужорідний ген.

Існує така імовірність, що чужорідний ген виявиться не тільки в соматичних, але й у деяких статевих клітинах організму чи особин, що розвинулися з трансформованої заплідненої яйцеклітини або трансформованого на ранній стадії розвитку ембріона. Присутність фрагментів чужорідної ДНК, що представляє нуклеотидну послідовність того чи іншого гена, у статевих клітинах часто призводить до того, що деяка частина потомства, отриманого від певної особи, успадкує разом з іншими генами батьків внесений чужорідний гетерологічний ген. У такому випадку цей ген уже буде присутній у всіх клітинах, у тому числі й у статевих, а отже, передаватиметься наступним поколінням і у випадку прояву його функціональної активності обумовлюватиме фенотипічні зміни організму. Аналіз результатів досліджень дозволив Серову О.Л. зробити висновок про те, що найбільш вузьким місцем при трансформації статевих клітин є експресія гетерологічних генів у трансформантів. У зв'язку з цим пропонується конструювання таких векторів рекомбінантних ДНК, до складу яких, крім клонованих чужорідних генів, входили б нуклеотидні послідовності, що здійснюють регуляцію генної активності. Для досягнення цієї мети проводяться дослідження з включенням в рекомбінантні ДНК, поряд з чужорідними клонованими генами, промоторних ділянок вірусів, які адаптовані до життєдіяльності в клітинах еукаріотичних організмів і мають тісний структурний взаємозв'язок з їх геномами. При конструюванні здатного до експресії реплікону в складі вектора пропонується використовувати промоторні й інші регуляторні послідовності ДНК вищих організмів.

На підтвердження наводиться приклад створення рекомбінантної кільцевої молекули, сконструйованої з використанням генетичного матеріалу плазмід і фагів, у якій успішна експресія клонованого гена в трансформантах досягалася за рахунок убудовування по ходу транскрипції перед клонованим геном нуклеотидної послідовності вірусу SV40, що містить сигнал початку реплікації і промоторні нуклеотидні послідовності ранніх чи пізніх білків. Пропонується як промотори чужорідних клонованих донорських генів використовувати кінцеві послідовності ДНК вірусів. Є позитивні приклади експресії чужорідних генів (ген ТК вірусу герпеса), промоторна ділянка яких є

промотором гена МТ1 миші (ген МТ1 кодує білкові речовини металотіонеїну, синтез якого індукується ртуттю, кадмієм і іншими важкими металами). У клітинах печінки і нирках мишачого потомства, що розвинулося із запліднених яйцеклітин, трансформованих рекомбінантними ДНК, до складу яких входили плазмідні рМК і ген ТК вірусу герпеса, з яким по ходу транскрипції з'єднаний промотор гена МТ1 миші, виявляли високу активність ферменту тимідинкінази вірусу герпеса. Цей факт свідчить про експресію гена ТК вірусу герпеса за участю промотора гена МТ1 миші, тобто промотора еукаріотичного гена. Експресія прокаріотичного гена ТК вірусу була встановлена не тільки в потомства, що народилося з трансформованої заплідненої яйцеклітини, але й в окремих особин з потомства, отриманого при спарюванні трансформованих мишей з інтактними тваринами. При цьому функціональний стан клонованого гена, що кодує тимідинкіназу вірусу герпеса, ін'єкційованого в запліднену яйцеклітину миші у вигляді рекомбінантної ДНК, сконструйованої на основі плазмідного рМК, і промоторної ділянки еукаріотичного гена МТ1 миші, визначається регуляторною ділянкою промотора гена МТ1 миші: солі кадмію стимулюють експресію гена ТК вірусу герпеса, а метилування промоторної ділянки (гена МТ1 миші), навпаки, гальмує цей процес.

Зусиллями (Палмітер Р.Д. та ін., 1982, 1983, Дибан А.П., Городецький С.І., 1983) були сконструйовані рекомбінантні ДНК, що складаються з клонованих генів гормону росту пацюка і людини, промоторної ділянки гена МТ1 миші та плазмідного вектора. Введені в реципієнтні запліднені яйцеклітини шляхом мікроін'єкцій у пронуклеус рекомбінантні ДНК проявляли свою фізіологічну активність як у мишей-трансформантів, так і їхніх нащадків.

Клонований донорський ген гормону росту пацюка і людини експресувався у печінковій тканині трансформантів, що означало підвищення вмісту гормону росту в сироватці крові, а також по фізіологічній дії додаткових генів соматотропного гормону, які передаються спадково, що проявлялося прискореним ростом трансформованих мишей і перевищенням середньої маси тіла тварин у 1,8 раза. Це дуже важливо для тваринництва.



Контрольні питання

1. Що таке клітинна інженерія?
2. Які проблеми вирішуються за допомогою клітинної інженерії?
3. Яка основна властивість еукаріотичних клітинних культур?
4. Назвіть нині існуючі гіпотези старіння і загибелі клітин.
5. Які параметри умов культивування впливають на функціональний стан клітин у культурі?
6. На яких типах поживних середовищ вирощуються клітини?
7. Назвіть основні складові поживного середовища.
8. Додаванням яких речовин до поживного середовища можна підвищити здатність клітин до поділу?
9. Як називаються речовини, що підвищують здатність клітин до поділу?
10. Що таке контактне гальмування (топоінгібування)?
11. За участю яких факторів здійснюється регуляція росту клітин у культурі?
12. Якими методами можна отримати клітинну масу для культивування?
13. Які ферменти використовуються для руйнування клітинної стінки?
14. Що таке гібридизація соматичних клітин?
15. Які клітини називаються гібридними?
16. Де застосовується метод соматичної гібридизації?
17. Які властивості має гібридома?
18. Хто є основоположниками гібридомної технології?
19. Назвіть основні чинники, що збільшують або, навпаки, блокують процес злиття клітин.
20. Які методи добору гібридних клітин ви знаєте?
21. Що таке цитопласти?
22. Що означає термін каріопласти?
23. Що таке енуклеація?

24. Які методи енуклеації застосовуються для одержання каріопластів?
25. Назвіть властивості цитопластів і каріопластів.
26. Як проводиться трансплантація ядер?
27. Як відбувається процес реконструювання клітин?
28. Від чого залежить ефективність реконструювання клітин?
29. Назвіть етапи введення ізольованих інтерфазових ядер, укладених у ліпідну оболонку, у соматичні клітини.
30. Що таке цибриди?
31. Назвіть основні технологічні прийоми отримання цибридів.
32. Суть та потенційні можливості методу перенесення екзогенного генетичного матеріалу в реципієнтну клітину за допомогою метафазних хромосом.
33. Що таке «бібліотеки» рекомбінантних ДНК та сфера застосування цього прийому?
34. Що таке макротрансгеном?
35. Що означає мікротрансгеном?
36. Назвіть чинники, які впливають на процес проникнення донорських хромосом у реципієнтні клітини.
37. Стадії перенесення генетичного матеріалу в реципієнтні клітини.
38. За допомогою яких критеріїв здійснюється контроль перенесення генетичного матеріалу з донорської клітини за участю метафазних хромосом?
39. Яка ДНК використовується для перенесення генів у соматичні клітини?
40. Наявність яких основних чинників необхідна для трансформації клітин ссавців у культурі?
41. Як досягається підвищення ефективності трансформації?
42. Які існують схеми добору для рецесивних і домінантних генів?
43. Які переносники використовуються для трансплантації генів у складі сумарної ДНК у реципієнтні соматичні клітини?
44. Назвіть методи перенесення клонованих генів у соматичні клітини.

45. Що таке спрямована трансформація?
46. З якою метою проводиться спрямована трансформація еукаріотичних організмів, в тому числі ссавців, шляхом введення генів у статеві клітини?
47. Коли вперше була успішно проведена трансформація яйцеклітини?
48. Які клітинні елементи було використано як донорський матеріал при трансформації яйцеклітини?
49. Що є вектором при введенні клонуваних генів у статеві клітини?
50. Назвіть етапи трансформації.
51. Яке середовище використовується для розділення трансформованих і нетрансформованих клітин?
52. Які наслідки трансформації?
53. Наукове значення трансформації.
54. Прикладне значення трансформації.

ОСНОВИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

5.1. БІОТЕХНОЛОГІЯ КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Найбільших успіхів біологічна наука досягла за останні сорок років, коли дослідники знайшли шляхи проникнення усередину живої клітини з метою вивчення біологічних процесів на рівні молекулярних взаємодій. Стало очевидним, що в кінцевому підсумку механізми, які в основі багатьох біологічних явищ визначаються функціонуванням спеціальних молекул усередині і поза клітиною, а розкриття молекулярних механізмів біологічних процесів та вивчення молекулярних взаємодій складає предмет молекулярної біології.

Молекулярні біологи за досить короткий термін опанували прийоми, що дозволяють маніпулювати біологічними молекулами, досліджувати їх і вносити зміни в первинну структуру. Вивчення життя як кінцевого продукту еволюції перестало бути вищою метою біологічних досліджень. Завдяки новій технології, новим підходам з'явилася можливість за рахунок внесення змін у головні біологічні молекули створювати варіанти живих систем, що не могли з'явитися шляхом природної еволюції.

Успішний розвиток молекулярної біології сприяв виникненню генетичної інженерії, що є біотехнологічним прийомом спрямованого конструювання рекомбінантних молекул ДНК на основі ДНК, узятих з різних джерел (*Алиханян С.И., 1980; Овчинников Ю.А., 1982*). Біотехнологія — це використання біологічних процесів і агентів для промислових цілей (*Овчинников Ю.А., 1982*).

Становленню технології одержання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів передувало створення методів молекулярної біології, за допомогою яких молекулу ДНК уда-

ється розрізати на фрагменти, модифікувати, знову реконструювати в одне ціле, розмножити макромолекулу й одержати велику кількість її копій. Використовуючи рекомбінантну молекулу ДНК, можна синтезувати молекули РНК, а потім одержати білок необхідного розміру, будови і властивостей. Одержання білка — одна з головних цілей біотехнології.

Точно вказати, де закінчується молекулярна біологія і починається генетична інженерія, а також, які методичні прийоми притаманні тільки генетичній інженерії чи біотехнології, неможливо.

5.1.1. Одержання фрагментів ДНК

Вивчення загальних біохімічних властивостей клітинної ДНК хоча й давало певну інформацію, однак установити деталі її генетичної організації було неможливо. У середині 70-х років ХХ ст. були широко поширені два методи, використання яких істотно спростило аналіз ДНК. В основі одного з цих методів лежить відкриття гідролітичних ферментів — рестрикційних ендонуклеаз (рестриктаз), що викликають розщеплення ДНК на фрагменти в місцях, які мають специфічні нуклеотидні послідовності, що є у молекулі ДНК.

Для вирішення питань молекулярної біології рестриктази одержують з бактеріальних клітин. Так, фермент рестрикційна ендонуклеаза EcoRI розщеплює ДНК тільки в тих місцях, де є GAATTC-нуклеотидна послідовність; рестриктаза SmaI гідролізує ДНК у місцях CCCGGG-послідовності нуклеотидів, а місцем ферментативної дії BamHI є GGATTC-сполучення нуклеотидів. Другі рестриктази гідролізують інші нуклеотидні послідовності. Послідовності, які пізнаються і гідролізуються цими й іншими рестрикційними ендонуклеазами, ймовірно зустрічаються уздовж дволанцюгової структури ДНК. Ферменти рестрикції дозволяють перетворити макромолекулу ДНК у набір фрагментів, що включають від декількох сотень до декількох тисяч пар азотистих основ. Фрагменти, що розрізняються між собою за молекулярною масою, можна одержати в ізольованому вигляді за допомогою електрофорезу в гелі, а потім провести аналітичне дослідження кожного з виділених фрагментів.

Другим методичним прийомом є порівняно швидке визначення нуклеотидної послідовності утворених під впливом рестриктаз фрагментів ДНК і макромолекули в цілому. Однак у цьому випадку виникають певні труднощі через те, що кількість пар азотистих основ, які складають нуклеотидну послідовність ДНК, навіть у бактеріальній клітині завелика. Що стосується геному ссавців, який має набагато більший розмір, то він складається приблизно з 2,5 млрд. пар азотистих основ; останні, у свою чергу, формують окремі інформаційні блоки-гени. Кількість їх у геномі ссавців досягає 50–100 тис.

Є дані, що кожен ген визначає структуру білка. У зв'язку з цим доцільним було провести дослідження нуклеотидної послідовності в молекулі ДНК біологічних об'єктів, геном яких за розміром набагато менший, ніж геном клітини еукаріот. Об'єктами були використані віруси. У 1979 р. удалося визначити повну послідовність нуклеотидів у геномі вірусу мавп SV40. Установлено, що геном цього вірусу складається з 5243 пар азотистих основ, організованих у п'ять окремих генів. Вибір об'єкта виявився вдалим ще й тому, що аналіз окремих генів не був ускладнений присутністю великого надлишку неспоріднених послідовностей. Крім того, у клітині внаслідок розмноження вірусу одночасно знаходиться декілька сотень тисяч копій його геному, що значно полегшує процедуру відокремлення вірусної ДНК від ДНК клітини-хазяїна. Завдяки тому, що генетичний код трансляції послідовності нуклеотидів у послідовність амінокислот уже був розшифрований, стало можливим побудувати послідовність амінокислот у молекулах білків, що кодовані усіма п'ятьма генами вірусу SV40.

Одночасно зі з'ясуванням послідовності нуклеотидів у молекулі ДНК вірусу SV40 було знайдено ділянки, що не належать до ділянки структурного гена, тобто ділянки, що не кодують білки, а беруть участь у регуляції експресії генів і реплікації вірусної ДНК.

Молекулярні біологи розробили методи виділення генів донорських організмів, введення генів у векторну молекулу й одержання рекомбінантних (гібридних) ДНК, забезпечення самовідтворення рекомбінантних ДНК, тобто їхньої реплікації, перенесення гібридних ДНК в організм реципієнта (клітини-хазяїна) і забезпечення експресії чужорідних генів.

5.1.2. Плазмідні і вірусні як донорні переносники генетичної інформації

У молекулярній біології і генетичній інженерії як вектор (переносник) генів, що не мають аналогів у ДНК клітині-реципієнта, і тому не здатні брати участь у гомологічній рекомбінації, найчастіше використовують плазмідні і фаг λ. Плазмідні — це невеликі кільцеві молекули позахромосомної ДНК, що, на відміну від класичних генів, знаходяться в цитоплазмі бактеріальних клітин і клітин деяких дріжджів. У зв'язку з цим плазмідні часто називають екстрахромосомними генетичними елементами. Автономне існування плазмід пов'язане з тим, що механізми, які лежать в основі їхньої реплікації, незалежні від механізмів, що регулюють розмноження бактеріальної хромосоми. Плазмідні мають здатність вбудовуватися в геном клітини-хазяїна і знаходитися нескінченно довго в інтегрованому з ДНК бактерії стані. У цьому випадку генетичний матеріал плазмід поводить подібно хромосомним генам бактерії, у які вона вмонтувалася. Відомі сьогодні плазмідні розрізняються між собою розмірами, що є наслідком неоднакового обсягу генетичної інформації, що міститься у них; різними механізмами регуляції їхньої реплікації, що залежать від розходжень у ферментних системах, що забезпечують ці механізми. Залежно від молекулярної маси плазмідні поділяються на дрібні (середня молекулярна маса 5×10^6) і великі (приблизно встановлена гранична молекулярна маса $150-10^6 - 170-10^6$).

До складу молекули плазмідної ДНК входить від 2250 до 400 тис. пар нуклеотидів. У клітинах бактерій кращою є конфігурація ДНК у вигляді дволанцюгових ковалентно закритих кільцевих надспіральных і дволанцюгових відкритих кільцевих молекул ДНК. Конфігурація дволанцюгової ковалентно закритої кільцевої структури, що при скручуванні перетворюється у надспіраль, характеризується високою стійкістю і зберігається в конформаційно зміненому стані навіть при впливі несприятливих факторів (наприклад, лужних розчинів). Плазмідні в бактеріальних клітинах найчастіше знаходяться у вигляді ковалентно закритих кільцевих надспіральных структур і відкритих кільцевих молекул ДНК. Відкриті кільцеві молекули утворюються внаслідок розриву фосфодіефірних зв'язків в одному з

ланцюгів. Вони не утворюють надспіральної структури, знаходяться в релаксованому (розслабленому) стані, менш стабільні при впливі несприятливих факторів, а в лужних розчинах дволанцюгова структура швидко деградує через розрив водневих зв'язків.

У бактеріальній клітині одночасно можуть знаходитися плазмідні одного чи різних типів. Кількість копій дрібних плазмід буває, як правило, більше десяти; великі плазмідні в більшості випадків представлені однією чи двома копіями з розрахунку на одну бактеріальну клітину. Визначено, що на долю плазмід припадає близько 1–10% клітинної ДНК. Так, якщо виходити з того, що в клітині *E.coli* міститься 10 дрібних плазмід, молекулярна маса кожної з яких $5 \cdot 10^6$, а молекулярна маса хромосомної ДНК $2 \cdot 10^9$, то в плазмідах виявляється зосереджено 2% клітинної ДНК. Обсяг інформації, зосереджений у дрібних плазмідах, дозволяє їм кодувати молекули двох великих білків; у великих плазмідах, можливо, кодують достатні для більш ніж 200 великих білків. Наявність деяких загальних ознак з помірними фагами дає підставу припускати існування однієї і тієї самої молекули ДНК у різних фазах — плазмідній і фаговій. Відомо, наприклад, що фаг λ найчастіше функціонує, убудовуючи свою молекулу ДНК у хромосомну ДНК бактеріальної клітини; фагова ДНК може також відтворюватися автономно, як розмножуються плазмідні. Крім бактерій, дрібні кільцеві молекули ДНК (діаметр 1,1–2 мкм) зустрічаються в цитоплазмі клітин еукаріот (дріжджах, *Neurospora*, *Euglena*, трипаносомах, у клітинах тютюну, дрозоді, шпорцевої жаби, а також у культурах клітин мишей, мавп, людини). На сьогодні вивчені фізико-хімічні властивості цих ДНК, однак їх походження і біологічна роль поки не визначені.

У 50-і роки ХХ ст. зусиллями Д. Ледерберга була виявлена екстрахромосомна генетична структура бактерій, що спочатку була відома як фактор фертильності, кон'югації, генетичного перенесення. Для позначення цієї структури був запропонований символ F. Клітини, що є носіями цього фактора, стали називати клітинами F⁺; у тих випадках, коли в клітині названий фактор був відсутній, її позначали F⁻. Крім того, стало відомо, що при кон'югації бактерії двох штамів, клітини, що містять фактор

F, завжди виступають як донор генетичного матеріалу, клітини F⁻ — як реципієнт. Передача генетичного матеріалу від клітини-донора до клітини-реципієнта відбувається за рахунок кон'югації (аналог статевого процесу в бактерій), а структурою, що має властивості статевого фактора, виявився фактор F. Останній у зв'язку з його екстрахромосомною (цитоплазматичною) локалізацією, за пропозицією Ледерберга Д., стали називати плазмідом. У такий спосіб було встановлено, що плазміда F зумовлює тільки одну властивість бактерій, що є її носіями, — виступати як донор генетичного матеріалу. Виявлені іншими дослідниками позахромосомні фактори, подібні з F-плазмідами (плазміди Δ, T, FP, P), надають утримуючим їх клітинам здатність донорів генетичного матеріалу, а також мобілізують перенесення у клітини-реципієнти інших некон'югованих плазмід.

Плазміди детермінують стійкість бактеріальних клітин до одного чи одночасно до декількох ліків і останнім часом широко розповсюджені; їхніми носіями є майже усі види патогенних для людини і тварини бактерій.

Синтез коліцинів клітинами *E.coli* знаходиться під контролем плазмід Col. Розрізняють кілька видів коліцинів A, B, C, D, E та ін. Серед деяких з названих коліцинів, у свою чергу, виділяють такі варіанти як, наприклад, коліцин E1, E2, E3. Тому в назвах відповідних плазмід, крім символу Col, зазначаються назва синтезованого кишковою паличкою відповідного виду і варіанта коліцину — ColE1, ColE2 і т.д. Синтез подібних за біологічним значенням з коліцинами речовин (піоцинів) детермінується плазмідами, що містяться в псевдомонадах; стафілококові плазміди контролюють синтез стафілокоцину, плазміди картопляної палички — мегацину і т.д. Загальною властивістю усіх бактеріоцинів є їх висока біологічна активність. Для гальмування життєдіяльності бактеріальної клітини достатньо декількох молекул бактеріоцину (висока ефективність поширюється лише на бактерії аналогічного чи близького виду). Коліциногенні (бактеріоциногенні) плазміди і детерміновані ними ефекти поширені серед бактерій, але не так часто, як R-плазміди.

Деякі плазміди (Ent, Hly, K88, K99) локалізуються тільки в клітинах ентеропатогенних штамів *E.coli*. Так, низькомолеку-

лярний термостабільний і високомолекулярний термостабільний ентеротоксини синтезуються під контролем плазмід Ent. Залежно від того, чи одна з двох плазмід знаходиться у клітині чи їхній комплекс, клітини кишкової палички синтезують один із двох названих ентеротоксинів, або обидва види ентеротоксинів одночасно. Синтез α і β -гемолізинів (білкових речовин, що викликають гемоліз еритроцитів) ентеропатогенними клітинами кишкової палички детермінується плазмідами H1u α і H1u β відповідно. Вони, як і плазмиди Ent, можуть знаходитися у клітині як поодиночі, так і обидві одночасно. У зв'язку з цим клітина синтезує один із двох названих ентеротоксинів, або обидва види одночасно. Спільне перебування у клітині плазмід K88 і K99, що контролюють синтез поверхневих антигенів 88 і 99, з плазмідами Ent підвищує патогенність таких клітин бактерій. У клітинах багатьох штамів *Pseudomonas putida* локалізовані плазмиди, кожна з яких детермінує біосинтез ферменту для утилізації якогось одного класу вуглеводнів. Так, плазмиди SAL розщеплюють саліцилову кислоту, XYL — ксилол і толуол, NAN — нафталін, CAM — камфору, OCT — октан, гексан і декан. Усі названі плазмиди вдається ідентифікувати за контрольованими ними ознаками, які виявляються фенотипічно. Плазмиди, існування яких у клітинах бактерій фенотипічно не виявляється (а для їхньої ідентифікації необхідне застосування біохімічних методів), називаються критичними. Ці плазмиди ще мало вивчені.

Перш ніж плазмиди стали використовувати як незамінні об'єкти молекулярної біології і генетичної інженерії, були вивчені їхня загальна і спеціальна функції. У всіх видів плазмід виявлені такі загальні функції, як здатність реплікуватися (rep), несумісності (inc), перенесення (tra — від англ. transfer — перенесення).

Плазмиди — це молекули ДНК, тому за рахунок реплікації регулярно збільшується кількість плазмідних копій і вони рівномірно розподіляються між нащадками бактеріальної клітини, що ділиться. Найкраще вивчено механізм реплікації дрібної плазмиди ColE1, що представлена у клітині, як правило, великим числом копій (Зенгбуш П., 1982). У процесах ініціації й елонгації беруть участь продукти хромосомних генів, а для реплі-

кації ColE1 необхідні ДНК-полімераза III і ДНК-полімераза I. Останній фермент у реплікації хромосомної ДНК кишкової палички участі не бере, а використовується там у репараційних цілях. Висловлюється думка про те, що тільки початок реплікації плазмиди ColE1 детермінується її генним апаратом, інші функції, що забезпечують реплікацію плазмиди, реалізуються за участю хромосомного апарату бактеріальної клітини. У деяких плазмід, що у клітині знаходяться в невеликій кількості (1–2 чи трохи більше копій на хромосому), існує власний, незалежний від хромосоми апарат, що забезпечує реплікацію. До таких плазмід насамперед належать фактори F, R1, pSC101 та інші.

Про реальне існування процесу реплікації плазмід свідчать непрямі дані, до яких насамперед варто віднести той факт, що кількість плазмід з розрахунку на хромосому бактеріальної клітини-хазяїна завжди є величиною постійною. З іншого боку, якщо припустити, що процес реплікації невластивий плазмідам, то при будь-якій первісній кількості плазмід у бактеріальній клітині, що ділиться, завжди має настати момент, коли ця бактеріальна клітина звільниться від плазмідних структур. Насправді такий феномен зникнення плазмід із плазмідвмісних клітин поки що ніким не був установлений. Є інші приклади, що підтверджують факт розмноження плазмід.

Молекулярний механізм розмноження плазмід дотепер цілком не вивчений. Наявні гіпотези, що допускають існування позитивного і негативного контролю розмноження плазмід, не в змозі пояснити існуючі факти. Так, наприклад, гіпотеза позитивного контролю базується на тому, що розмноження плазмід F і F' знаходиться під контролем власної генетичної системи, представленої тільки двома генами, один з яких здійснює контроль синтезу білкового продукту, що виступає як ініціатор процесу реплікації, а другий ген є оператором реплікації (реплікатором). Схема генетичного контролю розмноження плазмід F чи F' передбачає, що розмноження настає в той момент, коли немає обмежень для функціонування ініціатора (білкової субстанції) і реплікатора. Разом з тим установлено, що в процесі ініціації синтезу ДНК плазмиди ColE1 реплікація не припиняється, незважаючи на присутність такого інгібітора білкового синтезу, як хлорамфенікол.

Точку зору про наявність у плазмід власної системи реплікації поділяють багато фахівців, однак функціональна активність цієї системи знаходиться залежно від рівня життєдіяльності бактеріальної клітини. Так, перебування бактеріальної культури в несприятливих для її розмноження умовах супроводжується збільшенням кількості плазмід у бактеріальній клітині. Крім того, на залежність розмноження плазмід від метаболічної активності бактерії вказує факт можливої участі РНК як запалу при реплікації плазмідної ДНК.

Пізнання механізму розмноження плазмід не є приватним питанням. Його значення в тому, що на прикладі реплікації плазмідної ДНК вивчаються фундаментальні механізми реплікації генетичного матеріалу взагалі, що має практичне застосування при розробці методів подолання лікарської стійкості бактерій, а також обмеження поширення бактерій, що є носіями R-плазмід.

Функція несумісності (*inc*) плазмід — це біологічне явище, що виявляється при забарвленні, і означає, що дві однакові плазмиди не можуть стабільно існувати в одній клітині; потрапивши при схрещуванні з клітини-донора в клітину-реципієнт плазміда витісняє подібну плазмиду («резидента»), або сама витісняється нею. Молекулярний механізм несумісності поки що нез'ясований.

Поряд з несумісністю при вивченні взаємодії бактерій було встановлене близьке до цього явище, що одержало назву поверхневого виключення. Схрещування клітин-донорів і клітин-реципієнтів, що є носіями подібних плазмід F, R чи Col, незмінно супроводжується несприйняттям реципієнтною клітиною плазмідного матеріалу з клітини-донора. Хоча є досить переконливі дані, що вказують на існування плазмідного генного контролю поверхневого виключення, молекулярний механізм цього явища дотепер однозначно не встановлений. Що стосується несумісності плазмід, то ні гіпотеза конкуренції плазмід за мембранний сайт (ділянка) реплікації, ні гіпотеза негативного контролю розмноження не можуть цілком пояснити молекулярний механізм цього явища. Однак немає також підстав заперечувати взаємозв'язок механізму несумісності і механізму розмноження, що контролює кількість плазмід в одній бакте-

ріальній клітині. Відкрите явище несумісності плазмід покладено в основу їхньої класифікації. Висловлене припущення про філогенетичне споріднення плазмід, що належать до однієї групи, було підтверджено наступними дослідженнями. Установлено, що плазмиди, які належать до однієї групи несумісності, характеризуються спільністю молекулярної будови їхньої ДНК; належність плазмід до однієї групи корелює з лікарською стійкістю бактерій. Класифікація плазмід за принципом несумісності дає можливість вивчити шляхи їхнього розповсюдження від одних бактерій до інших, а також шляхи поширення бактерій, що містять плазмиди, у яких вони відіграють роль маркерів. Остання обставина дозволяє проводити плазмідний моніторинг. Усе це підвищує ефективність вивчення екології, епідеміології та епізоотології плазмід і бактерій, що утримують плазмиди.

Функція перенесення (*tra*) є властивістю плазмід. Однак це властиве тільки великим плазмідам, з яких найбільш вивчена F *E.coli*. Молекулярна маса цієї плазмиди досягає 65 млн, а кількість пар азотистих основ — 24 тис. Фактор перенесення (оперон перенесення, фактор F, плазмиди F) містить 21 цистрон. Процес перенесення, що складається з декількох етапів, починається з того, що у певному місці плазмиди, яке називається стартовою точкою перенесення (*oriT*), відбувається розрив одного з ланцюгів ДНК. Потім цей ланцюг переноситься у клітину-акцептор. На одноланцюгових структурах ДНК, що залишилися в донорській клітині, а також на перенесених у клітину-акцептор, реплікуються комплементарні ланцюги.

Фактор F, як і інші плазмиди, може включатися в бактеріальну хромосому за типом незаконної рекомбінації у визначених місцях. Незаконна рекомбінація — це процес, в основі якого лежить обмін негомологічними ділянками ДНК. Перебування фактора F в інтегрованому з хромосомою стані (стан *Hfr*), є однією з альтернативних форм існування плазмиди, а хромосоми *E.coli*, у які включений фактор F, набувають здатності до перенесення в клітини придатного реципієнтного штаму, і цей процес при інтеграції плазмиди F із хромосомою *E.coli* здійснюється з високою частотою. При впливі на бактеріальну клітину УФ-випроміненням частота включення плазмиди F у хромосому цієї клітини підвищується.

З відомих спеціальних функцій, що кодуються окремими плазмідами, варто назвати плідність (здатність плазмід переносити генетичний матеріал шляхом кон'югації), стійкість до одного чи кількох антибіотиків (фактори R_1 плазмиди R), важких металів (Cd^{2+} , Hg^{2+}), ультрафіолетового випромінювання, здатність до утворення бактеріоцинів (речовин, при дії яких на клітини настає їх загибель) і антибіотиків (метиленоміцину, актинородіну та ін.), токсинів і поверхневих антигенів (ентеротоксинів гемолізіну, антигену K88 та ін.), індукцію пухлин у рослин (плазміда Ti з *Agrobacterium tumefaciens* викликає утворення корончатого гала), метаболізм незвичайних джерел вуглецю (багато штамів *Pseudomonas putida* містять плазмиди, що кодують ферменти для утилізації вуглеводнів), участь у споруляції стрептоміцетів.

Носіями такої спеціальної функції, як стійкість до антибіотиків і деяких інших груп лікувальних препаратів, є фактори R чи плазмиди R (від англ. resistance — стійкість). Механізм стійкості обумовлюється тим, що плазмідні гени кодують синтез спеціальних ферментів; останні інактивують антибіотики шляхом їхнього розщеплення або шляхом модифікації ацетилюванням, аденіліруванням, фосфорилуванням. Крім того, деякі антибіотики (тетрациклін) і сульфаніламід не спричиняють властивого їм антибактеріального ефекту через детерміновані зміни в бактеріальній мембрані.

Гени r, що зумовлюють лікарську стійкість, можуть бути в плазмідних факторах R об'єднані. Тоді формується ознака множинної лікувальної стійкості. У результаті інтенсивної хіміотерапії проти бактеріальної дизентерії один зі штамів збудника цього захворювання *Shigella dysenteriae* стійкий одночасно до всіх чотирьох використаних у лікувальних цілях лікарських препаратів — хлорамфеніколу, стрептоміцину, тетрацикліну і сульфаніламідів. Явище множинної стійкості до ліків сьогодні широко розповсюджене в патогенних і непатогенних бактерій (*E.coli*, *Salmonella*). Японські дослідники установили, що 65 % штамів *Shigella* і 50 % штамів усіх інших кишкових бактерій, отриманих від хворих чи тих, що перехворіли на дизентерію, виявилися стійкими до застосованих в лікувальних цілях антибіотиків (стрептоміцину, хлорамфеніколу і тетрацикліну), а також

до сульфаламідів. У плазмідах, поряд з декількома генами *г*, що детермінують множинну лікарську стійкість, міститься також фактор перенесення цієї стійкості RTF. Гени фактора RTF мають багато схожого з генами загального фактора перенесення F *E.coli* і забезпечують кон'югацію і реплікацію. Плазміди R часто є носіями ділянки RTF. У такому випадку вони при спільному культивуванні можуть передаватися іншим видам бактерій, що свідчить про трансмісивне походження сутності ознаки множинної лікарської стійкості. Найчастіше ділянка RTF, що забезпечує кон'югацію бактерій і реплікацію ДНК, а також детермінанти *г* знаходяться в одній молекулі ДНК. Натомість відомо чимало випадків (наприклад, у бактерій *Salmonella* і *Proteus*), коли ці функціональні утворення знаходяться в різних молекулах. У природних умовах бактеріальні популяції, що є носіями плазмід, у яких фактори RTF і детермінанти *г* зосереджені в одній молекулі ДНК плазміди, просторово роз'єднані від тих бактеріальних штамів, у яких RTF і *г* знаходяться в різних плазмідах. Якщо плазміди є носіями тільки одного гена *г* і в них відсутній набір генів, що забезпечують функцію RTF, вони характеризуються невеликим розміром, забезпечують стійкість тільки до якоїсь однієї лікарської речовини і наявний ген лікарської стійкості не може бути переданий кон'югативним шляхом. Так, плазміда RpSC101 завдовжки 8,2 kb (маленька плазміда) має стійкість тільки до однієї лікарської речовини (антибіотика тетрацикліну), але ця ознака стійкості не може бути переданою за допомогою кон'югації (відсутність ділянки RTF). У природних умовах ген *г*, що детермінує ознаку стійкості до однієї лікарської речовини, скажімо, антибіотика, має здатність до взаємодії з плазмідами, що кодують стійкість до іншого антибіотика чи сульфаніламідного препарату. Об'єднання гена (чи генів) стійкості *г* до лікарських речовин (зазвичай до хімічних сполук) із плазмідами, що є носіями генів ділянки RTF, в остаточному підсумку приводить до виникнення плазміди, у якій комбінація RTF–*г* сприяє її швидкому поширенню в бактеріальній популяції. Хоча існують відповідні механізми контролю (зокрема, репресія функціональної активності RTF–*г*) за рахунок мутантних форм, де цей контроль ослаблений або відсутній, перенесен-

ня генів *r* у природних популяціях досить широко розповсюджений. Наприклад, у США (штат Атланта) був зареєстрований стійкий до дії антибіотика пеніциліну штам *Neisseria gonorrhoeae*, що є збудником гонореї. Для лікування захворювання, викликаного пеніциліностійким штамом, дозу антибіотика довелося збільшити в 24 рази (з 200 тис. до 4,8 млн одиниць). Різке зниження активності пеніциліну зумовлюється появою гена *r*, що детермінував синтез пеніцилінази. Фермент розщеплював пеніцилін і тим самим інактивував його.

Факт мікробної стійкості до дії пеніциліну був встановлений у *Haemophilus influenzae* — збудника менінгіту. Відомі й інші приклади міграції генів лікарської резистентності. Так, було встановлено, що ген, який обумовлює стійкість бактерій до тетрацикліну, може переходити з плазмиди *R* у фаг, що розмножується в клітинах *Salmonella*, а потім у хромосому *Salmonella*, із хромосоми — у фаг λ і далі в *trp*-оперон *E. coli*, а потім знову у фаг λ . Простежений також шлях міграції гена стійкості до хлорамфеніколу.

Встановлене японськими дослідниками під керівництвом Митсухаші С. явище хромосомної міграції генів стійкості до деяких хімічних речовин було підтверджено в лабораторіях інших країн світу. Здатні до міграції генетичні елементи прокариот, що кодують стійкість до певних хімічних сполук, були названі транспозонами, а для їхнього позначення стали використовувати символ *Tn*. З відомих нині транспозонів найбільш вивчені виділені з різних плазмід *Tn1*, *Tn2*, *Tn3*, що зумовлюють стійкість до ампіциліну; *Tn4* зумовлює стійкість відразу до декількох хімічних сполук — стрептоміцину, ампіциліну і сульфаніламідів, *Tn5* і *Tn6* — до антибіотика канаміцину, *Tn7* — до триметопріму і стрептоміцину, *Tn9* — до хлорамфеніколу, *Tn10* — тетрацикліну. До складу транспозонів входить близько 2600–5200 пар нуклеотидів.

При з'ясуванні причин високої здатності транспозонів до міграції на їхніх кінцях були виявлені повторювані нуклеотидні послідовності. Крім того, ще раніше було відомо, що деякі плазмиди *R* містять неодноразово повторювані нуклеотидні послідовності (інвертовані повтори), що містять 800–1400 пар нуклеотидів. Характерною рисою повторюваних послідовностей є

їхня генетична інертність, тому що вони не кодують жодних властивостей. На сьогодні найбільш вивченими є п'ять відмінних один від одного послідовностей (IS1, IS2, IS3, IS4 і IS5), що називаються вставними, або інтронами (від англ. *intervening sequence*, послідовності, які переривають). Ці елементи виявлені в *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, у деяких плазмідах (F, R) і помірних фагах (λ). Так, хромосома *E. coli* містить вісім копій IS1 і п'ять копій IS2 — елементів, що відрізняються від вірусів і плазмід тим, що автономно реплікуватися не можуть. Вони є найменшими рухливими генетичними елементами, які мають довжину близько 1 kb. Крім того, IS-послідовності, як уже було сказано, не несуть жодних генів. Однак назвати їх інертним генетичним матеріалом неможливо, тому що вони, представляючи новий вид послідовності, впливають на експресію сусідніх генів, можуть виконувати функцію нових промоторів, блокують транскрипцію дистальних генів транскрипційної одиниці, можуть індукувати делеції й інверсії, що призводять до хромосомних перебудов, мають здатність вбудовуватися і вилучатися з бактеріального геному в різних місцях незалежно від гена *pesA*.

Варто звернути увагу на ту обставину, що IS-послідовності не мають постійного місця: їх знаходять у різних ділянках молекул ДНК. Включені в ці полінуклеотидні послідовності транспозони переміщуються разом з останніми, а в основі механізму включення транспозонів лежить принцип незаконної рекомбінації, тому що специфічність інтеграції насамперед визначається не спарюванням основ, а ДНК-білковими взаємодіями. Як уже було сказано, IS-елементи мають здатність вбудовуватися в різні місця геному, однак у деякі з них включення відбувається частіше, ніж в інші.

Висловлюється думка, що висока точність, з якою здійснюється вбудовування і виключення нуклеотидних фрагментів, свідчить про участь у цих реакціях білків, які специфічно взаємодіють з кінцевими ділянками IS-елементів.

Визначення послідовності нуклеотидів кінцевих ділянок транспозонів показало їхню повторюваність. Так, кінці транспозону, що зумовлюють стійкість до ампіциліну (Tn3), є зверне-

ними повторами, що включають 38 нуклеотидних пар. Однак між кінцевими нуклеотидами транспозону Tn3 і пов'язаними з ним ділянками реципієнтної ДНК гомології не було встановлено. Таким чином, можна сказати, що транспозон — це ділянка ДНК, що складається з одного чи декількох генів стійкості, до якого по обидва боки прилягають елементи IS. Вивчення транспозонів, механізму і шляхів їхньої міграції, а також установа транспозонів еукаріот необхідне для вирішення як теоретичних, так і практичних питань.

Така спеціальна функція плазмід, як біосинтез бактеріоцинів, виявлена в багатьох видів бактерій. За своєю хімічною природою бактеріоцини є білковими речовинами, молекулярна маса яких коливається в межах 40–100 тис. На сьогодні найбільш вивчені бактеріоциногенні властивості плазмід у клітинах *E. coli*. Бактеріоцини, кодовані генами цих плазмід, називаються коліцинами, а плазміди, що кодують їх, позначаються як ColE1, ColE2 і т.д. Дія коліцинів характеризується різними механізмами. Так, біологічна дія ColE1 реалізується за допомогою інгібування процесів окисного фосфорилування. Крім того, ця плазміда використовується в генетичній інженерії як вектор. Бактеріоциногенний ефект ColE2 досягається за рахунок розщеплення ДНК, а ColE3 спричиняє деградуючу дію на 3'-кінець 16S-рРНК, у зв'язку з чим порушується біосинтез білка, тому що рРНК втрачає здатність до специфічної взаємодії з іРНК; в основі механізму дії ColK знаходиться порушення функції мембран бактерій. Об'єктами, на які ефективно діють коліцини, є бактерії цього ж виду чи близькоспоріднених видів, наприклад *Proteus* і *Shigella*.

Токсиноутворююча функція бактерій, що зумовлює їхню патогенність, реалізується за рахунок кодованого плазмідами біосинтезу ентеротоксинів, гемолізінів і антигенів. Плазміди *E. coli*, що кодують синтез ентеротоксинів, являють собою фактор перенесення (RTF), інтегрований різними генами, що несуть інформацію для синтезу двох білкових факторів, один з яких (ST) є термостабільною, а інший (LT) — термолабільною речовиною. Вплив на організм термолабільних ентеротоксинів спричинює важчі наслідки, ніж ST-ентеротоксини. Токсини *E. coli*,

що викликають гемолітичний ефект, як і ентеротоксини, кодуються плазмідними генами і знаходяться в плазмідах, що мають здатність до перенесення. Ідентифіковані γ -, β - і γ -гемолізину. Для одержання гемолізіну, що має патогенну дію, необхідна участь декількох цистронів, два з яких забезпечують біосинтез функціонально активного гемолізіну, третій — проходження синтезованого гемолізіну через бактеріальну мембрану і вихід його в зовнішнє середовище. Є дані, що для прояву патогенних властивостей синтезованого гемолізіну необхідна участь двох інших плазмід, що у диких штамів *E.coli* знаходяться в одній бактеріальній клітині разом з гемолізиновим детермінантом. Цей та інші приклади свідчать, що кодованих плазмідами токсинів буває недостатньо для досягнення бактеріальною клітиною патогенної дії. Однак участь як плазмід, так і хромосом у процесі перетворення непатогенних бактерій у патогенні поки що не встановлена. Практично нічого невідомо і про механізм дії поверхневих антигенів (K88 і K99) та їхніх молекулярних властивостей, хоча плазміди, що кодують ці антигени, певною мірою вивчені.

Плазміди можуть прямо чи побічно впливати на біосинтез антибіотиків, що в основному синтезуються стрептоміцетами. Нещодавно було встановлено, що плазміди беруть участь у біосинтезі метиленоміцину, хлорамфеніколу, тетрацикліну, макроліту. Часто про антибіотикоутворювальну функцію роблять висновок з її порушення в зв'язку з елімінацією плазмід із клітин за допомогою бромистого етидію, акридину оранжевого й інших речовин, хоча механізм цієї реакції цілком не вивчений.

Дуже важливою з практичної точки зору обставиною є здатність деяких бактерій (багато штамів *Pseudomonas putida*) утилізувати різні класи вуглеводнів, а також те, що ця властивість детермінується плазмідами, які мають здатність до перенесення. Нині при схрещуванні отримані штами *Pseudomonas putida*, у яких локалізована плазміда, що кодує синтез ферментів для розщеплення ксилулу, толуолу (XYL), і плазміда NAH, що кодує синтез ферменту для розщеплення нафталіну. Важливим успіхом з теоретичної і практичної точок зору є введення в бактеріальну клітину, що містить XYL- і NAH-плазміди, створеної

гібридної плазміді, яка включила в себе частинки несумісних плазмід ОСТ і САМ. В одній бактеріальній клітині плазміді ОСТ і САМ через принцип несумісності одночасно бути присутніми не можуть, тому наведені дані є прикладом подолання несумісності.

Бактерія, у якій одночасно знаходяться у функціонально активному стані ХУЛ- і НАН-плазміді, а також гібридна плазмід, що включила частини ОСТ- і САМ-плазмід завдяки своїй здатності розщеплювати більшу кількість класів вуглеводнів, ніж штами, що містять у клітині одну плазмід, характеризується високою енергією росту при використанні сирової нафти як поживного середовища. Цю «супербацилу» передбачається застосувати для ліквідації витоків нафти, а також для очищення трюмів танкерів.

5.1.3. Конструювання рекомбінантної ДНК

Розробка технології конструювання рекомбінантних ДНК є одним з найважливіших досягнень молекулярної біології. Молекули ДНК, у тому числі і гігантські молекули ДНК еукаріот, що містять цікаві для дослідника гени, за допомогою рестрикційних ендонуклеаз (рестриктаз) розщеплюють на окремі фрагменти. Заслугує на увагу та обставина, що за допомогою одного і того самого ферменту рестрикції здійснюють розщеплення як молекули ДНК, з якої планується одержання необхідного гена, так і ДНК вектора (плазміді чи помірного фага). У цьому випадку рестрикційна ендонуклеаза, наприклад EcoRI, що є бактеріальним ферментом, розщеплює короткі палиндромні (ті, що мають вісь симетрії другого порядку) послідовності в специфічних місцях усередині цих послідовностей навскіс в обох ланцюгах хромосомної ДНК і ДНК вектора з утворенням комплементарних одноланцюгових виступів, що мають назву липких кінців. Дуже важливо, що за допомогою ферментів удається хромосому ДНК, з якої утвориться безліч фрагментів, і ДНК плазміді перевести в лінійну форму, а потім одноланцюгові комплементарні кінці фрагмента великої молекули ДНК і плазміді піддати відпалу, що веде до з'єднання

липких кінців у результаті спарювання азотистих основ, а наявний у структурі відпаленої ДНК розрив усунути за допомогою легкодоступного бактеріального ферменту ДНК-лігази (рис. 5.1).

Відомі й інші методи, що застосовуються у генетичній інженерії (конекторний, лінкерний), за допомогою яких досягається з'єднання неспоріднених молекул ДНК. З'єднання двох неспоріднених молекул ДНК конекторним методом досягається за рахунок ферментативного приєднання за допомогою кінцевої трансферази (дезоксинуклеотидилтрансферази) полі(dA)-фрагментів до обох 3'-кінців однієї з двох неспоріднених молекул

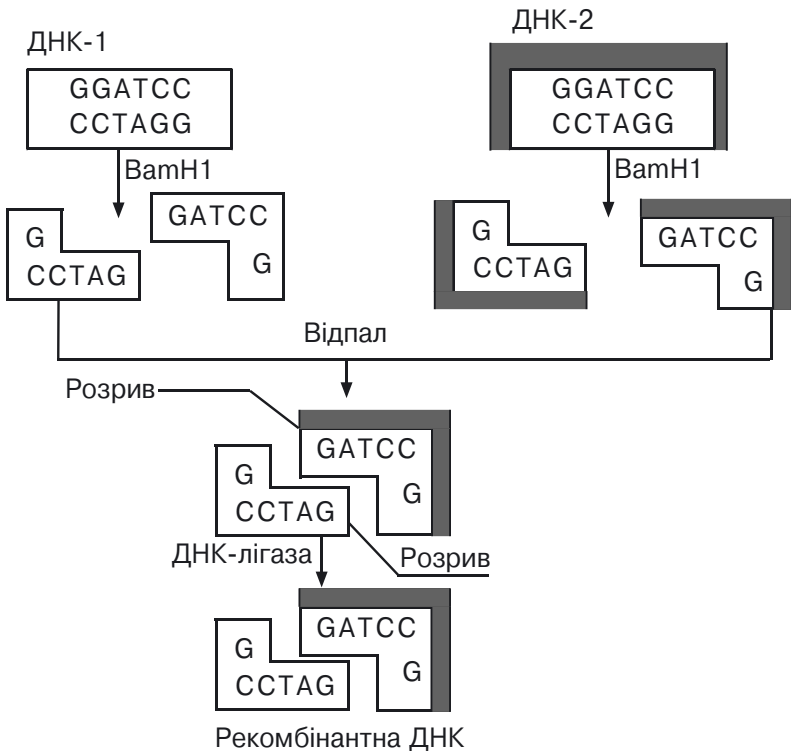


Рис. 5.1. *Схема конструювання рекомбінантної ДНК*
(за Хопевудом Д., 1984)

ДНК; до обох 3'-кінців другої неспорідненої молекули ДНК приєднують фрагменти полі(dT). Для з'єднання 3'-кінців дволанцюгової структури ДНК можна використовувати гомополімерні нуклеотидні послідовності, що складаються з гуанінового і цитидилового нуклеотидів. Особливістю термінальної дезоксирибонуклеотидилтрансферази є незалежність її дії від присутності полінуклеотидної матриці, у зв'язку з чим подовження 3'-кінців молекул ДНК, що з'єднуються, можливе за рахунок гомополімерних нуклеотидних послідовностей довжиною близько 100 залишків. У зв'язку з тим, що приєднані до 3'-кінців однотипні полінуклеотидні послідовності можуть мати різну довжину, дефекти, що виникли в зв'язку з цим у двоспиральній структурі ДНК, добудовуються за рахунок ДНК-полімерази I.

З'єднання фрагментів ДНК і вектора, утворених у результаті дії відповідних ферментів рестрикції, здійснюють за допомогою методу, що включає в себе елементи методів конекторного та липких кінців. Для цього попередньо хімічним шляхом синтезують олігонуклеотидний фрагмент, що складається з 6–10 пар нуклеотидних залишків. Цей фрагмент виконує з'єднуючу функцію, і тому називається лінкером. За його допомогою з'єднуються кінці клонованого фрагмента ДНК і вектора, у який цей фрагмент уводиться для утворення рекомбінантних молекул ДНК. Попередньою умовою при створенні лінкера є можливість наступного його розщеплення відповідною рестрикційною ендонуклеазою. Потім до 3'-кінців плазмідного чи іншого походження вектора і фрагментів ДНК приєднують з утворенням ковалентних зв'язків заздалегідь синтезований лінкер (сполучний ланцюг), а 5'-кінці лінкера клонованої ділянки ДНК і ДНК вектора фосфорилують за участю полінуклеотидкінази і за допомогою лігази (фага T4), що утворює ковалентний зв'язок між тупими кінцями ДНК. Тупі кінці, утворені приєднанням лінкера до клонованого фрагмента ДНК чи вектора після ферментативної обробки відповідною рестриктазою, наприклад EcoRI, перетворюють на липкі кінці (рис. 5.2), в основі з'єднання яких лежить механізм, описаний вище.

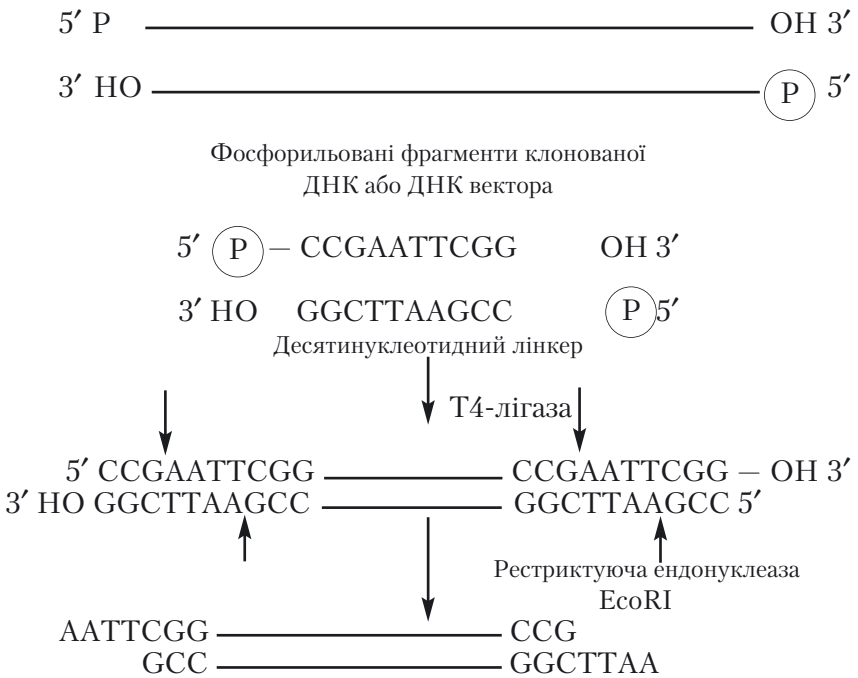


Рис. 5.2. Схема з'єднання фрагментів ДНК комбінованим (лінкерним) методом. Стрілками позначені місця дії рестриктази, що призводить до утворення липких кінців (за Страйєром Л., 1985)

На стадії виділення клонованих генів сумарну ДНК клітини-донора (наприклад, ссавця) за допомогою ферментів рестриктаз, що виконують роль своєрідного захисника, який охороняє клітину від вторгнення чужорідної ДНК, розщеплюють на фрагменти розміром від 1 до 30 тис. нуклеотидів. Складний геном вдається розділити на кілька сотень тисяч полінуклеотидних фрагментів, кожний з яких можна вмонтувати в молекулу ДНК вектора. Важливо, щоб полінуклеотидний фрагмент ДНК клітини-реципієнта, що вбудовується, не перевищував полінуклеотидної ємності вектора, що використовується.

З фрагментів, що утворюються при розщепленні ендонуклеазами сумарної геномної ДНК і ДНК вектора (плазмід чи бактеріофага) за допомогою методу липких кінців, конекторного чи комбінованого (лінкерного) методів у присутності ДНК-лігази одержують молекулу рекомбінантної (гібридної) ДНК. У присутності всіх необхідних компонентів процес утворення рекомбінантної ДНК завершується протягом декількох хвилин.

Наступна стадія на шляху клонування рекомбінантної ДНК — введення цих гібридних молекул, що складаються з убудованих у ДНК вектора клонованих фрагментів ДНК, у тому числі еукаріотичних організмів, у бактеріальну клітину-хазяїна. Процес проникнення так званих голих молекул ДНК у бактеріальну клітину і здатність їх надавати цим клітинам нових спадкових ознак описані американськими дослідниками з лабораторії Ейвери О.Т. (1944). Явище поглинання ДНК із середовища бактеріальними та еукаріотичними клітинами одержало назву трансформації. Ефективність трансформації дуже низька: тільки одна з мільйона молекул ДНК проникає у клітину. Створюючи особливі умови, кількість трансформованих клітин можна значно збільшити.

Важливою умовою одержання рекомбінантних молекул ДНК є вибір таких плазмід, у яких була б тільки одна ділянка специфічної взаємодії з певною рестрикційною ендонуклеазою. За дотримання цієї умови кільцева плазмідна ДНК при ферментативному розщепленні перетворюється тільки на одну лінійну молекулу. Якщо в плазміді є декілька палідромних послідовностей, з якими специфічно взаємодіє фермент рестрикції, то в результаті його гідролітичної дії плазмідна ДНК розпадається на кілька фрагментів. Для одержання рекомбінантних молекул ДНК необхідно створити дрібні плазмідні з високою швидкістю їхнього розмноження.

Нині при створенні нових векторів уже на стадії планування ставиться завдання одержання таких рекомбінантних молекул, які, маючи інші необхідні властивості, порівняно легко могли б проникати в клітину-хазяїна. Такі вимоги задовольняє вектор, сконструйований на основі мутантної форми фага λ , що одержав назву λ g t- λ . Під впливом рестриктази EcoRI цей мутант розщеплюється у двох місцях (кількість місць розщеплення

під впливом рестриктази в дикого типу досягає п'яти). Важливим моментом, що дозволяє використовувати цей фаговий мутант як вектор, є й те, що значні ділянки його ДНК можна видалити, не змінивши при цьому інфекційних властивостей бактеріофага. На частку ДНК, що залишилася після розщеплення EcoRI, припадає 72 % довжини вірусного геному. Дефект, що утворився після елімінації ділянки вірусної ДНК, можна заповнити фрагментом ДНК розміром 10 kb, який призначений для клонування. У такому випадку гібридна молекула ДНК, створена на базі фага λ і має 93 % первісної довжини (до обробки рестриктазою), може бути інкапсидована (упакована) у голівці вірусу. Однією з основних переваг створених на основі фага λ векторів є їх здатність проникати в бактерії з ефективністю, що значно перевершує таку ж у гібридних молекул, сконструйованих на плазмідній основі.

5.1.4. Клонування молекул рекомбінантної ДНК

Уведена тим чи іншим шляхом у бактеріальну клітину рекомбінантна молекула ДНК багаторазово там реплікується. Кожна гібридна молекула ДНК у результаті реплікації створює потомство ідентичних їй дочірніх молекул. Багаторазово розмножене потомство однієї бактеріальної клітини, що характеризується ідентичністю всіх складових його молекул, називають клоном. Фрагмент ДНК, попередньо отриманий у результаті розщеплення рестрикційною ендонуклеазою геномної ДНК (наприклад, еукаріотичного організму), у межах кожної клональної популяції присутній у чистому вигляді, єдиною домішкою якого є ДНК-вектор, що міститься в гібридній молекулі. Тому в більш вузькому значенні клоном називають убудований фрагмент чужорідної ДНК, попередньо виділений з його первісного геномного оточення і в результаті вибіркового розмноження присутній у великій кількості копій в однорідній популяції гібридних молекул. Як було сказано вище, у плазмідні чи вірусні вектори можуть долучатися різні фрагменти ДНК, що несуть у своєму складі різні гени, у зв'язку з чим утворюються сотні тисяч гібридних молекул, що розрізняються, і які при розмноженні утворюють клональні популяції. Родоначалницею кожної популяції є одна гібридна молекула ДНК.

При використанні як вектора бактеріофага гібридні ДНК, що утворилися і які складаються з фрагмента геномної ДНК еукаріотичного походження і ДНК вірусу, вводять у клітини *E.coli*. Рекомбінантні фаги багаторазово розмножуються у клітинах *E.coli*; у результаті їх лізування одержують великий набір окремих клональних популяцій — бібліотеку клонів.

Наступний етап — ідентифікація клонів. Завдання полягає в тому, щоб у бібліотеці клонів знайти одну чи кілька популяцій, що несуть рекомбінантну молекулу ДНК і містять потрібний ген. Добір клонів можна проводити за ознаками, характерними для самого клонованого гена чи для вектора, у який убудований потрібний ген. Ідентифікація є порівняно простою маніпуляцією, якщо раніше був клонований родинний потрібному ген. Клонований раніше фрагмент ДНК позначають радіоактивним ізотопом і встановлюють необхідний клон гібридизацією. При цьому враховується та обставина, що радіоактивна ДНК у зв'язку з комплементарністю нуклеотидних послідовностей буде зв'язуватися переважно з клонованим фрагментом ДНК, який розшукується. Що стосується ідентифікації клонованих фрагментів еукаріотичної ДНК, то і тут основою відбору є гібридизація.

Розроблено прийоми, за допомогою яких можна виділити іРНК (на її матриці здійснюється синтез відповідного білка) і її ДНК-копію. У тих клітинах, які спеціалізовані для синтезу певного білка у великих кількостях, іРНК також виявляється в концентраціях, що дозволяють порівняно легко виділити її, а також ДНК-копію відповідної іРНК у кількостях, необхідних для тестування гена, що розшукується. Цей метод виявляється результативним і в тих випадках, коли іРНК знаходиться в клітині, де її кількість складає десятки частки відсотка стосовно інших матричних РНК. Цей метод може бути використаний і тоді, коли через малу кількість існуючих прийомів іРНК не може бути ізольованою. Запропонований вихід з цього становища полягає у виділенні невеликої кількості чистого білка, біосинтез якого здійснюється на матриці іРНК, яка цікавить дослідника. Потім визначається амінокислотна послідовність цього білка і на підставі знання генетичного коду здійснюється визначення нуклеотидної послідовності відповідної іРНК і ДНК, що кодує аналізований білок.

На наступному етапі з окремих нуклеотидів хімічним шляхом синтезують невеликі олігонуклеотидні фрагменти ДНК з необхідною послідовністю азотистих основ. Ці фрагменти ДНК надалі використовуються як тести для ідентифікації і виділення клонів, що розшукуються.

З метою ідентифікації і відбору клонів використовується імунологічний метод. У цьому випадку виділяється чистий білок, кодований геном, що знаходиться у складі рекомбінантної ДНК у фаговому векторі. При введенні в бактеріальну клітину гібридного фагового вектора одночасно з його розмноженням здійснюється біосинтез невеликих кількостей цього білка. Подальше завдання полягає в тому, щоб проти потрібного білка одержати антитіла і використовувати приготований на їхній основі препарат для ідентифікації і відбору клону, що містить ген, який розшукується.

Ідентифікацію і відбір потрібного клону здійснюють за специфічною ознакою, носієм якої є плазмідна частина рекомбінантної молекули ДНК. Так, створена останнім часом плазміда рBR322 є носієм генів, що забезпечують стійкість утримуючих ці плазміди бактерій до тетрацикліну й ампіциліну (рис. 5.3). Крім того, кожна з таких рестрикційних ендонуклеаз, як EcoRI, HindIII, SalI, BamHI, розщеплює названу плазмиду в одному чітко визначеному місці. Плазміда рBR322, оброблена рестриктазами HindIII, SalI, BamHI після введення у місця рестрикції фрагментів гетерогенної ДНК, утрачає раніше властиву їй здатність забезпечувати стійкість до тетрацикліну бактерій, що містять цю плазмиду. Таке явище називається інактиваційною вставкою, або інсерційною інактивацією; стійкість цих клітин до ампіциліну зберігається. Використовуючи ознаки стійкості до ампіциліну й чутливості до тетрацикліну, роблять ідентифікацію і відбір клонів. Чутливість до тетрацикліну й ампіциліну зберігають ті бактеріальні клітини, у які плазміда рBR322, що несе гени стійкості до названих антибіотиків, не змогла вбудуватися. Клітини, у які проникла плазміда рBR322, але не мала вставки фрагмента чужорідної ДНК, стійкі і до тетрацикліну, і до ампіциліну. Стійкість до обох антибіотиків зберігають також клітини, що містять плазмиду з вставкою фрагмента ДНК у ділянці рестрикції, утвореній після обробки плазміди рестрикційною ендонуклеазою EcoRI.

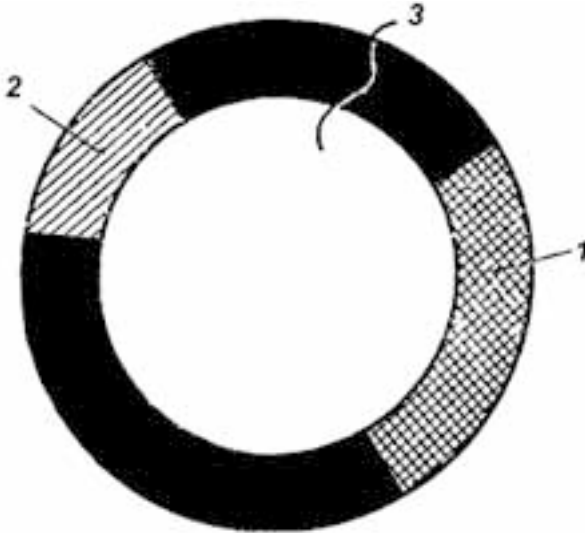


Рис. 5.3. Схематична карта плазмиди рВК322

(за Страйєром Л., 1985):

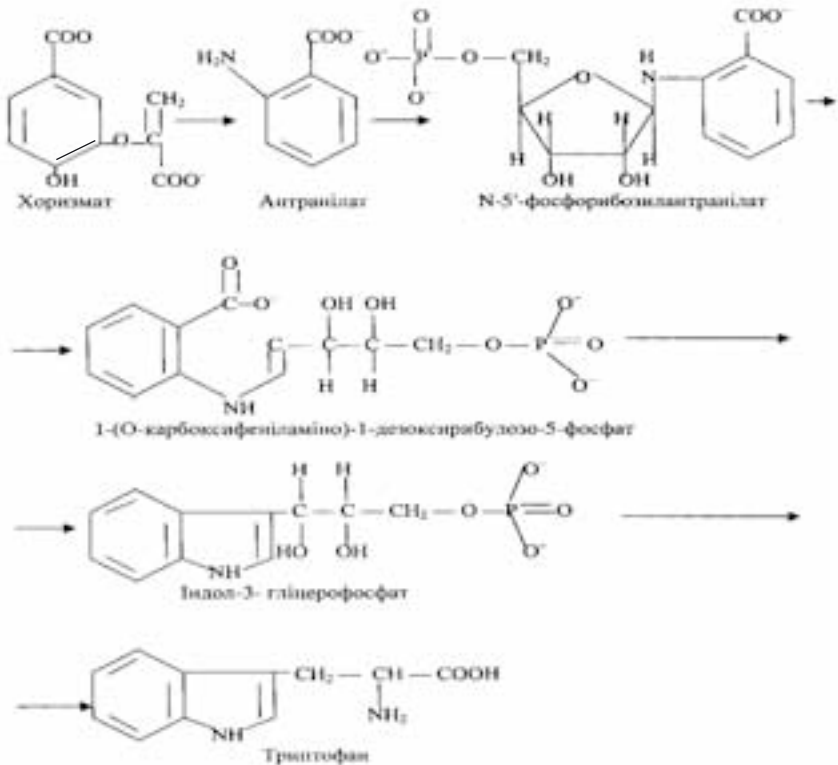
- 1 — ген стійкості до тетрацикліну; 2 — ген стійкості до ампіциліну;
3 — місце дії рестриктази EcoKI.

Проведені обчислення показують, що тільки один з 180 тис. клонів може містити унікальний еукаріотичний ген. Присутність цього гена в одній пляшці фага λ можна установити радіоавтографічним методом за допомогою радіоактивної молекули РНК чи ДНК. Продуктивність радіоавтографічного методу досить велика: протягом дня можна перевірити близько 1 млн клонів. Потрібно ще раз наголосити, що ідентифікація і добір шуканих клонів методом радіоавтографії можливі за наявності раніше клонованих генів, які є родинними до генів, що розшуковуються, чи транскрибованих з цього гена РНК (Страйєр Л., 1985). Для тих випадків, коли описаний підхід виявляється неприйнятним, використовуються інші прийоми, засновані на створенні специфічного тесту, що дозволяє ідентифікувати і відібрати клон, котрий є носієм необхідного гена.

Отримані в результаті розщеплення рестрикуючими ендонуклеазами сумарної ДНК еукаріотичних і прокаріотичних організмів фрагменти, що містять гени, які кодують той чи інший

білок, можуть бути використані для вбудовування їх у вектори і створення рекомбінантних, чи гібридних ДНК. Бактеріальні гени, які беруть участь в утворенні рекомбінантних молекул, вбудовані у вектори в складі фрагментів ДНК, можна змусити експресуватися. Так, у фрагменті ДНК, отриманому при дії рестриктази на геномний матеріал *E.coli*, виявився триптофановий оперон. Його клонування у складі рекомбінантної молекули ДНК, яка складається з фрагмента ДНК із триптофановим опероном і плазмідного вектора ColEI, приводить до експресії.

У триптофановому опероні встановлена наявність п'яти генів, що кодують біосинтез п'яти ферментів, які беруть участь в утворенні з хоризмата через такі проміжні з'єднання, як антранілат, N-5'-фосфорибозилантранілат, 1-(О-карбоксифеніламіно)-1-дезоксирibuлозо-5-фосфат, індол-3-гліцерофосфат критичної незамінної амінокислоти триптофану:



Концентрація ферментів, кодованих генами триптофанового оперона, що входить до складу плазмідного вектора ColEI, приблизно в 20 разів перевищує їхній уміст, синтезований у звичайних клітинах *E.coli*. Це пов'язано з тим, що кількість гібридних молекул плазмиди ColEI у клітині *E.coli* може досягати кількох десятків копій. Зазвичай в бактеріальній клітині близько 25 копій плазмиди ColEI, а при дії на бактерію антибіотиком хлорамфеніколом кількість плазмід ColEI збільшується, досягаючи 1000 копій. Механізм дії хлорамфеніколу зводиться до блокування процесів біосинтезу білка і реплікації хромосоми бактеріальної клітини; реплікація ДНК плазмиди ColEI у присутності антибіотика не порушується.

Загальною властивістю коліциногенних плазмід, у тому числі і ColEI, є відсутність чіткого контролю їхньої реплікації. Є приклади, які свідчать про можливість експресії в бактеріальній клітині генів, взятих із дріжджів. Так, мутант *E.coli*, що потребує для свого росту збагаченого гістидином живильного середовища, ставав незалежним від екзогенних надходжень цієї амінокислоти при трансформації ауксотрофної клітини рекомбінантною ДНК, що складається з фрагмента дріжджової ДНК і фага λ . Підтвердженням того факту, що ген, який кодує фермент імідазолілгліцеролфосфатдегідрогеназу, вставлений у фаг λ у складі фрагмента дріжджовий ДНК, експресувався, є перетворення мутанта *E.coli* у незалежну від зовнішніх надходжень гістидину клітину. Що стосується генів ссавців, є дані, за якими бактерії не здатні експресувати еукаріотичні гени, що містять інтрони. Як вже зазначалося, на відміну від прокариот еукаріотичні гени не є безперервними структурами.

У зв'язку з цим молекула, що утворилася в результаті транскрипції РНК (первинний транскрипт), перш ніж опинитися в цитоплазмі, проходить стадію дозрівання (процесинг), під час якого синтезована молекула РНК ферментативним шляхом розщеплюється на окремі фрагменти. Деякі з отриманих фрагментів з'єднуються між собою (сплайсуються), а велика частина нуклеотидних послідовностей під час процесингу елімінується з первинного транскрипта. В результаті з первинного транскрипту виходить іРНК. Однак у бактеріальній клітині,

очевидно, відсутні можливості для забезпечення процесингу первинного транскрипта. Тому, якщо навіть припустити, що еукаріотичний ген експресується у бактеріальній клітині, то отриманий у результаті трансляції недозрілої іРНК білок не буде ідентичний тому, що міг утворитися в результаті експресії цього ж гена в еукаріотичній клітині.

Вихід з положення, що створилося, може бути досягнуто таким чином, якщо при конструюванні рекомбінантних молекул у плазмідний чи вірусний вектор вбудувати фрагмент еукаріотичний ДНК, комплементарний зрілій іРНК. Практичне рішення цього питання стало можливим після того, як була встановлена зворотна транскрипція іРНК за допомогою ферменту ревертази (зворотної транскриптази). Зворотна транскриптаза кодується геном РНК-вмісних вірусів, що ініціюють пухлинний ріст.

Для вирішення питань молекулярної біології і генетичної інженерії зворотну транскриптазу в основному одержують з вірусу мієлобластозу птахів. Важливою властивістю зворотної транскриптази є її здатність синтезувати на матриці іРНК комплементарний ланцюг ДНК і створювати на цьому ланцюзі ДНК шпилькоподібну структуру, що іншим ферментом — ДНК-полімеразою — використовується як відпал при синтезі іншого ланцюга ДНК. Варто звернути увагу і на той факт, що зворотна транскриптаза кодується не тільки геномом РНК, який містить віруси, що ініціюють пухлинний ріст, але виявляється і в нормальних клітинах миші і людини, де вона виконує, швидше за все, певну нормальну функцію.

Штучно синтезована на матриці, яка пройшла стадію процесингу, іРНК — копія дволанцюгової комплементарної ДНК (кДНК) містить безперервну генетичну інформацію, тобто є безінтронним штучним геном. Кодована ділянка гена яєчного альбуміну (овальбуміну) складається з восьми окремих ділянок, розділених інтронами, які розташовані у різних місцях геному. Овальбумінова іРНК, нуклеотидна послідовність якої розшифрована, містить всю інформацію про овальбумін, який складається з 387 амінокислотних залишків. Зворотною транскрипцією овальбумінової іРНК отримана кДНК, у результаті експресії якої у складі рекомбінантної ДНК у клітинах *E.coli* утворюється

ся близько 1,5 % овальбуміну; значна частина його виділяється з клітини.

Прикладом одержання необхідного для клонування безінтронного гена може слугувати процес створення кДНК на матриці іРНК препроінсуліну — попередника функціонально активного гормона інсуліну. Було відомо, що в клітинах інсуліноми (пухлини підшлункової залози) синтезується велика кількість інсуліну, і що клітини цієї пухлини містять порівняно високу концентрацію іРНК препроінсуліну, у який під час процесингу вилучені інтрони. Експресія рекомбінантної ДНК, створеної вбудовуванням в плазмідний вектор кДНК, що кодує безінтронну іРНК препроінсуліну в клітинах *E.coli*, дозволила дати відповідь на два питання, що цікавили дослідників. По-перше, була доведена можливість експресії генів ссавців у бактеріальних клітинах. По-друге, біотехнологічний спосіб одержання інсуліну для задоволення потреб практичної медицини виявився більш рентабельним порівняно з раніше розробленим методом хімічного синтезу.

Якщо відома амінокислотна послідовність білка (виробництво його передбачається налагодити на біотехнологічній основі), одночасно з генетичним проводиться хіміко-ферментативний синтез гена за методикою, в основу якої покладені розробки лауреата Нобелівської премії Корани Г. (1969). Для цього олігонуклеотидні послідовності синтезуються хімічним шляхом, а потім за допомогою ферменту лігази з'єднуються між собою, у результаті чого виходить нуклеотидна послідовність ДНК, що кодує біосинтез білка проінсуліну.

Процес синтезу генів, що кодують білки невеликих розмірів, хіміко-ферментативним шляхом можна значно прискорити, використовуючи для цієї мети «генні машини» (рис. 5.4), у яких синтез специфічних послідовностей ДНК автоматизований.

Послідовність основ, що відповідає послідовності амінокислот білка, біотехнологічний синтез якого необхідно здійснити, вводиться на клавішний пульт керування. Через клапани, що відкриваються за допомогою мікропроцесора, у синтезуючу колонку за допомогою помпи подаються необхідні для процесу синтезу компоненти. Дрібні кремнієві намистинки, якими наповнена колонка, використовують як тверду основу, на якій

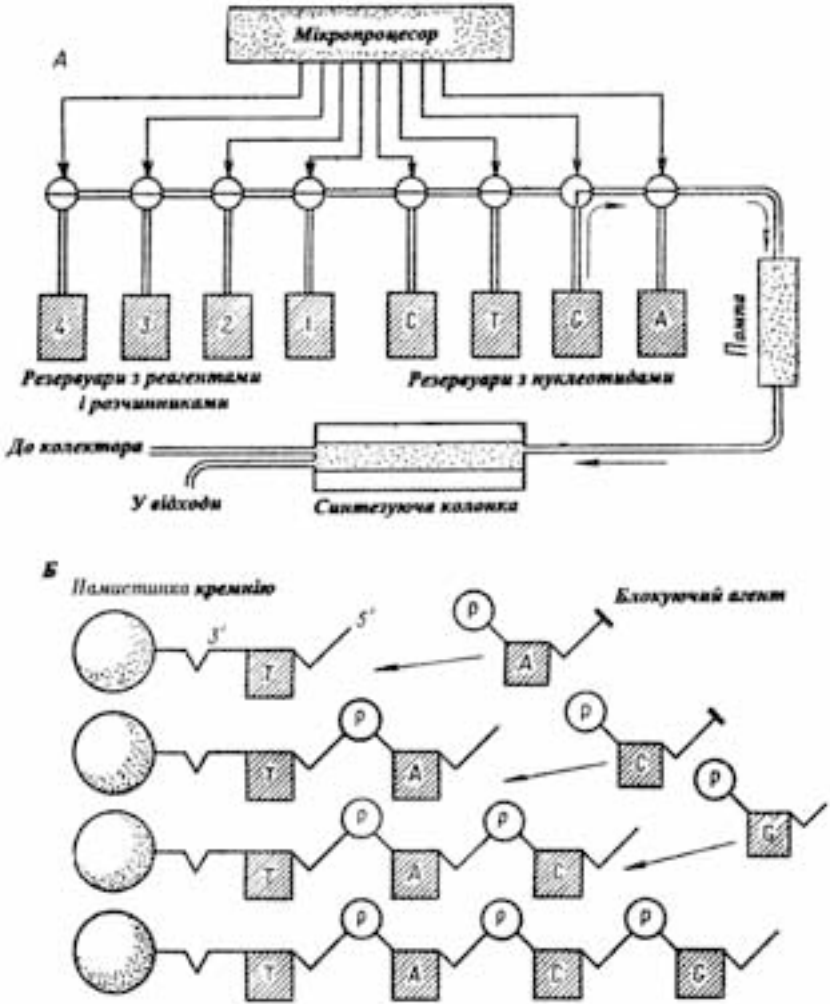


Рис. 5.4. Схема «генної машини»
(за Ховвудом Д., 1984)

здійснюється створення полінуклеотидної послідовності (Б). Перед заповненням синтезуючої колонки намистинками до них попередньо приєднують нуклеотиди (Т), 5'-кінець яких залишається вільним. Введена в колонку за участю мікропроцесора наступна порція нуклеотиду (А), у якого 5'-кінець захищений від небажаних взаємодій блокуючим агентом, своїм 3'-положенням реагує з 5'-кінцем нуклеотиду, прикріпленого до намистинки. Перш ніж вступити в реакцію з наступним нуклеотидом (С), 5'-кінець щойно приєданого нуклеотида А звільняється від блокуючого агента, що створює необхідні умови для приєднання нового нуклеотида G. За допомогою «генної машини» синтезуються ланцюги довжиною до 40 нуклеотидів зі швидкістю один нуклеотид за 30 хв. Готові послідовності одноланцюгової ДНК відщиплюють від намистинки і вимивають у колектор (Хопвуд А., 1984). Для експресії синтезованого хіміко-ферментативним шляхом гена його разом з ділянками, що забезпечують активність цього гена, переносять у плазмідний вектор. Потім створену рекомбінантну молекулу ДНК трансформують у бактеріальні клітини й одержують штам, що продукує проінсулін, з якого виробляють інсулін. Таким способом був отриманий комерційний препарат інсуліну в США і в Інституті біоорганічної хімії АН СРСР під керівництвом академіка Овчинникова Ю.А.

Клонування синтетичної ДНК зазвичай здійснювали шляхом вбудовування у векторну ДНК дволанцюгових фрагментів, у яких обидва ланцюги були синтезовані хімічним або хіміко-ферментативним шляхом, або один з ланцюгів був отриманий ферментативним способом.

В Інституті цитології і генетики СВ АН СРСР була доведена принципова можливість клонування одноланцюгової синтетичної ДНК без додаткової збірки другого комплементарного ланцюга. Для клонування автори використовували одноланцюговий полінуклеотид, що складається з 93 нуклеотидних ланок і включає в себе лідерну послідовність гена людського фібробластного інтерферону. Спочатку хімічним способом синтезували три полінуклеотидних фрагменти, які складаються відповідно з 15, 38 і 43 нуклеотидних ланок. Потім ці фрагменти були з'єднані між собою. Сутність методу полягає в тому, що полінуклеотидний ланцюг збирається шляхом лігазної зшивки синте-

тичних фрагментів на коротких комплементарних цим фрагментам олігонуклеотидних «підкладках», чи «штифтах», що не є суцільним комплементарним ланцюгом.

Вбудовування 93-ланкового полінуклеотиду в плазмідну рBR327, яку попередньо гідролізували рестриктазами EcoRI і HindIII, проводили в присутності олігонуклеотидів, що складаються з 20 і 16 нуклеотидних ланок і комплементарних відповідно 5'- і 3'-кінцям цього 93-ланкового полінуклеотиду. Олігонуклеотид, що складається з 16 ланок, використовувався як «штифт» при лігазній зшивці 93-ланцюгового полінуклеотиду з плазмідним вектором.

Цей метод при повному хімічному синтезі однієї з ланцюгів клонованої ДНК усував необхідність у синтезі другого комплементарного ланцюга. Отже, заощаджуються праця, час і реактиви, необхідні для забезпечення синтезу та лігазної зшивки другого ланцюга.

5.1.5. Експресія еукаріотичних генів у клітинах прокаріот

Наступна проблема, яка виникає у дослідників при вирішенні фундаментальних питань генетичної інженерії, — домогтися експресії еукаріотичного гена в чужорідному оточенні прокаріотичної клітини організму, найчастіше *E.coli*. Для цього одержаний і вже клонований ген, що підлягає експресії, ферментативним впливом елімінують з вектора, у складі якого він був клонований, і піддають певній модифікації. Такі складні додаткові маніпуляції необхідні в зв'язку з тим, що сигнали для транскрипції і трансляції в прокаріотичних і еукаріотичних організмів розрізняються. Крім того, ні кДНК, ні синтезований хімічним шляхом ген не містять у своєму складі промотору й інших сигналів, потрібних для експресії генів у бактеріях.

Так, до складу генів ссавців входять такі нуклеотидні послідовності, що виконують регуляторну функцію тільки в «рідних стінах», тобто у складі еукаріотичної клітини. Вихід з цього складного становища полягає в тому, що штучний еукаріотичний ген вбудовують у структурний ген вектора прокаріотичної клітини в місці, де прокаріотичні сигнали регуляції сприятимуть експресії еукаріотичного гена. Якщо еукаріотичний ген містить власні регуляторні нуклеотидні послідовності, їх замі-

няють на регуляторні послідовності із бактеріальних клітин. Потім рекомбінантну ДНК з модифікованим еукаріотичним геном трансформують у придатні чужорідні прокаріотичні клітини, найчастіше *E.coli*.

При експресії чужорідних генів синтезовані ними білкові продукти часто сприймаються клітинним оточенням як невластні речовини і тому розщеплюються ферментами клітини-хазяїна. Для подолання цієї перешкоди клітину-хазяїна перебудовують за допомогою добору мутантних форм, з яких еліміновані відповідні протеази. У зв'язку з цим нові для клітини речовини сприймаються її внутрішньоклітинним умістом як власні продукти.

Наступне завдання полягає в тім, щоб інтенсифікувати процес експресії клонованого гена. При цьому слід зазначити, що еволюція мікроорганізмів проходила в напрямку удосконалення механізмів, що забезпечують їхнє виживання і відтворення. За природного добору мікроорганізми досить добре пристосувалися до середовища існування і до конкуренції з іншими видами. Що стосується добору мікробних клітин за їх здатністю до виробництва потрібних для людини (та ще й у величезних кількостях) речовин, то в природних умовах еволюція мікроорганізмів у такому напрямку, зрозуміло, не відбувалася. Тому перед генетичною інженерією поряд з іншими порушено й успішно вирішується питання конструювання таких штамів мікроорганізмів, які мають здатність виробляти хоча й звичайний для них продукт, але в зовсім незвичних кількостях. Крім того, як уже було відзначено, конструювання рекомбінантних молекул ДНК призвело до синтезу таких речовин, що не були раніше метаболітами цієї клітини (рис. 5.5).

Використання методів і прийомів молекулярної біології та генетичної інженерії, за допомогою яких доведена принципова можливість біосинтезу мікробними чи дріжджовими клітинами дуже потрібних речовин з погляду забезпечення потреб людини не можна вважати біотехнологією. Наріжним каменем біотехнології є виробництво біологічно активних речовин для задоволення потреб охорони здоров'я, а також галузей агропрому в таких обсягах і за такою собівартістю, яка дозволила б виготовленій біотехнологічній продукції бути конкурентоспроможною. Так, на початкових етапах розробки біотехнології

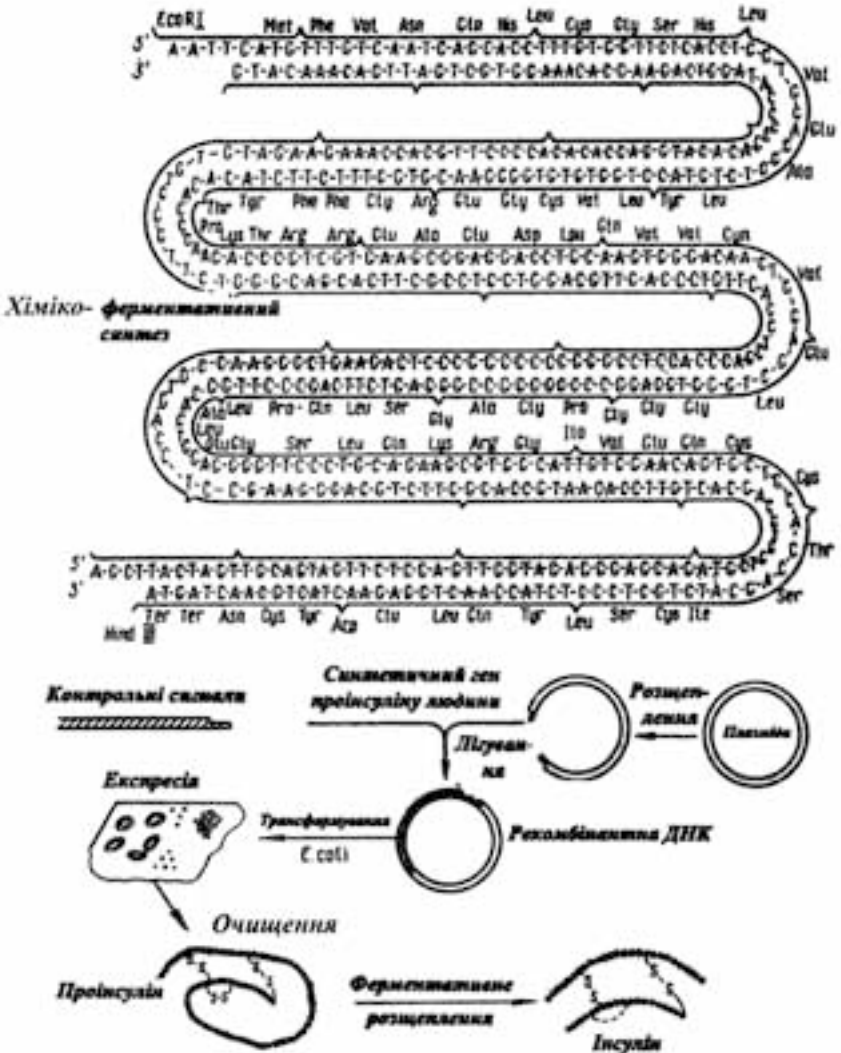


Рис. 5.5. Схема мікробного синтезу інсуліну людини (за Овчинниковим Ю.А., 1986)

мікробного виробництва інсуліну бактеріальні клони, трансформовані інсуліновою кДНК, синтезували попередник інсуліну в незначній кількості — близько 100 копій білка на одну мікробну клітину. Однак уже тоді вважали, що комерційний стимул до виробництва інсуліну людини, а також гормону росту й інтерферону в стані здолати труднощі, що виникають на шляху організації виробництва цієї й іншої біотехнологічної продукції в необхідному обсязі.

Експресія структурних генів, як зазначено раніше, що включає етап транскрипції (синтез іРНК, комплементарній відповідній матриці ДНК) і трансляції (побудова білкової молекули на іРНК-матриці в рибосомах), контролюється послідовностями основ, приєднаних до ділянки структурного гена. Це коротка промоторна ділянка, що знаходиться від місця ініціації на відстані приблизно 10 і 35 пар основ, має підвищену спорідненість з РНК-полімеразою і сприяє переміщенню ферменту уздовж ДНК-матриці, ініціюючи транскрипцію ДНК у місці, що прилягає до кодуєчої послідовності структурного гена. На кінці структурного гена знаходиться ділянка термінації, у якій РНК-полімераза припиняє процес транскрипції.

У деяких генах біля промотору розташовуються додаткові нуклеотидні послідовності, хімічно споріднені з білком, взаємодія яких зі згаданими ділянками ДНК зумовлює їхні регуляторні функції. Так, між промотором і структурним геном знаходиться операторна ділянка. З нуклеотидами, що формують операторну ділянку, за наявності в клітинному середовищі певних метаболітів, взаємодіє білкова речовина, яка кодується нуклеотидною послідовністю ДНК. Ця білкова речовина називається респресором, а ділянка ДНК, що кодує цей білок, — геном-регулятором.

Регуляція експресії на стадії трансляції здійснюється за допомогою нуклеотидних послідовностей, що входять до складу іРНК. Так, у іРНК є спеціальна ділянка, яка представлена відповідною нуклеотидною послідовністю і до якої приєднується рибосома таким чином, що процес трансляції завжди починається з першого кодону (AUG-кодон, чи стартова ділянка), а закінчується стоп-кодоном (UAA-нуклеотидна послідовність), що зумовлює відокремлення синтезованого поліпептидного ланцюга.

Підвищення ефективності експресії генів і збільшення кількості продуктів, синтез яких контролюється цими генами, досягається за допомогою методів генетичного програмування. Навіть незначні зміни послідовності нуклеотидів у промоторі здатні збільшити хімічну спорідненість РНК-полімерази до цієї ділянки ДНК і підвищити швидкість транскрипції. Істотне збільшення швидкості транскрипції може бути досягнуто і за рахунок змін послідовності нуклеотидів в ділянці оператора й у гені-регуляторі, внаслідок чого білок-репресор не зможе вступити у взаємодію з операторною ділянкою ДНК і загальмувати синтез іРНК. Варто також враховувати залежність активності синтезованого ферменту від амінокислотної послідовності його поліпептидного ланцюга.

У зв'язку з цим фермент, що характеризується низькою хімічною спорідненістю до свого субстрату, набуває здатності вступати у взаємодію майже з кожною молекулою перетвореної ним речовини. Можлива також втрата хімічної спорідненості до одних і придбання спорідненості до інших субстратів, що мають іншу будову. У цьому випадку причиною зміни послідовності амінокислот у білку-ферменті є відповідні зміни послідовності нуклеотидів в кодуючій ділянці структурного гена, внаслідок заміни, втрати чи вставки пари азотистих основ чи невеликих ділянок ДНК. Передбачається, що подібні зміни є наслідком помилок, які виникають при реплікації і передаються спадково з покоління в покоління.

Частота таких помилок (спонтанних мутацій) у край низька. Імовірність одноразової зміни однієї пари основ може відбутися за 10 мільйонів актів реплікації. Фізичні фактори (наприклад, ультрафіолетове випромінювання, іонізуюча радіація й ін.) та деякі хімічні речовини можуть підвищити частоту мутації не менш ніж у 1000 разів. Однак мутагенні фактори впливають на гени і викликають мутації за принципом випадковості. Технологія рекомбінантних ДНК підвищує точність традиційних підходів; вона дозволяє замінити непередбачуваність звичайного мутагенезу мутацією певних ділянок у визначених генах.

Перебудовуються гени за рахунок зміни нуклеотидних послідовностей ДНК за допомогою локалізованого мутагенезу; один з рестрикційних фрагментів клонованого гена замінюється

ся фрагментом із внесеними в нього змінами. Крім цього, розроблена методика заміни нуклеотидної послідовності, що міститься у гені, на нову чи просто додавання нових ділянок ДНК, які за своїм походженням є синтезованими поза організмом фрагментами ДНК.

Розроблено прийоми маніпулювання не тільки оліго- чи полінуклеотидними послідовностями, але й окремими нуклеотидами, що приводить до мінімальних змін гена (точкові мутації). Змінені тим чи іншим шляхом гени вводяться потім у природне для них біологічне середовище.

У зв'язку з модифікацією генів змінюються кількісні і якісні показники експресії. Наприклад, отримані штами *Brevibacterium flavum* і *Sorynebacterium glutamicum* перетворюють на лізин понад 33 % цукру, у результаті чого концентрація цієї критичної амінокислоти в живильному середовищі досягає 7,5 %; промислові штами *Penicillium chrysogenum* і *Streptomyces aureofaciens* синтезують понад 20 г пеніциліну і тетрацикліну з розрахунку на 1 л живильного середовища (продуктивність диких штамів знаходиться на рівні декількох міліграмів); більш ніж у 500 разів вдалося збільшити за допомогою рекомбінантних молекул ефективність функціонування *E.coli* у процесі біосинтезу ДНК-лігази.

Модифікація керуючих біологічною системою генів супроводжується зміною взаємозв'язків, що раніше існували у цій системі. Так, білок, що транспортується у визначений компартмент клітини, після відповідної модифікації гена, що кодує біосинтез цього білка, може змінити цей відсік на інший; модифікація нуклеотидної послідовності гена може призвести до того, що сигнали, які регулюють його експресію до перебудови, замінюються на стимули, що мають іншу хімічну будову.

Мікроорганізми, що містять рекомбінантні молекули ДНК із модифікованими тим чи іншим шляхом генами, уже використовуються чи будуть використовуватися у недалекому майбутньому для великомасштабного виробництва цінних речовин. Це інтерферон (універсальний противірусний засіб і, можливо, засіб для боротьби зі злоякісним ростом); ренін (використовується у виробництві сиру з молока); фактор некрозу пухлин (у терапевтичних цілях застосовується при ракових захворюваннях);

целюлаза (фермент призначається для гідролізу рослинної целюлози й одержання в-глюкози); пептидні антигени вірусів, що є складовими компонентами в конструюванні нових безпечних вакцин; інсулін (при захворюванні на цукровий діабет); урокіназа і плазміноген (використовуються для розчинення тромбів); соматотропін (застосовується з лікувальною метою при карликовості, опіках, кісткових переломах); соматостатин (гальмує секрецію соматотропіну, інсуліну і глюкагону); ДНК-лігаза (широко використовується в генетичній інженерії).

Розроблені молекулярними біологами методи і прийоми конструювання рекомбінантних молекул ДНК, клонування і модифікації генів, з одного боку, є підґрунтям, на якому створюється будинок біотехнології; з іншого — за допомогою цих методів і прийомів вирішуються фундаментальні питання біології, що надалі будуть використані в прикладних цілях. Так, за допомогою методу клонування вивчаються такі фундаментальні питання біології, як функціонування гена і регуляція цієї функції, проводиться визначення послідовності нуклеотидів; завдяки клонуванню генів можна одержати в достатніх кількостях і в чистому вигляді основні макромолекули біологічних систем, що дозволяє заощаджувати матеріальні ресурси, а також сили і час дослідника.

Метод клонування генів дозволяє одержати в необмеженій кількості ДНК для електронно-мікроскопічних досліджень, вивчення специфічних ділянок ДНК, які обумовлюють рухливість генів, реплікацію і транскрипцію ДНК, порівняно швидко провести картування складних хромосом і поділ їх на окремі фрагменти, що піддаються змінам.

Створено широкі можливості для вивчення структури РНК, процесів її дозрівання (вирізання інтронів з первинного транскрипта і наступне ферментативне зшивання кінців за допомогою лігази). Доцільно ще раз наголосити, що в прокаріотичних клітинах процесинг (дозрівання) не розповсюджений; у клітинах еукаріот усі види РНК містять інтрони, які під час дозрівання рибонуклеїнових кислот вирізаються, а утворені при цьому кінці зрощуються (сплайсинг).

Розкриття біохімічних механізмів процесингу лежить в основі розуміння функціонування генів. За допомогою клонуван-

ня стали можливими широкомасштабні дослідження з конкретизації функцій різноманітних білків. Клонування дозволяє модифікувати гени і кодовані ними білки, що призводить до зміни функцій останніх, а отже, і зв'язків між компонентами біологічної системи.

Метод клонування генів вносить істотний вклад в історію еволюційного розвитку. Шляхом клонування генів і наступної розшифровки їх нуклеотидних послідовностей вдається відтворити зміни, що відбулися в клітинах організмів, які нині живуть. Аналіз нуклеотидних послідовностей клонованих фрагментів ДНК за допомогою розроблених досить складних комп'ютерних програм дозволяє з великою точністю установити ступінь еволюційного споріднення.

Така властивість нуклеотидних послідовностей, як консервативність (сталість у часі), з успіхом використовується молекулярними біологами для вирішення прикладних задач. Так, нуклеотидні послідовності, характерні для вірусів (онкогенів), які викликають ракову хворобу, виявлені в ДНК дріжджів. Це відкриття свідчить про роль цих генів у забезпеченні життєдіяльності одноклітинних організмів, яку вони відігравали задовго до появи на Землі багатоклітинних форм. З іншого боку, можливість тонкого експериментування з дріжджовими клітинами (поки недосяжна для багатоклітинних організмів) з наступною екстраполяцією отриманих даних на клітини савців є значним внеском у розвиток знань про молекулярні механізми раку.

Клонування варіантів генів, що зумовлюють схильність їхніх носіїв до серповидно-клітинної анемії, атеросклерозу, раку, гемофілії і багатьох інших захворювань обміну, відкриває можливість точної діагностики генетичної схильності до цих патологічних процесів і вишукування способів відновлення дефектних генів у їхніх носіїв і нащадків. Уведення недефектних варіантів клонованих генів у клітини, наприклад кісткового мозку чи шкіри, дозволяє послабити прояв генетичних захворювань чи усунути їх зовсім. Розробка способу введення недефектних клонованих генів у статеві клітини дозволить уникнути можливості передачі генетичних порушень нащадкам. Вже отримані еукаріотичні гени, біологічна активність яких реалізується не

тільки при введенні їх у бактерії, але й в еукаріотичні клітини. Клонований ген β -глобіну кролика за допомогою вірусу SV40, використаного як вектор, був перенесений у клітини нирок мавпи, де в результаті його експресії вдалося одержати значну кількість β -глобіну кролика. Цей приклад підтверджує можливість усунення генетичних дефектів, а також показує, наскільки такий підхід перспективний для розшифровки регуляторних механізмів експресії генів еукаріотичних організмів.

5.1.6. Перспективи і проблеми біотехнології клонування генів

Такі методи генетичної інженерії, як конструювання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів, стали звичайними прийомами дослідження у молекулярній біології. За їхньою допомогою вдалося вирішити ряд фундаментальних проблем біології, а також виконати багато розробок, що знайшли широке застосування в біотехнології. Слід зазначити, що потенційні можливості методів конструювання рекомбінантних ДНК і клонування генів для вирішення як теоретичних, так і практичних питань ще не вичерпані. Однак з'явилися серйозні побоювання непередбачуваності поведінки рекомбінантних молекул ДНК, трансформованих у кишкові палички. У зв'язку з цим спеціально створена комісія Національної академії наук США опублікувала Звернення, підписане видатними вченими, які висловлювали побоювання щодо росту кількості ракових захворювань, особливо в тих випадках, коли в генетичних експериментах як вектор використовувався онкогенний вірус мавпи SV40. Ці побоювання, як і побоювання стосовно масового поширення маркірованих трансформованих штамів кишкової палички, не підтвердилися, але були запропоновані заходи безпеки, аналогічні тим, як і при роботі зі збудниками інфекційних захворювань.

У лабораторіях, де дозволені дослідження з застосуванням методів генетичної інженерії, заходи безпеки залежно від рівня їхньої надійності розподілені на чотири категорії, а самі експерименти щодо безпеки розділені на три ступені. Чим більше небезпека при конструюванні рекомбінантних ДНК і клонуванні генів, тим надійнішими і жорсткішими мають бути заходи, що

забезпечують безпеку цих робіт. Досліди щодо введення в бактерії рекомбінантних ДНК, одержаних із фрагментів геномної ДНК теплокровних тварин і ДНК відповідних векторів, повинні проводитися в спеціальних ізольованих приміщеннях (боксах) з негативним атмосферним тиском у них, у стерильному одязі. Працювати рекомендується з ослабленими штамми бактерій і вірусів (наприклад, з мутантами фага λ і кишкової палички, які не розмножуються при температурі тіла теплокровних тварин і людини, а також з такими штамми *E.coli*, що втратили здатність до синтезу діамінополімелінової кислоти, яка входить до складу стінки бактеріальної клітини. Запобіжні заходи значно посилюються, коли бактеріальну клітину трансформують рекомбінантними ДНК, що містять гени, експресія яких супроводжується процесом токсинування. Хоча є докази нездатності лабораторних штамів *E.coli* витримувати конкуренцію з бактеріями цього виду, що знаходяться у природному середовищі (кишечник людини і тварин), рекомендовано створювати і використовувати в роботі тільки такі клітини-хазяї, імовірність виникнення яких за межами лабораторії складає 10^{-8} . Проводяться роботи зі створення модифікованих векторів, реплікація яких є термолабільним процесом (температура тіла теплокровних тварин і людини є лімітуючим чинником реплікації), а також векторів, у яких система ферментів, що забезпечують рестрикцію і модифікацію, була б представлена відповідно термостабільною рестриктазою і термолабільною метилазою. У такому випадку вектор, потрапляючи в організм теплокровної тварини або людини, має зруйнуватися.

Рівень розвитку молекулярної біології вже сьогодні дозволяє проводити дослідження з ідентифікації генів, що впливають на статуру, розвиток інтелекту і здібностей. Небезпека в тім, що гуманні спроби виправлення очевидних генетичних дефектів можуть перерости в амбіційні плани поліпшення генетичного матеріалу людини.

Друге коло проблем пов'язане зі з'ясуванням причин можливих змін сформованих взаємин в екологічних системах з появою організмів — носіїв функціонально активних змінених генів. Наводяться переконливі аргументи, які свідчать про те, що імовірність появи екологічних порушень незначна, тому що

організми, у яких відбулися генетичні зміни, мають меншу життєздатність порівняно зі спорідненими організмами, у яких генотип не мав змін через утручання генетичних інженерів. Хоча авторитетні дослідники подекуди про безпеку генетичних маніпуляцій для екосистем, можливість порушення не виключена. Біологи, подібно до фізиків 40 років тому, переступили межу, за якою їхня діяльність залишалася поза категоріями добра і зла.



Контрольні питання

1. Які практичні проблеми сільськогосподарського виробництва можна вирішити і вже вирішуються за допомогою методів генетичної інженерії?
2. Що було підґрунтям становлення технології одержання рекомбінантних ДНК і клонування генів?
3. Що таке рекомбінантна ДНК?
4. Яка роль рестрикційних ендонуклеаз у технології одержання рекомбінантних ДНК?
5. Як слід розуміти поняття «експресія гена»?
6. Які особливості експресії генів ссавців?
7. Механізм експресії гена.
8. Регулювання експресії гена.
9. Особливості будови ДНК-векторів.
10. Які вектори переважно використовуються для перенесення генетичної інформації?
11. Що таке інтрони?
12. Що являють собою транспозони?
13. У чому полягає роль транспозонів?
14. Механізм переміщення транспозонів у геномі.
15. У якій послідовності здійснюється конструювання рекомбінантної ДНК?
16. Якими методами досягається з'єднання молекул ДНК?
17. Як здійснюється з'єднання фрагментів ДНК і ДНК-вектора?
18. Які є ферменти рестрикції?
19. Які послідовності нуклеотидів гідролізують рестриктази? Навести приклади.

20. Назвіть етапи клонування молекул рекомбінантної ДНК.
21. Що таке клон?
22. Як проводиться ідентифікація клонів?
23. За якою ознакою проводиться ідентифікація клонів?
24. Що є основою для відбору клонів?
25. Як проводиться відбір клонів?
26. Які біохімічні реакції відбуваються в процесі дозрівання інформаційної РНК?
27. Що означає зворотна транскриптаза та які властивості цієї сполуки?
28. Яка роль ферменту зворотної транскриптази у генній інженерії?
29. Чи є в генах-копіях інтрони?
30. Що являють собою «генні машини»?
31. З якою метою використовуються «генні машини»?
32. Механізм функціонування «генної машини».
33. В чому полягає особливість експресії еукаріотичного гена у чужорідному оточенні прокаріотичної клітини?
34. Які етапи включає експресія структурних генів?
35. Які функції промотору?
36. Що таке репресор та ген-регулятор?
37. Якими методами можна досягти підвищення ефективності експресії генів?
38. Як досягається збільшення кількості продуктів, синтез яких контролюється певними генами?
39. Де використовуються мікроорганізми, що містять рекомбінантні молекули ДНК?
40. Яке значення має біотехнологія конструювання рекомбінантних молекул ДНК та клонування генів для фундаментальних досліджень?
41. Значення біотехнології конструювання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів для вирішення народно-господарських питань.
42. Проблеми, які виникають при використанні методів генної інженерії?
43. Які є об'єктивні підходи для оцінки екологічної чистоти і безпечності продукції, одержаної методами генної інженерії?

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ

ДНК-технології — це один з розділів молекулярної генетики, методи якого базуються на здатності специфічних ферментів-рестриктаз розщеплювати молекули ДНК на окремі фрагменти, які використовуються для упровадження у геноми плазмід бактерій, фагів з метою одержання гібридних форм, які складаються з власної ДНК і вбудованих фрагментів чужорідної ДНК. Основні методи ДНК-технологій: клонування ДНК, ідентифікація генів, секвенування та синтез олігонуклеотидів, спрямований мутагенез ДНК, експресія синтезованих фрагментів ДНК, технологія одержання рекомбінантної ДНК та введення її у клітини. ДНК-технології дозволяють розробляти науково обгрунтовані програми селекції, виявляти та оцінювати поліморфізм молекул ДНК, досліджувати структуру геному, генофондів, забезпечити створення банків генів. ДНК-технології використовуються для: контролю за якістю сільськогосподарської сировини і продуктів харчування, діагностики інфекційних хвороб, виявлення генетичних (спадкових) захворювань на ранніх стадіях розвитку, дослідження геному на виявлення продуктивних якостей і використання у селекції, створення генетичних паспортів видів сільськогосподарських тварин, порід, таксономічних груп тощо. Сучасні ДНК-технології застосовують для керування потоком генетичної інформації, збереження біорізноманіття, створення нових форм тварин для одержання «біореакторів» (продуцентів, необхідних для людини білків), спрямованого отримання бажаних генотипів (використання стовбурових ембріональних клітинних ліній, трансплантації ядер бластомерів та соматичних клітин у яйцеклітини) та ін. Розвитку ДНК-технологій сприяла їх здатність вирішувати різні проблеми біології, медицини, сільського господарства, екології тощо.

У сучасний період бурхливий розвиток ДНК-технологій відбувається завдяки розробці нових молекулярно-генетичних

методів досліджень. Методи аналізу ДНК засновані на рестрикції, гібридизації та ампліфікації. Рестрикція (restriction — розщеплення) — це процес розщеплення чужорідної молекули ДНК під дією специфічних бактеріальних ферментів-рестриктаз у певних специфічних ділянках, що мають назву сайти (site — ділянка) рестрикції, довжиною від 4–7 до 8–12 пар нуклеотидів. За допомогою рестриктаз макромолекули ДНК розщеплюються на фрагменти від декількох сотень до декількох тисяч пар нуклеотидів. Гібридизація (hybridization) — це здатність комплементарних ланцюгів нуклеїнових кислот утворювати комплекси. Принцип комплементарності використовують для ідентифікації окремих фрагментів ДНК і цілих організмів. Ампліфікація (amplification) — це процес утворення додаткових копій ділянок хромосомної ДНК, які містять певні гени.

Молекулярна біологія базується на принципі генетичного детермінізму. Дослідження на молекулярному рівні структурної організації як генів, так і в цілому геному дозволяє вивчати механізми функціонування генів. Використання молекулярно-генетичних методів дозволило дослідити в першу чергу геном прокаріот. Для молекулярно-генетичного аналізу складного геному еукаріот були необхідні інформативні маркери. Спочатку використовувалися тест-системи для виявлення продуктів генів (білковий поліморфізм), потім на рівні генетичного матеріалу клітин (поліморфізм ДНК). Більш інформативним виявилось використання як маркерів поліморфних послідовностей нуклеотидів ДНК за поліморфізмом довжини рестриктних фрагментів (ПДРФ). Проблема пошуку маркерів на рівні молекул ДНК була практично вирішена, коли відкрили метод ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Полімеразна ланцюгова реакція

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яку називають «золотою кулею» діагностики, — один із сучасних високочутливих методів молекулярної біології, який базується на принципі виявлення і багаторазового копіювання (ампліфікації) індивідуальних фрагментів ДНК. Принцип методу ПЛР (Polymerase

chain reaction (PCR)) розроблений Кері Мюллісом зі співробітниками (фірма «Cetus», США) у 1983 р., який за ці роботи у 1993 році одержав Нобелівську премію. Зараз ПЛР широко використовується як для наукових досліджень, так і для діагностики в закладах охорони здоров'я, структурах держсанепіднагляду (генотипування, діагностика генетичних та інфекційних захворювань), ветеринарно-санітарної експертизи (визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі кормів) та ін.

В основі методу ПЛР лежить природний процес – комплементарна добудова ДНК матриці, яке здійснюється за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Ця реакція має назву реплікації ДНК. Природна реплікація ДНК має декілька стадій:

1. Денатурація ДНК (розплетення подвійної спіралі, розходження ниток ДНК).
2. Утворення коротких дволанцюгових ділянок ДНК (затравок, необхідних для ініціації синтезу ДНК).
3. Синтез нового ланцюга ДНК (комплементарна добудова обох ниток).

Цей процес можна використовувати для одержання копій коротких ділянок ДНК, специфічних, наприклад, для конкретних мікроорганізмів, тобто здійснювати цілеспрямований пошук таких специфічних ділянок, що і є метою генодіагностики для виявлення у даному випадку збудників інфекційних захворювань.

Полімеразна ланцюгова реакція, або специфічна ампліфікація ДНК, дає змогу вибірково синтезувати *in vitro* невеликі ділянки ДНК, які мають розмір від декількох десятків до сотень пар олігонуклеотидів (від грец. *Oligos* – малий). Тобто ампліфікація – це процес утворення додаткових копій певної нуклеотидної послідовності ділянок хромосомної ДНК. Як матриця можуть використовуватися різні зразки ДНК, що містять послідовність, яку треба ампліфікувати (тиражувати). Таким чином, ПЛР – це багаторазове збільшення кількості копій (ампліфікація) специфічної ділянки ДНК, яке каталізується ферментом – ДНК-полімеразою.

Для проведення ампліфікації необхідні наступні компоненти:

ДНК-матриця (ДНК або її частина, яка містить досліджуваний специфічний фрагмент);

Праймери (від англ. Primer — початковий, основний) — синтетичні олігонуклеотиди (20–30 нуклеотидних пар), які комплементарні послідовностям ДНК у межах специфічного фрагмента. Вибір специфічного фрагмента та підбір праймерів відіграє важливу роль у специфічності проведення ампліфікації, що позначається на якості аналізу.

Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (ДНТФ) (суміш чотирьох ДНТФ, які є матеріалом для синтезу нових комплементарних ланцюгів ДНК).

ДНК-полімераза. При проведенні ПЛР-аналізу використовують різні ферменти:

Taq-полімераза — термостабільна ДНК-полімераза, яка каталізує подовження ланцюгів праймерів шляхом послідовного приєднання нуклеотидних основ до зростаючого ланцюга ДНК, що синтезується.

Taq-полімераза виділена з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*, яка живе в гарячих джерелах. Фермент стабільний при високих температурах і зберігає високу активність у процесі ампліфікації.

Tth-полімераза, яка виділена з термофільної бактерії *Thermus thermophilus*. Температурний і рН оптимуми відповідно дорівнюють 75 °С і 9,0. Фермент має ревертазну активність і використовується з РНК-матрицею у реакції синтезу комплементарної молекули ДНК. Для одержання специфічних ділянок геному РНК-вмісних вірусів спочатку отримують ДНК-копію з РНК-матриці шляхом використання реакції зворотної транскрипції (RT), яка каталізується ферментом — ревертазою (зворотною транскриптазою).

Pwo-полімераза, яку отримують з термофільної бактерії *Puococcus woesei*. Фермент більш термостабільний, ніж *Taq-* і *Tth-полімерази*.

Буферний розчин (реакційне середовище, яке містить іони Mg^{2+} , необхідні для підтримки активності ферменту).

Необхідною умовою при ампліфікації є наявність «праймерів» — синтетичних невеличких фрагментів ДНК, які складають-

ся з 20–30 пар нуклеотидних основ. Праймери комплементарні ділянкам (сайтам) відпалу на ідентифікованій матричній ДНК.

ПЛР-аналіз відбувається циклами, кожний з яких складається з трьох послідовних стадій, які відбуваються при різних температурах:

1. Денатурація або процес плавлення молекул ДНК ($t^{\circ}=93-95^{\circ}\text{C}$). При цьому дволанцюгова форма перетворюється на одноланцюгову, яка стає доступною для праймерів.
2. Відпал — приєднання праймерів, один з яких комплементарний початку одного ланцюга ДНК, а другий — кінцю іншого.
3. Подовження (елонгація) ланцюга ДНК за рахунок приєднання дезоксинуклеотидтрифосфатів за принципом комплементарності. Відбувається за участю ДНК-полімерази термофільної бактерії *Thermus aquaticus* (Тақ-полімерази) при температурі 60–70 °С. Утворюються дволанцюгові молекули ДНК — точні копії необхідного фрагмента.

Цей триступеневий цикл, у процесі якого утворюються синтезовані фрагменти ДНК-амплікони, повторюється 30–40 разів. З кожним циклом кількість сегментів ДНК, обмежених з обох кінців, що використовуються праймерами, збільшується експоненціально ($C=2^n$, де n — кількість циклів). Вихід інших продуктів збільшується лінійно.

Полімеразна ланцюгова реакція проводиться в термоциклері (ампліфікаторі) — термостаті, в якому автоматично змінюється температурний режим. Наступний етап ПЛР — детекція або виявлення ампліфікованої ДНК. Ампліфіковані специфічні фрагменти ДНК виявляють методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі з барвником (бромистий етидій). Барвник утворює з фрагментами ДНК стійку сполуку, яка проявляється у вигляді смуг, що світяться при опроміненні гелю УФ-випромінюванням при довжині хвилі 290–330 нм. Продукт електрофорезу розглядають в УФ-світлі за допомогою спеціального приладу — транслюмінатора і фотографують.

ПЛР може бути доповнена рестрикційним аналізом ампліфікованої ДНК, що потрібно для визначення поліморфізму ДНК.

Для лабораторії ПЛР необхідні три ізольовані кімнати з наявністю води і вентиляції. Для попередження контамінації або

потрапляння будь-яким шляхом із зовнішнього середовища в реакційну суміш продуктів ампліфікації, що викликає хибнопозитивні результати, основними видами робіт є підготовка досліджуваних зразків, ампліфікація та детекція продуктів ПЛР, які потрібно ізолювати один від одного і проводити в різних приміщеннях. Робота організовується в одному напрямі: від ПЛР-приміщення до кімнати, де відбувається детекція продуктів полімеразної реакції.

При проведенні ПЛР необхідно одночасно проводити постановки контрольних проб — позитивної і негативної. В пробірку з позитивним контролем вносять препарат, в якому міститься визначена послідовність ДНК. У пробірці з негативним контролем замість досліджуваного зразка ДНК вносять аналогічний об'єм води. Використовують також так званий «внутрішній контроль», при якому в реакційну суміш додають зразок ДНК, який має специфічні сайти приєднання праймерів, але відрізняється за довжиною від очікуваного цільового фрагмента. Виявлення специфічних продуктів ампліфікації внутрішнього контролю — сигнал успішного проходження ПЛР. Якщо продукти ампліфікації внутрішнього контролю не виявляються — реакція за будь-яких причин не відбулася.

Сьогодні велика увага приділяється розробці ПЛР-тест-систем (діагностикумів), які необхідні для виявлення ДНК збудника різних інфекційних хвороб.

Одним з надто складних завдань ветеринарних лабораторій є визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів. В останні роки ця проблема набула великого значення у зв'язку з відкриттям пріонних захворювань сільськогосподарських тварин, які належать до групи губчастоподібних енцефалопатій (ГЕ). З 1996 р. у всіх країнах Євросоюзу введена заборона на згодовування жуйним тваринам м'ясокісткового борошна, яке виготовлене з органів ссавців. Це пояснює важливість визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів.

Значно складніше провести цю ідентифікацію у кормах, які піддавалися термічній обробці (м'ясокістковому та рибному борошні, сухих та консервованих кормах для домашніх тварин). При термічній обробці відбувається денатурація білків і втрата

видової специфічності, у зв'язку з чим імунодифузія в гелі, ізоелектричне фокусування, імуноферментний аналіз, які використовуються для ідентифікації сирого м'яса, в такому випадку непридатні. Є підстави сподіватися, що використання ПЛР-тест-систем, які мають високу чутливість і специфічність, дасть можливість вирішити цю проблему. Прикладом такої тест-системи є розроблена методика для визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі сумішей.

При розробці тест-системи для визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі продуктів харчування та кормів використовували наступну схему. Шляхом аналізу нуклеотидних послідовностей були вибрані специфічні олігонуклеотидні праймери, які специфічні до ДНК мітохондріального геному жуйних. Для диференціювання виду жуйних праймери відібрані з урахуванням мультиплексної ПЛР, у якій утворюється два специфічних ПЛР-продукти різної довжини: перший для ДНК великої рогатої худоби — (680 п.н.), а другий — для ДНК дрібної рогатої худоби (350 п.н.). Після цього у препаратах ДНК, які виділені з крові ВРХ, овець, свиней, птиці та м'яса риби, визначається чутливість та специфічність вибраних праймерів. Проведені дослідження дозволили встановити, що коли ІФА дозволяє виявляти домішку м'ясокісткового борошна в рибному борошні тільки в концентрації не менше 50 %, то при проведенні ПЛР-аналізу чутливість зростає і дає можливість визначати вже 1 % домішку. Тобто при виявленні домішок тканин жуйних тварин у складі кормів чутливість ПЛР тест-системи була у 50 разів вищою, ніж при проведенні імуноферментного аналізу.

Використання тест-систем дозволяє запобігти фальсифікації рибного борошна тканинами ссавців, проводити диференціацію видової належності протеїнів у складі кормів для тварин і м'ясопродуктах. Це також має важливе епідеміологічне значення.

Зараз ПЛР — один з основних молекулярно-генетичних методів, які застосовуються в різних галузях:

- ✓ тваринництві — це дослідження геному сільськогосподарських тварин на наявність продуктивних якостей для вирішення проблем селекції; діагностика спадкових хвороб тварин; створення генетичних паспортів порід, видів; діагностика

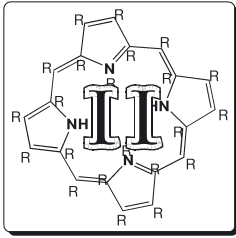
інфекційних захворювань та проведення епізоотологічного моніторингу;

- ✓ у ветеринарній медицині — це діагностика таких хвороб, як сальмонельоз, бруцельоз, лістеріоз, туберкульоз, чума ВРХ, класична чума свиней, хвороба Ауески, лейкоз, стафілококоз, мікоплазмоз, хвороба Марека, хвороба Гамборо, хвороба Ньюкасла, чума м'ясоїдних, вірусний ентерит, реовірусна інфекція, генетичні захворювання та ін;
- ✓ у харчовій промисловості — для визначення наявності різних патогенів у продуктах харчування.



Контрольні питання

1. Назвіть основні етапи ДНК-технологій.
2. Де застосовують сучасні ДНК-технології?
3. Які існують методи аналізу ДНК?
4. Дати визначення процесам рестрикції, гібридизації та ампліфікації.
5. На якому принципі базується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)?
6. Який процес покладено в основу методу ПЛР?
7. Назвіть стадії реплікації ДНК.
8. Які компоненти необхідні для проведення ампліфікації?
9. З яких циклів складається ПЛР-аналіз?
10. За допомогою якого методу відбувається детекція або виявлення ампліфікованої ДНК?
11. Вимоги до лабораторій ПЛР.
12. Яка мета проведення постановки контрольних проб при проведенні ПЛР?
13. Як за допомогою методу ПЛР визначають видову належність м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів?
14. Використання ПЛР у тваринництві.
15. Використання ПЛР у харчовій промисловості.
16. Використання ПЛР у ветеринарній медицині.



Частина

Спеціальні біотехнології

Розділ 7.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА І ЗАСТОСУВАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ

7.1. ІНЖЕНЕРНА ЕНЗИМОЛОГІЯ. ЗАВДАННЯ ІНЖЕНЕРНОЇ ЕНЗИМОЛОГІЇ

Інженерна ензимологія поряд з генетичною і клітинною інженерією складає фундамент нової біотехнології.

Інженерна ензимологія — це галузь біотехнології, яка базується на використанні каталітичних функцій ферментів (або ферментних систем) у ізольованому стані або в складі певних клітин для одержання відповідних цільових продуктів.

Слово «інженерна» свідчить про створення конструкції (від франц. *engin* — машина), в даному випадку — конструювання біокатализаторів з заданими властивостями з подальшим використанням у біотехнологічному процесі.

Це новий науково-технічний напрям, який базується на хімічній ензимології, біохімії, хімічній технології та інженерно-економічних дисциплінах. Основне завдання інженерної ензи-

мології — розробка біотехнологічних процесів, у яких використовується каталітична дія ферментів, виділених зі складу біологічних систем або ферментів, які знаходяться в клітинах, штучно позбавлених здатності до росту. Існує й і інше визначення завдання інженерної ензимології: це конструювання біоорганічних каталізаторів з передбаченими властивостями на основі ферментів або поліферментних комплексів, виділених з біологічних систем, які розвиваються. З огляду на практичні потреби одержання певних продуктів передбачені властивості — це визначений термін служби каталізатора за певних умов (температури, рН, іонної сили розчину), його селективність (специфічність) дії, продуктивність (активність), імуногенність, токсичність і т.д.

Однак завдання інженерної ензимології набагато ширші, ніж створення каталізаторів нового типу. Найголовніша мета цієї дисципліни — розробити наукові основи використання ферментних каталізаторів для створення нових біотехнологічних процесів у промисловості, нових методів у терапії і діагностиці, аналізі, органічному синтезі й інших галузях практичної діяльності.

Завдяки високій активності і специфічності деякі ферменти і ферментні системи знайшли застосування як біокаталізатори в різних галузях практичної діяльності: в харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній та інших галузях промисловості, в гуманній і ветеринарній медицині, в сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі тощо. У промисловості, наприклад, використовуються в основному препарати для гідролізу природних полімерів білків, крохмалю, пектинів (табл. 7.1).

Але більш широке технологічне використання розчинних або нативних ферментів затримувалось через низку причин, які залежать від природи самих ферментів. Перш за все ферменти можуть функціонувати лише при незначних коливаннях рН середовища, температури, іонної сили розчину і відсутності інгібіторів; вони нестійкі при зберіганні і впливові різних факторів, особливо теплових; багаторазове використання ферментів утруднене через складність їх відокремлення від продуктів реакції, в результаті чого вони використовуються, як правило, один раз; трудомісткість очищення ферментів і одержання їх у достатньо активному стані і, як наслідок, висока вартість нативних

ферментів. Подолати ці труднощі вдалося шляхом іммобілізації ферментів, тобто переведення їх із розчинної в нерозчинну форму.

Таблиця 7.1. Ферменти, які використовуються у промисловості (І.В. Березін і ін., 1987)

Ферменти	Сфера застосування
Глюкозидази: α-амілаза глюкоамілаза інвертаза пектиназа целюлаза	Гідроліз крохмалю, обробка текстильних виробів Одержання глюкози, одукрення ліків і пива Виробництво кондитерських виробів Освітлення вин і фруктових соків Обробка соломи
Протеази: протеази мікробного походження бромелайн папаїн трипсин ренін ліпази	Додатки до детергентів, випікання хліба, освітлення вин і пива, розм'якшення м'яса, вичинка шкіри Виробництво поживних сумішей на основі гідролізатів білків, розм'якшення м'яса Освітлення пива, розм'якшення м'яса Вичинка шкіри Вироблення сирів Модифікація смаку молочних продуктів
Оксидоредуктази: глюкозооксидаза каталаза	Видалення кисню із харчових продуктів Видалення перекису водню після стерилізації молочних продуктів
Ізомерази: глюкозоізомераза	Виробництво глюкозо-фруктозних сиропів

В основу сучасної інженерної ензимології покладено використання іммобілізованих ферментів і ферментних систем.

7.2. ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА КЛІТИН

Біологічно активні речовини як високо-, так і низькомолекулярні (ферменти, білки, поліпептиди, глікопротеїни, нуклеїнові кислоти, антигени, антитіла, антибіотики, гормони, вітаміни, лікарські речовини тощо) можуть бути іммобілізовані, тобто переведені у нерозчинний стан зі збереженням (частковим або повним) їх активності.

Іммобілізація це обмеження рухливості молекул та їх конформаційних перебудов. Іммобілізація у широкому розумінні слова — це будь-яке обмеження вільності руху об'єкта в просторі.

Найбільшу групу іммобілізованих біологічно активних речовин складають ферменти. Основні принципи і способи іммобілізації вперше були розроблені для ферментів і іммобілізовані ферменти вперше почали широко застосовувати в різних галузях народного господарства.

Так, дослідження Дж. Нельсона і Е. Гриффина ще в 1916 р. показали, що інвертаза, адсорбована на вугіллі (тобто іммобілізована), зберігає каталітичну активність. У 20–30 рр. минулого століття роботи у цьому напрямку були продовжені, і в 1939 р. Дж. Пфанмюллер і Г. Шлейх одержали перший патент на використання адсорбованих на дерев'яній тирсі протеолітичних ферментів для обробки шкур. У 1953 р. Н. Грубхофером і Д. Шлейтом вперше був застосований метод ковалентної іммобілізації.

Методичні підходи іммобілізації ферментів розповсюджуються і на інші біологічно активні речовини, тому іммобілізація ферментів і іммобілізовані ферменти є модельними об'єктами.

7.3. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ. МЕТА ІММОБІЛІЗАЦІЇ

Під іммобілізацією ферменту розуміють включення його в будь-яку ізольовану фазу, яка відділена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися молекулами субстрату або ефектора, що знаходяться у фазі вільного розчину. Іншими словами — іммобілізація — це включення ферменту в таке середовище, в якому доступною для нього є лише обмежена частина загального об'єму.

Іммобілізований фермент (лат. *Immobilis* — нерухомий) — це фермент, приєднаний тим чи іншим способом до інертної, нерозчинної підкладки або носія (матриці) з частковим або повним збереженням його каталітичної активності.

Іммобілізованим вважають також фермент, вміщений у сіткоподібну матрицю, крізь яку вільно проникають низькомоле-

кулярні субстрати і продукти ферментної реакції, але не можуть пройти макромолекули білка-ферменту.

При іммобілізації обмежується рухливість молекул і відбувається закріплення структури таким чином, що активний центр ферменту зберігає свою каталітичну активність протягом тривалого часу.

Метою іммобілізації є можливість використання ферментних препаратів як промислових каталізаторів у біотехнологічних процесах одержання біотехнологічної продукції, для аналітичної роботи і в лікувальних цілях.

В результаті поєднання ферменту з носієм були створені гетерогенні біокаталізатори, для яких нещодавно, на першій конференції з інженерної ензимології в Хеннікері (США) в 1971 р. був узаконений термін «іммобілізовані ферменти». В літературі ще можна натрапити й на інші терміни, наприклад: «нерозчинні ферменти», «матрицьовані ферменти» тощо, зміст яких однозначний — це препарати ферментів, зв'язаних з нерозчинними носіями.

Однак поняття іммобілізація потрібно розглядати ширше, як будь-яке обмеження вільності руху білкових молекул (або їх фрагментів) у просторі. Цього можна досягнути, окрім зв'язування з нерозчинним носієм, шляхом внутрішньомолекулярної чи міжмолекулярної «зшивки» білкових молекул низькомолекулярними біфункціональними реагентами, або приєднанням ферменту до розчинного полімеру. Такі препарати називають ферментами, модифікованими «зшиваючими» або, відповідно, полімерними реагентами.

Іммобілізовані ферментні препарати мають низку суттєвих переваг при використанні їх з прикладною метою порівняно з нативними попередниками.

По-перше, при іммобілізації ферменти з розряду гомогенних каталізаторів (які знаходяться у тій самій фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (які утворюють особливу фазу, відділену від реагентів). Фермент і реагенти завдяки цьому можуть бути розділені. Це дає можливість: а) зупинити в потрібний момент реакцію; б) регенерувати фермент після закінчення реакції і використати каталізатор повторно; в) одержати продукт, незабруднений ферментом, що дуже важливо в харчовому і фармацевтичному виробництві.

По-друге, використання гетерогенних каталізаторів дозволить проводити ферментативний процес безперервно, наприклад, у проточних колонках, і регулювати швидкість реакції, що каталізується, а також вихід продукту шляхом зміни швидкості потоку.

По-третє, іммобілізація або модифікація ферменту сприяє цілеспрямованій зміні властивостей каталізатора, в тому числі і його специфічності, залежності каталітичної активності від рН, іонної сили розчину, температури й інших параметрів середовища, а також підвищує стійкість (або стабільність) до різних денатуруючих факторів у 100–1000 разів.

По-четверте, іммобілізація ферментів дає можливість регулювати їх каталітичну активність шляхом зміни властивостей носія.

Завдяки одержанню нового класу біоорганічних каталізаторів — іммобілізованих ферментів — стало можливим налагодження промислового крупнотоннажного виробництва біотехнологічної продукції, яке піддається автоматизації.

Метод іммобілізації також дає можливість одержувати препарати пролонгованої і направленої дії для застосування з лікувальною метою у гуманній і ветеринарній медицині та у тваринництві для поліпшення травлення і засвоєння поживних речовин кормів у організмі тварин та збільшення їх продуктивності.

7.4. НОСІЇ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ

Для одержання іммобілізованих ферментів використовуються величезна кількість носіїв (матриць, підкладок) як органічної, так і неорганічної природи.

Усі носії можна розділити на дві основні групи: органічні і неорганічні, які, у свою чергу, можуть бути як природними, так і синтетичними (рис. 7.1).

7.4.1. Органічні полімерні носії

Існуючі органічні полімерні носії можна розділити на два класи: природні і синтетичні. У свою чергу, клас природних полімерів можна розділити на групи відповідно до їх біохімічної

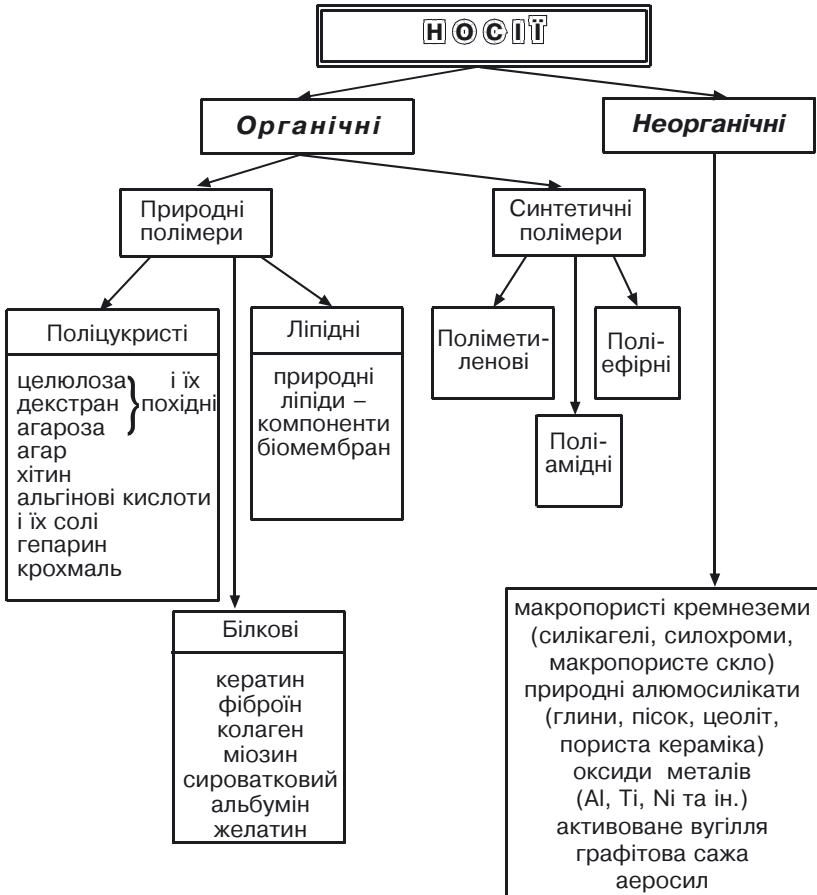


Рис. 7.1. Класифікація носіїв, які використовуються для іммобілізації БАР (О.В. Скородумова, Н.Г. Рибальський, 1990)

класифікації: поліцукристі, білкові і ліпідні носії. Синтетичні полімери також розділяються на групи відповідно до хімічної будови основного ланцюга макромолекул: поліетиленові, поліамідні і полієфірні носії.

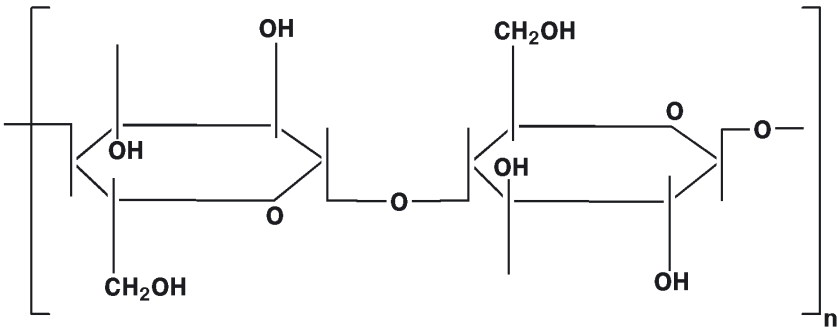
Із цієї групи носіїв широкого застосування для іммобілізації ферментів набули природні поліцукристі носії і синтетичні носії поліетиленового типу.

Природні носії. Велике значення природних полімерів як носіїв для іммобілізації пояснюється їх доступністю і наявністю на їх поверхні реакційноздатних функціональних груп (у вихідному або модифікованому препараті), які легко вступають у різні хімічні реакції, а також високою гідрофільністю. До недоліків природних носіїв належать нестійкість до дії мікроорганізмів і висока вартість деяких з них.

Поліцукристі носії — це целюлоза, декстран, агароза і їх похідні, агар, хітин, альгінові кислоти і їх солі, гепарин, крохмаль.

Серед них широко використовуються похідні целюлози, декстрана, агарози, модифіковані різними хімічними зшивками. Різні типи таких препаратів виробляються зарубіжними фірмами для іммобілізації або афінної хроматографії.

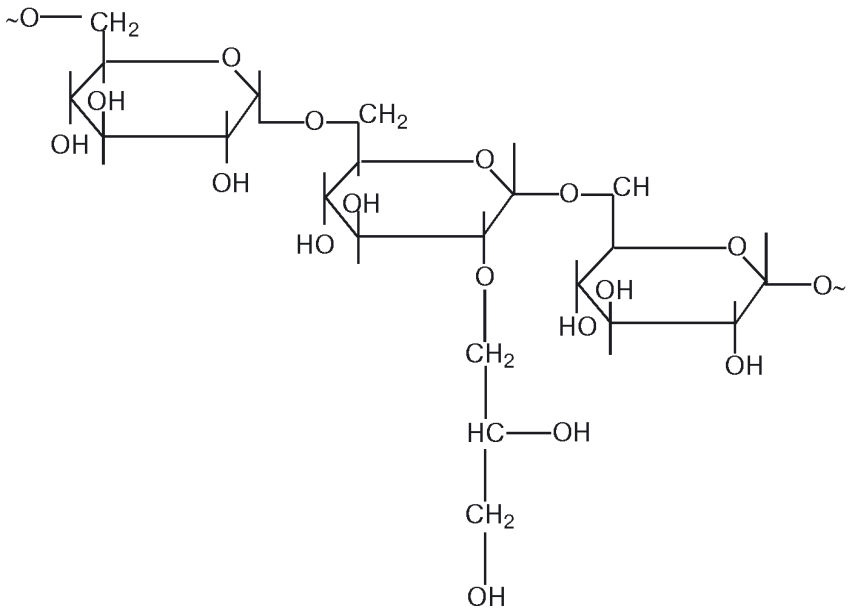
Целюлоза — це полі-1,4-β-D-глюкопіранозил-D-глюкопіраноза:



Целюлоза відзначається високою гідрофільністю, а наявність на її поверхні великої кількості гідроксильних груп дає можливість її легко модифікувати шляхом введення різних замінників. Препарати целюлози для надання їм хімічної стійкості «зшивають» епіхлоргідрином. Для збільшення механічної міцності целюлозу гранулюють шляхом часткового гідролізу, в результаті чого руйнуються її аморфні ділянки. На їх місце для збереження пористості вводять хімічні зшивки. Гранульована целюлоза завдяки простоті одержання, порівняно низькій вартості належить до зручних носіїв для іммобілізації ферментів і

афінної хроматографії. Вітчизняні і зарубіжні фірми випускають різні промислові марки целюлози (табл. 7.2) для іммобілізації ферментів і афінної хроматографії. Недоліком целюлози як носія є нестійкість до впливу сильних кислот, лугів та окислювачів.


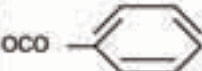
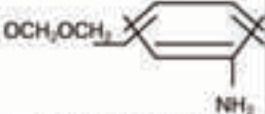

Декстран — полі 1,6- α -D-глюкопіранозил-D-глюкопіраноза — розгалужений поліцукор з бактеріальних джерел, який містить залишки глюкози, що зв'язані в основному 1,6-глюкозидними зв'язками (а також 1,2-, 1,3- і 1,4-зв'язками):



Гелі на основі декстрану, зшиті епіхлоргідрином, випускаються фірмою Pharmacia (Швеція) за комерційною назвою «сефадекс» і Reanal (Угорщина) «молселект». При висушуванні сефадекси стискаються, а у водних розчинах сильно набухають. Середній розмір пор у сітці гелю регулюється зміною частки шивки. Гелі на основі декстрану мають високу хімічну стійкість і гідрофільність. Зарубіжними фірмами випускаються також похідні декстрану, які містять різні функціональні групи (табл. 7.3).

Таблиця 7.2.

Целюлоза і деякі її похідні (І.В. Березін та ін., 1987)

Заміник по OH-групі	Назва препарату	Фірма
—	Целюлоза	"Whatman" (Англія)
$O(CH_2)_2NH_2$	Аміноетилцелюлоза	— // —
OPO_3H	Фосфорилцелюлоза (P-10)	— // —
—	Целюлоза	"Sigma" (США)
—	— // —	"Bio-Rad-Labs" (США)
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Діетиламіноетилцелюлоза	
OCH_2COOH	Карбоксиметилцелюлоза	— // —
$O(CH_2)_2NH_2$	Аміноетилцелюлоза	— // —
	p-амінобензоїлцелюлоза	— // —
— // —	— // —	"Serva" (Німеччина)
$OSOCH_2Br$	Бромацетилцелюлоза	"Reanal" (Венгрія)
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Бензоїлдіетиламіноетилцелюлоза	— // —
		
$OCH_2CONHNH_2$	Гідразидкарбоксиметилцелюлоза	"Miles Labs" (Англія)
$OSOCH_2Br$	Бромацетилцелюлоза	— // —
	m-Амінобензілоксиметилцелюлоза	— // —
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	DEAE-целюлоза	НВО Біохімреактив
OCH_2COOH	КМ-целюлоза	— // —
	p-Амінобензілцелюлоза	НПО Біохімреактив
$O(CH_2)_2SO_3H$	Сульфоетилцелюлоза	— // —
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Триетиламонійетилцелюлоза	— // —

Таблиця 7.3.

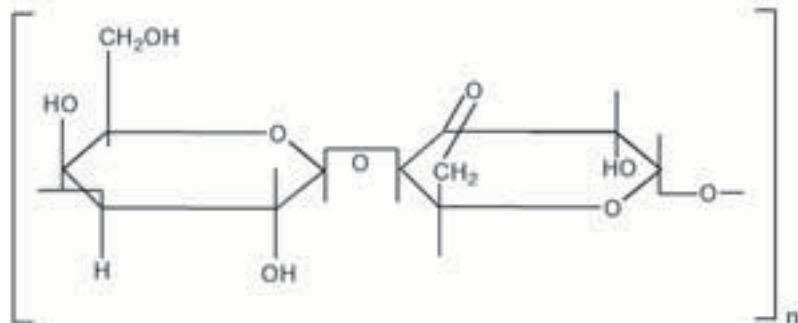
Комерційні препарати похідних декстрану
(І.В. Березін та ін., 1987)

Функціональна група	Назва і марка	Фірма
OCH_2COOH	Карбоксиметилсефадекс (СМ)	Pharmacia (Швеція)
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$	Сульфопропилсефадекс (SP)	—//—
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Діетиламіноетилсефадекс (ДЕАЕ)	—//—
$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{—}$ $\text{—CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	Дітил-(2-оксипропіл) аміноетилсефадекс (QAE)	—//—
OCH_2COOH	Молселект (СМ)	Reanal (Венгрія)
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$	Молселект (SE)	—//—
$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Молселект (ДЕАЕ)	—//—

До групи декстранів можна віднести також **крохмаль** — суміш поліцукрів, основним компонентом якого є амілоза. Шляхом хімічної модифікації крохмалю зшиваючими агентами, такими як формальдегід, гліоксаль, глутаровий альдегід, одержаний новий носій **губчастий крохмаль** з підвищеною стійкістю до ферментів, які гідролізують поліцукри.

На основі декстранів одержують водорозчинні препарати з різними функціональними групами, які використовуються в медицині як носії лікарських речовин. Вибір носіїв на основі декстрану для медичних цілей обумовлено тим, що вони легко піддаються деградації.

Агароза — полі- β -галактопірозил-3,6-ангідро- α -L-галактопіраноза:



Агароза широко використовується для іммобілізації, але вартість її висока, через що розробляються методи її модифікації з метою одержання форм, які легко регенеруються. При охолодженні гарячого 2–6%-го водного розчину агарози до температури нижче 45 °С утворюються міцні крупнопористі гелі, які є свого роду складною сумішшю із заряджених і нейтральних поліцукрів. У процесі утворення гелю індивідуальні поліцукридні ланцюги утворюють подвійні спіралі, які потім агрегують з утворенням «вузлів». При температурі близько 100 °С гель агарози розплавлюється, тому на відміну від сефадексів його не можна автоклаувати. Висушування агарози призводить до незворотньої деструкції гелю, тому його необхідно зберігати у вигляді водної суспензії.

Гелі на основі агарози виробляються різними зарубіжними фірмами і випускаються під комерційними назвами «сефароза», «біогель А», «ультрагель А», «сефароза СL» (табл. 7.4).

Агар виділяють з клітинних мембран деяких червоних морських водоростей. Точний склад його невідомий. Однак установлено, що він містить два поліцукри: агарозу і агаропектин. Гелі агару утворюються аналогічно до агарозних при охолодженні водного розчину до температури 38 °С. Після висушування гель агару перетворюється на прозору плівку, що дає можливість використовувати для вивчення іммобілізованого в гелі ферменту оптичні методи дослідження.


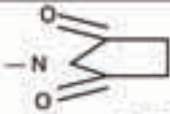
До переваг агару варто віднести низьку вартість і нетоксичність. Відмінною особливістю цього носія є здатність формувати механічно міцні гелі навіть при малих концентраціях у розчині.

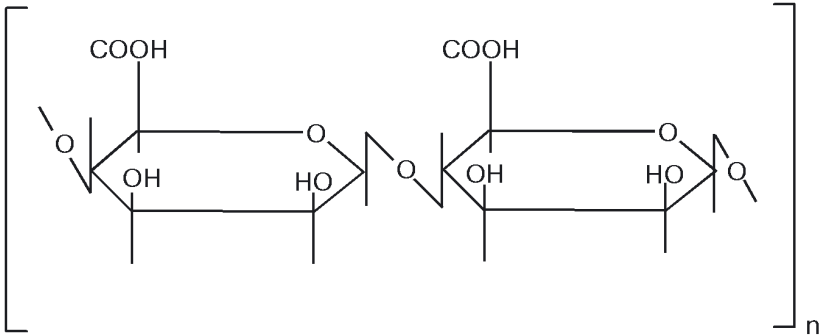
Суттєвого покращення властивостей агару можна досягнути зшиванням епіхлоргідрином, діпоксидними сполуками тощо. Зшитий агар стійкий до нагрівання навіть у лужному середовищі, має високу механічну міцність, а наявність на поверхні великої кількості гідроксильних груп дає змогу для проведення модифікації. Це дало підставу вважати його майже ідеальним носієм.

Альгінові кислоти і їх солі — це поліцукри бурих морських водоростей, які складаються з поєднаних β -1,4-зв'язками залишків D-маннуринової кислоти:

Таблиця 7.4.

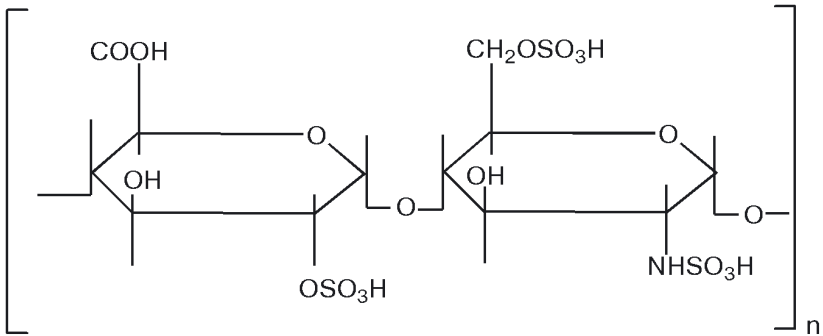
Агароза і деякі її похідні (І.В. Березін та ін., 1987)

Функціональна група (заміник по OH-групі)	Назва і марка	Концент- рація агарози, %	Фірма
—	Сефароза 6В	6	Pharmacia (Швеція)
—	Сефароза 4В	4	— // —
—	Сефароза 2В	2	— // —
$-\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Cl}^+$	DEAE-сефароза CL-6В	6	— // —
$-\text{OCH}_2\text{COOH}$	KM-сефароза CL-6В	6	— // —
$-\text{OCN}$	Бромціансефа- роза 4В	4	— // —
$-\text{OCH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-$	Октилсефароза CL-4В	4	— // —
$-\text{OCH}_2-\underset{\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4}{\text{CHON}}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 	Фенілсефароза CL-4В	4	— // —
	Біогель А-0,5	10	Bio-Rad Labs (США)
	Біогель А-1,5	8	— // —
	Біогель А-5	6	— // —
	Біогель А-15	4	— // —
	Біогель А-50	2	— // —
	Біогель А-150	1	— // —
$-\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	DEAE-біогель А Активована	— 4	— // — Pharmacia (Швеція)
$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-\text{COO}-$	СН-сефароза 4В		— // —
 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{CH}_2-$ $ \text{OH}$ $-\text{O}(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{CH}_2-$ $ \text{CH}-\text{CH}_2$ $ \text{O}$	Епоксиакти- вована сефароза 6В	6	Pharmacia (Швеція) — // —



Характерною властивістю цих носіїв є різка залежність їх розчинності від температури і рН розчину. Так, альгінові кислоти добре розчинні в гарячій воді і мало — у холодній. Альгинати кальцію мають здатність утворювати гелі, які використовуються для іммобілізації ферментів, клітин, органел шляхом включення.

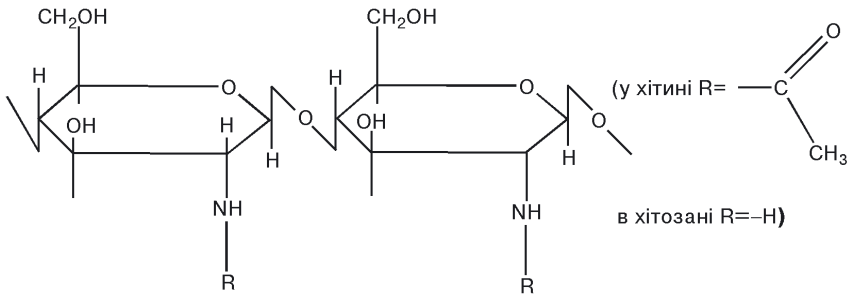
Гепарин — це кислий поліцукор, який містить ланки сульфатованої D-глюкуронової кислоти (або L-ідурунової) і сульфатованого глюкозаміну (або N-ацетил-глюкозаміну):



Він успішно використовується для одержання водорозчинних препаратів іммобілізованих ферментів, які використовуються у медицині для введення *in vivo*.

Загальними недоліками поліцукристичних носіїв є їх нестійкість до дії мікроорганізмів і неспецифічна сорбція білків.

Хітин — природний амінополіцукор. Його можна розглядати як целюлозу, в якій CH_2OH -група замінена ацетамідним залишком:



Він є основним компонентом зовнішнього скелету ракоподібних, комах, а також клітинних оболонок деяких грибів. Ця сполука є відходом промислової переробки креветок і крабів, тому доступна у великих кількостях при відносно невеликій вартості.

Хітин має пористу структуру, не розчиняється у воді, розбавлених кислотах і лугах, а також у органічних розчинниках. Для переведення у реакційноздатну форму він може модифікуватися глутаровим альдегідом, а також солями важких металів (наприклад Ti).

Обробка хітину концентрованими розчинами лугів (деацільовання) приводить до утворення **хітозану**. Хітозан, який має вільні аміногрупи, може використовуватися для ковалентної іммобілізації ферментів за допомогою таких біфункціональних реагентів, як діальдегіди, дізоціанати. На відміну від хітину хітозан розчиняється у мінеральних і органічних кислотах, тому для іммобілізації часто використовується у вигляді розчинів (рН 3–7).

При використанні хітозану як носія одержані препарати іммобілізованих ферментів мають високу каталітичну активність і стійкість до дії мікроорганізмів, а також спостерігається суттєве підвищення їх термостабільності.

Значний інтерес останнім часом викликають мікробні хітознази, які ще недостатньо вивчені. Для виділення хітозназів із

продуцента *Bacillus* sp. 739 і їх афінного очищення ефективним сорбентом виявився колоїдний розчин хітозану (Г.Е. Актуганов і ін., 2003). Для адсорбції доцільна концентрація хітозану 0,12–0,15 %, що сприяє значній економії носія і зберігає можливість його подальшої регенерації.

У природі хітозан розповсюджений не так широко, як хітин, і виявлений поки що лише у деяких видів нижчих грибів (К.Г. Скрябіна та ін., 2000). Тому у промислових масштабах його одержують в основному з хітину панцирів крабів або креветок шляхом лужного дезацетилювання.

Білкові носії. До них належать кератин, фіброїн, фібрин, колаген, міозин, сироватковий альбумін, казеїн та інші.

Використання білків як носіїв для іммобілізації ферментів має велике практичне значення, наприклад, у медицині. Такі носії дозволяють наблизитись до умов функціонування ферментів *in vivo*, вирішити проблему біодеградації і використати більшість із них у вигляді мембран і плівок. Іммобілізацію на білкових носіях можна проводити як у присутності зшиваючих агентів, так і без них.

Загальним недоліком для білкових носіїв, які використовуються в медицині, є їх імуногенність при введенні в організм (винятком є колаген і фібрин).

Найчастіше як носії використовуються кератин, фіброїн, колаген, міозин і сироватковий альбумін.

Колаген — фібрилярний білок групи склеропротеїдів. Він є основним компонентом хрящів і сухожилля, має високу стійкість до розриву. На своїй поверхні колаген має велику кількість реакційноздатних груп, його можна легко модифікувати, надаючи матриці широкий набір бажаних властивостей. Так, блокуванням аміно- або карбоксильних груп можна змінити поверхневий заряд носія і, відповідно, гідрофільно-гідрофобний баланс; за допомогою зшиваючих агентів можна одержати стиснену мікроструктуру.

Колаген має високу гідрофільність. Він здатний сорбувати від 1 до 5 г води на 1 г білка, залишаючись при цьому в нерозчинному вигляді і зберігаючи волокнисту структуру.

Продуктом переробки колагену є **желатин** — розчинна суміш поліпептидів. Одержують його тривалою обробкою колагену окропом, у ході чого гідролізуються деякі ковалентні зв'язки колагену. В результаті волокнистий нерозчинний колаген перетворюється на розчинну суміш поліпептидів, яка називається желатиною і має гелеву структуру.

Цінність цього носія полягає в його нетоксичності, легкій біодеградації, що дозволяє використовувати желатин у фармацевтичній і харчовій промисловості.

Кератин — фібрилярний білок групи склеропротеїдів, з якого майже повністю складається шерсть, волосся, рогові покриви, пір'я і т.д. Його, як правило, одержують при переробці пір'я (побічний продукт птахопереробних підприємств). Кератин доступний у великих кількостях і дешевий.

Синтетичні полімерні носії. Величезна різноманітність доступних синтетичних полімерів забезпечила їх широке використання як носіїв для іммобілізації ферментів. Вводячи в полімерні молекули різні функціональні групи, можна у широких межах змінювати фізичні і хімічні властивості носія.

Синтетичні полімери універсальні і можуть використовуватись як для ковалентної і сорбційної іммобілізації ферментів, так і для включення в структуру носія (в гелі, мікрокапсули, трубки).

Найбільш широко використовуються полімери на основі стиролу, похідних акрілової кислоти, полівінілового спирту, поліамідів, поліуретанів і ін. Структура і фізико-хімічні властивості синтетичних полімерних носіїв абсолютно різні і варіюють у широких межах. Серед них є носії у вигляді сферичних частинок, гранул, порошків, мембран, трубок, пористі носії з макросітчастою, ізопористою і гетеропористою структурами, які використовуються як для сорбційної іммобілізації, так і для одержання гелей, мікрокапсул, або з високореакційними функціональними групами — для ковалентної іммобілізації.

Полімери на основі стиролу. Вони є основою для багатьох промислових марок іонообмінних матеріалів — Дауекс і Амберліт. Для сорбційної іммобілізації використовуються як мікропористі, так і макропористі носії, а також носії, які мають макросітчасту ізопористу і гетеропористу структури. Макросіт-

часті полістіроли подібні до скла, вони мають стабільну структуру пор, не набухають у воді і мають високу механічну міцність. Немодифіковані полістірольні носії гідрофобні.

Введення реакційноздатних груп до складу синтетичних полімерів на основі стиролу дає можливість отримати нові види носіїв, придатних для хімічної іммобілізації.

Полімери на основі похідних акрілової кислоти. Одним із численних похідних акрілової кислоти, які широко використовуються для одержання полімерних гідрофільних носіїв, є акріламід. Його використовують для одержання гелю — поліакріламідний гель (ПААГ). Він випускається низкою фірм. Так, фірма Bio-Rad Labs (США) виробляє ПААГ і його похідні під назвою «*біогелі*» типу Р, Koch-Light (Велика Британія) — «*ен-закріли*», Reanal (Угорщина) — «*акрілекси*».

Фірми LKB (Швеція) та IBF (Франція) випускають також носії змішаного типу на основі ПААГ і агарози під назвою *ультрагелі* типу АсА. Це жорстка матриця, яка створюється агарозою з контролюючою пористістю, що забезпечується ПААГ. Носії випускаються у вигляді водної суспензії сферичних гранул і використовуються для синтезу афінних сорбентів і нековалентної іммобілізації ферментів.

Для ковалентної іммобілізації ферментів поліакріламідний носій активують одним із способів: або в готовий полімер долучають функціональні групи методом хімічної модифікації, або полімеризують відповідне функціональне похідне мономера.

Із інших похідних акрілової кислоти, які використовуються для одержання полімерних носіїв, є *хлорангідрид метакрілової кислоти*.

Більшість полімерів на основі акрілової кислоти не стійкі до впливу багатьох хімічних реагентів, а також набухають у воді і органічних розчинниках. Тому у випадках, коли необхідна жорстка структура носія, використовують змішаного типу носії — *ультрагель типу АсА* на основі синтетичного і природного полімерів. До синтетичних полімерів із жорсткою структурою належать сополімери похідних акрілової кислоти, які випускаються під назвою «*сферон*» фірмами Lachema (Чехія) і Realco Chem. Co (США). Це макропористі полімерні гелі. Вони

механічно міцні, хімічно і біологічно стійкі. Наявність гідроксильних груп на поверхні надає матриці схожість з сефарозою. Це дозволяє використовувати розроблені для сефарози методи активації носія.

Поліамідні носії. Це група різних гетероланцюгових полімерів з амідною групою, яка повторюється $-C(O)-NH-$. Один із способів їх одержання ґрунтується на гомополіконденсації амінокарбонових кислот — **найлон-6, капрон**. Окрім найлону-6, для іммобілізації використовуються **поліізонітрил-найлон, поліаміноарилнайлон** та ін. Амідні групи надають полімерам гідрофільності.

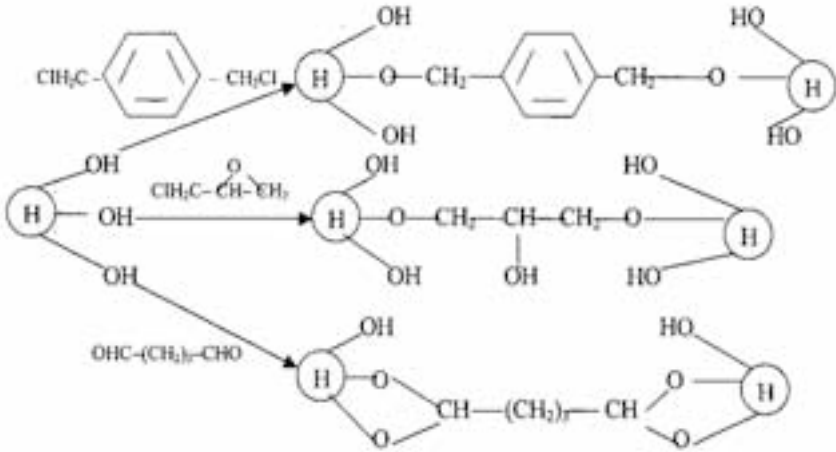
Для використання як носіїв поліаміди активують, частково гідролізуючи їх, з подальшою обробкою, наприклад, глутаровим альдегідом.

Головною перевагою носіїв цього типу є те, що вони можуть бути створені в різній фізичній формі: у вигляді гранул, порошків, волокон, мембран, трубок тощо.

До групи поліамідних носіїв належать також полімери на основі **N-вінілпіролідону**.

Широке використання цих носіїв, перш за все для медичних потреб, обумовлено їх біологічною інертністю і стійкістю до впливу середовища. При використанні полівінілпіролідону і сополімерів на його основі одержані препарати іммобілізованих ферментів, які здатні повільно деградувати в організмі, причому швидкість розпаду залежить від природи другого мономера і концентрації зшиваючого агента у суміші.

Носії на основі полівінілового спирту. Ці носії, запропоновані Г. Манеке і Г. Фогтом (1980), мають високу реакційну здатність. Відповідна обробка дозволяє вводити в них різні функціональні групи: дісульфідні, альдегідні та ін. Для одержання гідрофільних гелів носії можуть бути зшиті глутаровим альдегідом у кислому середовищі, а в лужному — епіхлоргідрином або п-ксилилендіхлоридом:



До переваг носіїв на основі полівінілового спирту слід віднести, окрім високого вмісту реакційноздатних груп, велику місткість.

Поліуретани. Гідрофільні поліуретанові полімери містять угруповання —NH—C(=O)—O— . Вони є зручними матеріалами для включення ферментів у гелі.

Процес іммобілізації у даному випадку полягає у простому змішуванні компонентів. Поліуретани мають більшу стійкість стосовно води, ніж поліаміди.

Органічні низькомолекулярні носії. Природні носії — ліпіди. Використання природних ліпідів як носіїв для іммобілізації вимагає спеціальної техніки і дуже трудомістке. Ця іммобілізація наближена до умов функціонування ферментативних систем у живій клітині, тому що використовуються, як правило, ліпіди — компоненти біомембран: гліцероліпіди, сфінголіпіди, холестерин, кардіоліпін.

У зв'язку з тим, що ці носії дорого коштують, а для проведення іммобілізації необхідне дороге і складне обладнання, вони використовуються переважно для одержання лікарських препаратів.

Як правило, ліпідні носії використовуються у вигляді моношарів на різних поверхнях або біошарів сферичної форми — ліпосом.

Моношари ліпідів на поверхні води. Ліпіди здатні утворювати мономолекулярні плівки на межі розділення фаз (вода : повітря або вода : неполярний розчинник). Ліпідні молекули в моношарі розміщені таким чином, що їх полярні головні групи занурені у водну фазу, а вуглеводневі частини направлені у повітря або занурені в органічний розчинник. Така плівка здатна сорбувати білкові молекули.

Одержання моношарів на поверхні води вимагає спеціальної техніки і є досить трудомісткою процедурою, що обмежує їх використання.

Моношари ліпиду на твердій поверхні. Ці системи як носії були запропоновані О.М. Полтораком і Є.С. Чухрай (1966). Суть методу полягає у нанесенні ліпідного моношару на тверду підкладку (силікагель, сажа, аеросил) з подальшою адсорбцією білка із водного розчину. Як ліпідну матрицю використовують зазвичай лецитин, фосфатидилетаноламін і холестерин. Розроблений також метод одержання штучних змішаних лецитин-холестеринових шарів.

Можливість змінювати структуру і орієнтацію молекул у ліпідних шарах досягається підбором полярності носія і природи розчинника ліпиду, який використовується.

Ліпосоми. Вперше ліпосоми були описані А. Бенгемом в 1964 р. Для їх виготовлення часто використовуються фосфатидилхоліни (лецитіни), фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, кардіоліпін, сфінгомієлін, причому вони утворюються як із чистих ліпідів, так і сумішей.

Існує три різних види ліпосом: мультиламелярні, моноламелярні і макровезикулярні. **Мультиламелярні** ліпосоми — це замкнуті структури, які складаються із декількох концентричних ліпідних біслоїв, відокремлених один від одного водним середовищем. Сумарний діаметр мультиламелярних ліпосом коливається від 1–2 до 50 мкм.

Ультразвукова обробка мультиламелярних ліпосом приводить до трансформації їх у прості або **моноламелярні** з меншими розмірами частинок. Діаметр моноламелярних ліпосом становить від 20,0 до 50 нм.

Третій тип ліпосом — **макровезикулярні**, які утворюються, наприклад, шляхом злиття малих ліпосом, що індукуються

іонами Ca^{2+} , а також присутністю фосфоліпідів з негативно зарядженими головними групами. Такі ліпосоми складаються з одного бішару і можуть мати діаметр від 60,0 нм до 100 мкм.

Розмір і форма ліпосом залежить від способу їх виготовлення, а також від таких факторів, як кислотність середовища, присутність неорганічних солей і природи ліпиду, який використовується.

Широке використання ліпосом як носіїв для іммобілізації ферментів і лікарських препаратів обумовлено простотою одержання і легкістю регенерації іммобілізованого препарату, а також можливістю застосування *in vivo*.

Синтетичні аналоги ліпідів (поверхнево-активні речовини). Поверхнево-активні речовини (ПАР) складаються з молекул дифільної природи, які містять у своєму складі як полярну головну групу, так і неполярну вуглеводневу частину. Природні ліпіди, в принципі, теж відносяться до ПАР. Синтетичні ПАР — це сполуки, чимало з яких є продуктами крупнотоннажного виробництва.

Залежно від того, які групи присутні у головній частині молекули, усі ПАР можна розділити на чотири основних типу: аніонні, катіонні, неіонні і цвітеріонні. Наприклад, біо-2-етилгексилловий ефір натрієвої солі сульфоянтарної кислоти — аніонна ПАР; цетилтриметиламонійбромід — катіонна ПАР; полі (9–10) оксиетилена октилфеніловий ефір (трітон X–100) — неіонна ПАР; алкілдіметилкарбоксібетаїн — цвітеріонна ПАР. Фірмою Servera випускається понад 30 найменувань тільки неіонних ПАР різної будови.

Як носії для іммобілізації ферментів використовуються такі форми ПАР: обернені (спрямовані) міцели ПАР в органічних розчинниках; синтетичні миючі засоби (СМЗ) з біодобавками — ферментами; носії з полімеризованих ПАР.

7.4.2. Носії неорганічної природи

Для іммобілізації ферментів використовуються різні неорганічні носії: макропористі кремнеземи — силікагель, силохром, макропористе скло; метали і їх оксиди: титан, залізо, алюміній; природні алюмосилікати — різні глини, цеоліти; пориста кераміка, активоване вугілля, сажа.

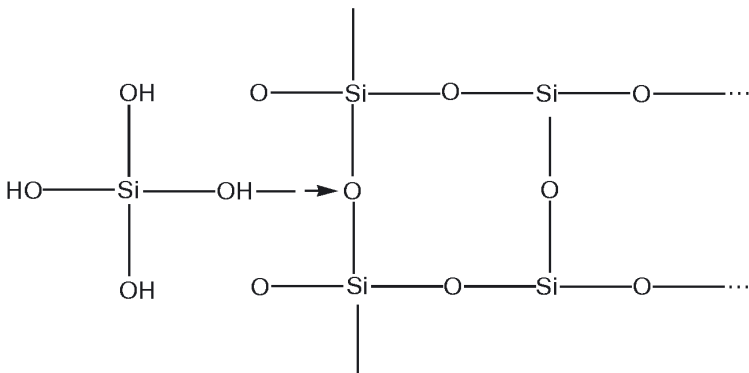
Асортимент мінеральних носіїв, які випускаються у різних країнах, постійно збільшується, а стандартизація структурних характеристик носіїв, які виробляються (питома поверхня, розміри і об'єм пор, розміри зерен), роблять їх особливо зручними для використання.

Основними якостями, які обумовлюють широке застосування неорганічних матеріалів як носіїв, є їх здатність до швидкої регенерації і можливість надання їм будь-якої конфігурації. Це перевага мінеральних носіїв. Носії використовуються як у вигляді порошків, гранул, мембран, трубок, кульок, так і моноліту. Вони можуть бути як пористими, так і непористими.

Неорганічні носії можуть використовуватись як для адсорбційної, так і ковалентної іммобілізації після хімічної модифікації поверхні носія шляхом введення реакційноздатних груп, які можуть вступати у взаємодію з функціональними групами ферменту. Найчастіше як модифікуючі агенти використовуються кремнієорганічні речовини, зокрема γ -амінопропілтриетоксисилан, галогенсилани, складні ефіри сілкарбонових кислот.

Макропористі кремнезemi. До носіїв цього типу належать силікагелі, силохромі і макропористе скло. До позитивних якостей кремнеземних носіїв слід віднести механічну міцність, хімічну інертність до багатьох розчинників, наявність жорсткого каркасу із заданими розмірами пор, стійкість до дії мікроорганізмів.

Силікагель — аморфна речовина із загальною хімічною формулою $x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. Одержують його в процесі «старіння» (поліконденсації) ортокремнієвої кислоти ($\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):



Поверхня частинок силікагелю й інших кремнеземів покрита гідрофільними гідроксильними групами, які мають слабо-виражені кислотні властивості.

Недоліком кремнеземних носіїв є їх використання в обмеженому діапазоні рН, підвищена розчинність і деяка неспецифічна сорбція на їх поверхні. Подолати ці недоліки, окрім першого, можна шляхом модифікації поверхні кремнеземів.

Модифікація проводиться одним із двох методів. Для зниження розчинності і підвищення стабільності носіїв їх покривають різними матеріалами, наприклад, плівкою оксиду металу (алюмінію, цирконію, титану), полімерів (поліетиленаміну), або обробляють солями перехідних металів.

Можна проводити хімічну модифікацію кремнеземів шляхом введення різних реакційноздатних груп ($-\text{CN}$; $-\text{NO}_2$; $-\text{NH}_2$ та ін.) або гідрофобізувати поверхню, наприклад хлорангідридами заміщених бензойних кислот або стеароїлхлоридом.

Серед методів хімічної модифікації кремнеземів найбільш розповсюдженими є обробка носія кремнієорганічними речовинами, галогеналкілсиланами, складними ефірами силілкарбонічних кислот.

Таким чином, використання різних модифікуючих агентів дає можливість змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв. Однак вартість цих носіїв надто висока, а модифікація ще більше підвищує їх вартість, що є суттєвим обмеженням для впровадження кремнеземів у промисловість.

Окрім крупнодисперсних кремнеземів, як носії використовуються і **пірогенні кремнеземи**. Вони повністю нерозчинні, мають високу хімічну, біологічну і термічну стійкість, жорсткість каркасу при різних значеннях рН розчину. Їх поверхня покрита гідроксильними групами, завдяки яким відбувається адсорбція з утворенням водневих зв'язків.

На відміну від крупнодисперсних кремнеземів (силікагелів, силохромів, макропористого скла), які використовуються для іммобілізації біологічно активних речовин з великою молекулярною масою (наприклад, ферментів), пірогенні кремнеземи застосовуються як носії переважно для іммобілізації низькомолекулярних сполук — ліків, гербіцидів.

Аеросил — це тарова марка пірогенного кремнезему, основною речовиною якого є SiO_2 . Це продукт високотемпературного парафазного гідролізу SiCl_4 у струмі кисню з подальшою конденсацією у парах води (І.В. Жарникова, 2004). За фізичними властивостями сорбент є непористим кремнеземом, який має форму частинок, близьких до сферичних. Поверхня аеросилу покрита гідроксильними групами, завдяки яким відбувається адсорбція з утворенням водневих зв'язків. Завдяки своїм фізико-хімічним властивостям (висока чистота, велика питома поверхня, малі розміри частинок), а також у зв'язку з екологічною і фізіологічною нешкідливістю та сумісністю зі шкірою він широко застосовується у фармакології і косметології. Входить до складу наповнювачів пестицидів і добрив, для одержання таблетованих форм лікарських препаратів.

Більш придатними для промислового використання можуть бути **природні алюмосилікати** — **глини, цеоліти**, а також **пориста** кераміка, до складу якої, окрім алюмосилікатів, входять оксиди титану, цирконію або інші домішки. Поверхня цих носіїв аналогічно кремнеземним може бути модифікована різними органічними речовинами, наприклад силанами (γ -амінопропілтриетоксисиланом).

Важливою характеристикою силікатних і алюмосилікатних носіїв є висока щільність поверхневих груп, на яких зв'язування білкових молекул ферменту може здійснюватись як за рахунок електростатичних взаємодій, так і водневих зв'язків. Це дуже суттєво для ефективної іммобілізації ферментів.

Широкого розповсюдження як носії набули також **активоване вугілля** і **графітована сажка**. Активоване вугілля може бути використане як носій для адсорбційної і ковалентної іммобілізації (після попередньої активації оксидних груп).

До переваг сажі можна віднести високу однорідність і електричну провідність її поверхні. Остання властивість важлива при створенні біоелектрокаталітичних систем на основі іммобілізованих ферментів. Суттєвим недоліком цього носія є низька механічна міцність, що обмежує його використання. Відкладанням вуглецю на гранульованій сажі був створений новий носій — **карбохром**, у якого висока механічна міцність поєднується з перевагами графітованої сажі.

Перспективними є носії на основі **металів і їх оксидів**. Ці носії мають високу механічну міцність, відносно дешеві, стабільні, мають хороші гідродинамічні властивості. На практиці частіше використовуються носії на основі **оксиду алюмінію і титану**. У промисловому масштабі їх одержують зазвичай у вигляді макропористих порошоків, однорідних за формою і розміром. Використання матриць цього типу дозволяє проводити іммобілізацію як адсорбційну, так і ковалентну після попередньої модифікації γ -амінопропілтриетоксисиланом.

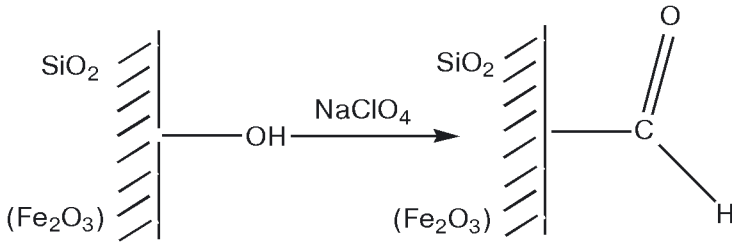
Металеві поверхні, які використовуються як носії (**Al, Ni, Ti**), зазвичай модифікують шляхом створення оксидної плівки на поверхні матриці, або покривають їх шаром полімеру (похідні полістиролу, целюлози та ін.). Це дозволяє значно підвищити місткість носія.

В останні роки розвиваються методи іммобілізації, які ґрунтуються на використанні носіїв на основі **ферромагнітних матеріалів**. Одержані біокатализатори й іммобілізовані біологічно активні речовини мають магнітні властивості, що дає змогу маніпулювати ними за допомогою магнітного поля. Іммобілізовані на магнітних носіях лікарські речовини використовуються у системах «направленого транспорту» ліків у органі-мішені, тобто хворі органи. Магнітні носії, з'єднані з біореагентами, є новими засобами виділення і очищення білків і клітин.

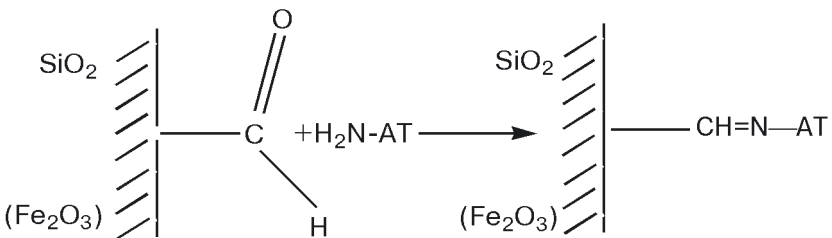
За своєю природою магнітні носії можуть складатись із ферромагнітного матеріалу або ж бути гелевою субстанцією з включеними в пори частинками магнетика.

Технологія одержання іммобілізованих біологічно активних речовин з магнітними властивостями розвинена у багатьох країнах світу. Препарати біологічно активних речовин з магнітними властивостями, на думку багатьох дослідників, з часом витіснять іммобілізовані біокатализатори і лікарські засоби.

На основі високодисперсного кремнезему (аеросилу) шляхом додавання до нього магнітного порошку (Fe_2O_3) одержали біокатализатор, який в подальшому модифікували декстраном (поліглюкіном) і активували внесенням на поверхню активних груп, що використовуються для ковалентної іммобілізації за схемою (І.В. Жарникова, 2004):



Далі на біокатализаторі проводили іммобілізацію антитіл з утворенням імуномагносорбента (МІС) з подальшим використанням цього комплексу в імуноферментному аналізі:



Іммобілізовані антитіла зберігають свою стабільну активність і через 9 років зберігання при температурі $4\text{--}5\text{ }^\circ\text{C}$, тоді коли зазвичай — тільки 2–3 тижні.

Використання магнітного компонента у складі сорбенту, який використовується як носій у твердофазовому імуноаналізі мікроорганізмів, значно спрощує маніпуляції з дрібнодисперсним матеріалом та підвищує швидкість методу діагностики.

7.4.3. Місткість носія

Місткість носія — це кількість ферменту, яка за допомогою фізичних чи хімічних методів іммобілізації може зв'язуватись з одиницею маси носія за контрольованих умов процесу іммобілізації (температура, рН, іонна сила розчину тощо).

Вона залежить від властивостей носія (питомої поверхні, пористості) і від того, з якими функціональними групами носія реагує фермент під час його іммобілізації. Так, при взаємодії

білка-ферменту з найлоновим носієм через аміногрупи місткість носія досягає 150 мг білка-ферменту на 1 г носія, а при зв'язуванні через СООН-групи — тільки 44-78 мг.

7.4.4 Модифікація носія (лат. modificatio — зміна).

Для подолання деяких негативних властивостей або надання їм нових властивостей носії модифікують, тобто направлено змінюють їх властивості. Модифікація носіїв передбачає обробку їх речовинами, які посилюють здатність зв'язувати фермент.

Відомо багато способів модифікації матриць і активування їх функціональних груп. Наприклад, такий недолік кремнеземних носіїв як висока розчинність вдається усунути шляхом модифікування властивостей їх поверхні — покриття плівкою алюмінію, гафнію, титану тощо. При цьому в десятки разів зменшується їх розчинність, а також усувається неспецифічна сорбція. Одним з істотних недоліків губчастого крохмалю є недостатня стійкість його проти дії гідролаз. Оброблена формальдегідом або глутаровим альдегідом молекула крохмалю модифікується за рахунок зшивок і стає стійкою проти гідролаз.

Модифікування поверхні носіїв дає змогу регулювати процес зв'язування їх із функціональними групами ферменту, а одержані іммобілізовані препарати характеризуються більшою стабільністю.

Найрозповсюдженішим модифікатором є глутаровий альдегід, який утворює амідний зв'язок між аміногрупою носія і карбоксильною групою ферменту. Він ще називається поперечно-зшиваючий агент (реагент).

Для одержання іммобілізованих ферментів із заздалегідь відомими властивостями найчастіше здійснюють активування поверхні модифікованого носія.

Активізація носія — це обробка його поверхні фізичними або хімічними методами і речовинами з метою підвищення його місткості. При цьому на поверхні носія утворюються електрофільні групи (мінус-групи, наприклад, COO^-), які мають високу реакційну здатність до нуклеофільних груп білка (наприклад, аміно- і сульфогідрильних груп — NH_3^+ і SH^+).

7.4.5. Вимоги до носіїв

Виходячи з того, що властивості одержаних іммобілізованих ферментів залежать від властивостей носіїв, до них висуваються особливі вимоги (Дж. Порат, 1974):

- 1) висока хімічна і біологічна стійкість;
- 2) висока механічна міцність;
- 3) достатня проникність, велика питома поверхня, висока місткість, пористість;
- 4) можливість одержання у вигляді зручних у технологічному сенсі форм (гранул, мембран, трубок, листків тощо);
- 5) легке переведення у реакційноздатну форму (активація);
- 6) висока гідрофільність, яка забезпечує можливість проведення реакції зв'язування ферменту з носієм у водному середовищі;
- 7) невисока вартість.

До полімерних носіїв висувається низка додаткових вимог, обумовлених методом іммобілізації, властивостями ферменту, що іммобілізується, і способом подальшого використання препарату:

- 1) при ковалентній іммобілізації носій повинен зв'язуватись тільки з тими функціональними групами на білку, що не відповідають за каталіз, тобто розміщені на поверхні і не входять до активного центру;

- 2) вони не повинні впливати як інгібітори на фермент.

7.5. МЕТОДИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ

Існуючі способи іммобілізації ферментів діляться на 2 групи: фізичні і хімічні методи.

7.5.1. Фізичні методи іммобілізації.

Іммобілізація досягається без утворення ковалентного зв'язку між ферментом і матрицею. З них, у свою чергу, можна виділити 2 підгрупи методів: 1) адсорбція на нерозчинних носіях; 2) методи включення у структуру носія — включення у гель; мікрокапсулювання (використання напівпроникних мембран); включення в порожнисті нитки; в ліпосоми; включення у

двохфазове середовище, де фермент розчинний і може знаходитись тільки в одній із фаз (рис. 7.2).

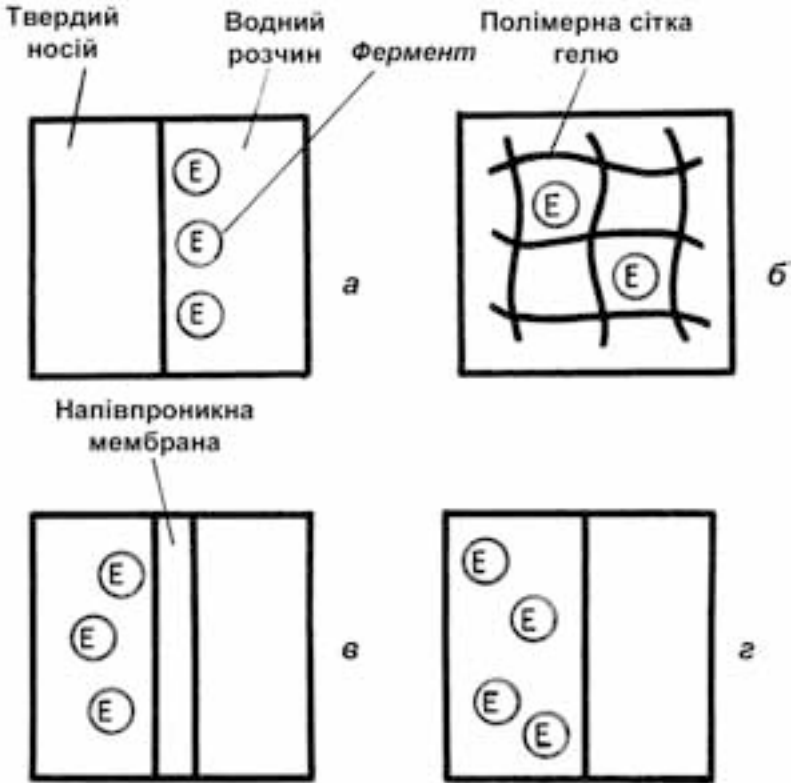


Рис. 7.2. Способи фізичної іммобілізації ферментів

(за Березінім І.В. та ін., 1987):

- а — адсорбція на нерозчинних носіях; б — включення в пори гелю;
- в — відділення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани;
- г — використання двухфазного реакційного середовища

7.5.1.1. Імобілізація ферментів шляхом адсорбції на нерозчинних носіях

Адсорбційна імобілізація є найдавнішим з усіх існуючих методів. Так, ще в 1916 р. Дж. Нельсон і Е. Гріффін провели успішну імобілізацію інвертази шляхом адсорбції на активованому вугіллі і гелі гідроксиду алюмінію.

Імобілізація ферментів адсорбцією на нерозчинних носіях передбачає контакт водного розчину ферменту з носіями органічної і неорганічної природи. Утримання адсорбованої молекули ферменту на поверхні носія забезпечується за рахунок неспецифічних ван-дер-ваальсових взаємодій, електростатичних взаємодій, водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій між носієм і поверхневими групами білка-ферменту. Тип зв'язку залежить від природи носія і функціональних груп на поверхні молекули ферменту.

Методика адсорбційної імобілізації. На практиці для одержання імобілізованих адсорбцією ферментів використовуються такі методичні підходи.

Статичний метод (рис. 7.3, а) найбільш простий і полягає в тому, що носій додають у водний розчин ферменту і одержану суміш залишають на певний час без перемішування. Імобілізація досягається за рахунок довільної дифузії ферменту до поверхні носія з подальшою адсорбцією. Недоліком методу є те, що для одержання препарату з високим вмістом адсорбованого ферменту потрібен тривалий час.

Спосіб з перемішуванням, або динамічний метод. При ньому носій суспендується в розчині ферменту і одержана суміш безперервно перемішується за допомогою магнітного чи механічного змішувача, або на лабораторній гойдалці (рис. 7.3, б). Цей спосіб більш ефективний за попередній.

Відокремлення імобілізованого ферменту проводиться шляхом фільтрування або центрифугування. Після відмивання неадсорбованого ферменту препарат готовий до використання.

Метод електроосадження. У цьому випадку в розчин ферменту занурюють два електроди з нанесеним на поверхню одного з них шару носія. При вмиканні електричного струму молекули ферменту завдяки наявним на їх поверхні зарядже-

ним групам починають переміщуватися в розчині й осаджують-ся на поверхні носія (рис. 7.3, в).

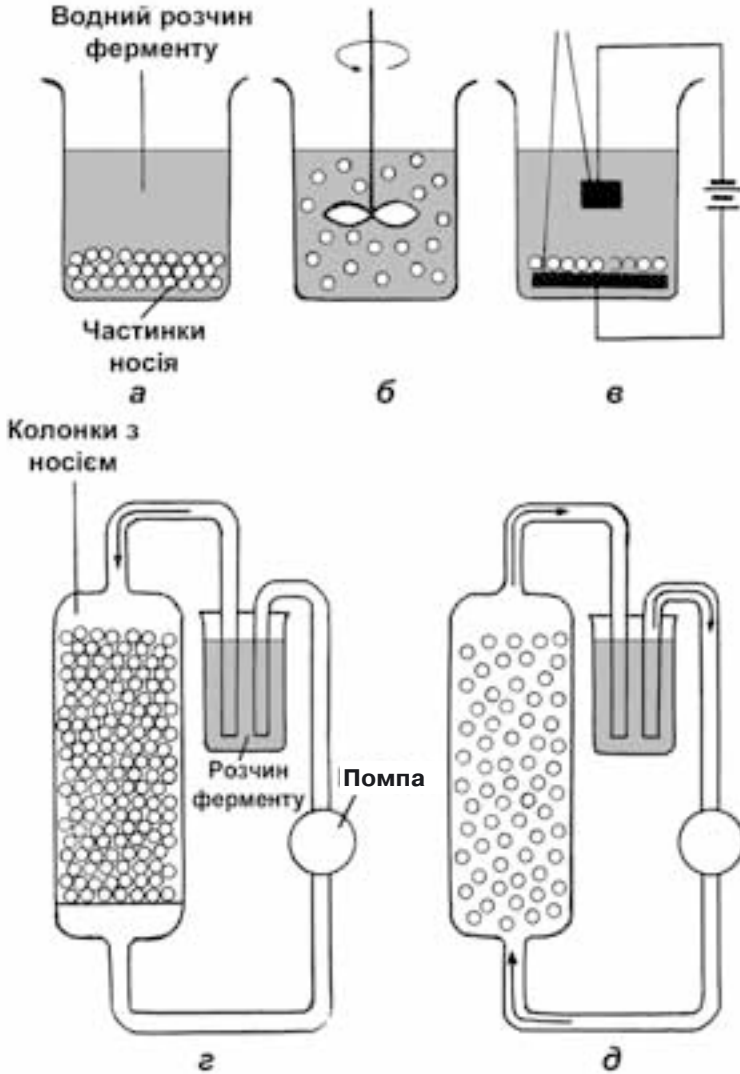


Рис. 7.3. Способи адсорбційної іммобілізації ферментів (за Березіним І.В. та ін., 1987)

Метод нанесення в колонці. Найбільш зручний для технологічного використання іммобілізованого ферменту. Через колонку, заповнену носієм, за допомогою помпи прокачують розчин ферменту, причому швидкість потоку має бути такою, щоб частинки були у завислому стані, утворюючи «кип'ячий шар». Промивку теж проводять у колонці (рис. 7.3, г, д).

Процес адсорбції і міцність зв'язування ферменту з носієм значною мірою залежить від умов проведення іммобілізації. Основними факторами, які впливають на адсорбцію ферменту, є питома поверхня і пористість носія, значення рН та іонної сили розчину ферменту, його концентрація і температура проведення процесу адсорбції.

Питома поверхня і пористість носія. Сорбційна ємність носія пропорційна його питомій поверхні у випадку, коли носій непористий або коли діаметр пор буде приблизно удвічі більший за розмір молекули білка. Коли ж пори будуть малими, то не зможуть вмістити молекулу ферменту і сорбційна ємність носія буде незначною. При цьому вважається, що молекулярні розміри субстрату набагато менші, ніж ферменту, і молекула субстрату здатна проникнути у пору, де знаходиться сорбований фермент. У разі, коли субстратом є речовина з дуже великою молекулярною масою, вибір діаметра пор носія уже диктується розмірами молекули субстрату. До того ж, високомолекулярний субстрат сам може слугувати носієм для іммобілізації ферменту. Наприклад, для адсорбційної іммобілізації ферментів целюлазного комплексу з успіхом був використаний як носій його субстрат — целюлоза.

Значення рН. Реакція середовища дуже впливає на ефективність сорбції ферменту на поверхні носія, особливо якщо сорбція відбувається головним чином за рахунок електростатичних взаємодій. Це пов'язано з тим, що при зміні рН змінюється стан іонізації іоногенних груп носія і білка, які відповідальні за адсорбцію. При використанні носіїв, які не є іонообмінниками, максимальна адсорбція досягається в ізоелектричній точці білка.

Іонна сила. Значення цієї величини впливає на міцність зв'язування ферменту з носієм. При високій концентрації солей присутні в розчині іони витісняють з поверхні носія зв'язані за

рахунок електростатичних взаємодій молекули білка-ферменту. Тобто підвищення іонної сили розчину, як правило, викликає десорбцію ферменту.

Концентрація ферменту. При збільшенні концентрації ферменту в розчині кількість сорбованого на носії ферменту збільшується і відповідно зростає питома каталітична активність іммобілізованого препарату. Але ця закономірність існує до певної межі. При подальшому підвищенні концентрації ферменту не збільшується сорбція ферменту на носії, тобто відбувається «насичення» носія.

Температура. Підвищення температури по-різному впливає на процес адсорбції. З одного боку, сильне нагрівання призводить до денатурації білка і втрати каталітичної активності. З іншого — зростання температури зазвичай забезпечує прискорення процесу. Отже, є оптимальна температура для проведення адсорбційної іммобілізації, величини якої залежать від природи ферменту і носія.

Таким чином, ефективність адсорбційної іммобілізації ферментів визначається тонким балансом цілої низки факторів. Порушення цього балансу внаслідок змін будь-якого із зовнішніх факторів може призвести до різкого ослаблення взаємодії ферменту з носієм і, як наслідок, до його десорбції.

Ефективність сорбції може бути підвищена використанням попередньо модифікованих носіїв і ферментів.

Іммобілізація на попередньо модифікованих носіях. Попередня модифікація носія у багатьох випадках дозволяє суттєво підвищити міцність зв'язування ферменту на матриці.

Модифікуючими агентами для носіїв виступають гідрофобні речовини, розчини іонів металокомплексотворювачів, а також речовини з великою кількістю груп, здатних до електростатичної взаємодії з білковою глобулою.

1. Обробка носіїв **іонами металів (Ti, Sn, Zn, V, Fe)** підвищує міцність зв'язування ферменту з носієм за рахунок утворення комплексу білка з іонами металів. Іон металу відіграє роль містка, який з'єднує молекулу ферменту з носієм (рис. 7.4, а). Цей метод ефективний при іммобілізації різних ферментів на таких носіях, як, наприклад, целюлоза, найлон, скло, фільтрувальний папір тощо.

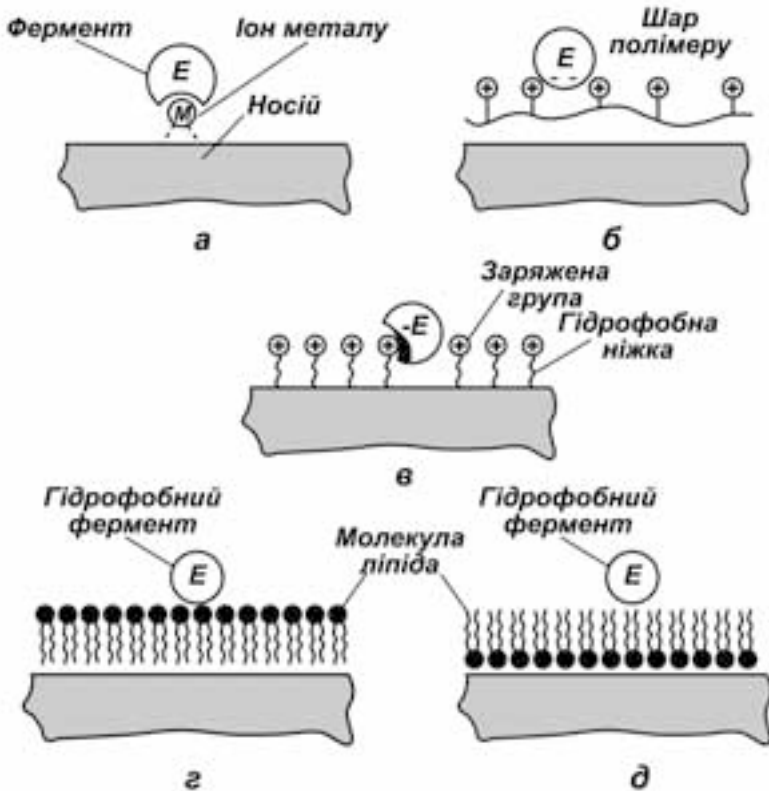


Рис. 7.4. Адсорбційна іммобілізація ферментів на попередньо модифікованих носіях
(за Березіним І.В. та ін., 1987)

2. Модифікація **гідрофобними сполуками** теж сприяє підвищенню ефективності сорбції, що забезпечується гідрофобними взаємодіями між модифікатором і неполярними ділянками на поверхні білкової глобули (рис. 7.4, в). Із носіїв найчастіше використовуються різні агарози, які ковалентно модифіковані гідрофобними групами (алкільними, фенільними та ін.); поліцукристі носії, модифіковані таніном та інші. На кінці такої гідрофобної «ніжки» може бути присутня й заряджена група, завдяки чому забезпечується взаємодія з ферментом одночасно за рахунок електростатичних і гідрофобних сил.

3. Обробка носія речовинами, молекули яких **містять велику кількість функціональних груп**, здатних взаємодіяти з групами на поверхні білкової глобули за рахунок електростатичних сил і водневих зв'язків (рис. 7.4, б). Наприклад, полімеризація на поверхні носія силохрому акрілової кислоти, вінілацетата та ін. з подальшою хімічною модифікацією полімера приводить до утворення носія з високою поверхневою концентрацією функціональних груп (гідроксильних, аміноалкільних, аміноарильних і гідразидних), здатних до електростатичної взаємодії з білковою глобулою.

Як модифікатор часто використовується також альбумін, який наноситься на носій шляхом адсорбції, а потім піддається денатурації нагріванням. Шар денатурованого альбуміну утворює на поверхні носія «м'яку» підкладку з великою кількістю функціональних груп, які здатні міцно зв'язувати молекули ферменту, водночас забезпечуючи для них сприятливе мікрооточення. В результаті у багатьох випадках при обробці альбуміном вдається досягти підвищення ефективності сорбції і покращення каталітичних характеристик іммобілізованого ферменту.

Модифікація носія, окрім підвищення ефективності сорбції, часто забезпечує також покращення каталітичних властивостей іммобілізованого ферменту за рахунок створення для його молекул сприятливого мікрооточення. Крім того, інколи без попередньої модифікації носія взагалі не вдається зберегти каталітичну активність ферменту при адсорбційній іммобілізації. Наприклад, якщо фермент з низькою стабільністю у кислому середовищі рН, то при його адсорбції на силікагелі може відбутися втрата каталітичної активності через те, що поверхня цього носія має кислий характер (рН ~ 4). Для уникнення інактивації ферменту необхідно носій витримати деякий час у буферному розчині зі значенням рН, яке відповідало б оптимальному рН для ферменту.

Аналогічна проблема часто виникає при адсорбційній іммобілізації ферментів, яким для нормального функціонування необхідна наявність в активному центрі іона металу.

При іммобілізації металозалежних ферментів може відбутись вихід іона металу з активного центру ферменту і його

зв'язування на поверхні носія, що супроводжується частковою або повною втратою його каталітичної активності. Це небажане явище можна усунути шляхом обробки носія розчином, який містить іони відповідного металу, а отже, насичити центри сорбції іонів металів на носії.

Модифікація ферментів аналогічно передбачає введення іоногенних груп (полікислоти, карбоксиметилцелюлоза, залишки янтарної кислоти та ін.) або обробку гідрофобними речовинами. У деяких випадках для підвищення зв'язку адсорбованого ферменту з носієм та запобігання його змивання з носія (десорбції) використовується обробка його біфункціональним зшиваючим реагентом. У цьому випадку поверхня носія виявляється покритою плівкою зі зшитих між собою молекул ферменту. Як зшиваючий агент найчастіше використовується глутаровий альдегід.

Переваги і недоліки методу. Імобілізація ферментів шляхом адсорбції широко розповсюджена. Метод простий, доступний, дешевий, а носії, які використовуються для проведення адсорбції, порівняно недорогі. Імобілізовані шляхом адсорбції ферменти в більшості випадків мають високу каталітичну активність і переваги в технологічному плані.

Одним із суттєвих недоліків методу є десорбція ферменту, тобто сповзання його з носія, що призводить до втрати дорогого біокаталізатора та забруднення кінцевого продукту, який одержують. Частіше це трапляється в момент додавання субстрату до іммобілізованого ферменту. До інших недоліків можна віднести низький вихід зв'язаного ферменту з розрахунку на одиницю маси носія, а також часткову або повну його інактивацію.

Крім того, недоліком адсорбційного методу іммобілізації є неможливість дати загальні рекомендації, які дозволили б заздалегідь зробити правильний вибір носія і оптимальних умов проведення процесу іммобілізації конкретного ферменту. Це завдання доводиться щоразу вирішувати заново, використовуючи метод проб і помилок.

7.5.1.2. Методи механічного включення молекул ферменту в структуру носія

Іммобілізація ферментів шляхом включення в гелі. Суть цього методу іммобілізації полягає в тому, що фермент включається у тривимірну сітку із тісно переплєтених полімерних ланцюгів, які утворюють гель (рис. 7.2, б). Утримання молекул ферменту відбувається за рахунок того, що середня відстань між сусідніми ланцюгами в гелі менша за молекули включеного ферменту, тому він не може полишити полімерну матрицю і вийти в розчин. Певну роль в утриманні ферменту в сітці гелю відіграють іонні і водневі зв'язки, які виникають між ферментом і носієм. Простір між полімерними ланцюгами в гелі заповнений водою, на частку якої зазвичай припадає значна частина загального об'єму гелю.

Гелі можуть бути як органічної, так і неорганічної природи. Неорганічні — це силікагель, гель фосфату кальцію. З органічних використовуються гелі природних поліцукрів (крохмалю, агар-агару, агарози карагінана тощо), природних білків — колагену, а також синтетичних полімерів.

Ефективність включення ферменту в гелі досягається при оптимальному поєднанні розмірів пор гелю і молекули ферменту та оптимізації мікрооточення ферменту.

Для підвищення механічної міцності носіїв і більш міцного утримування включеного в них ферменту використовується обробка матриць біфункціональними зшиваючими реагентами, які здатні взаємодіяти з функціональними групами ферменту.

Перевагою методу є його простота, можливість одержання іммобілізованих препаратів у будь-якій формі (сферичні частинки, плівки та ін.), універсальність, тобто можливість використання для іммобілізації будь-яких біологічно активних речовин, поліферментних систем і навіть клітин. Одержані препарати стабільні, оскільки захищені гелем від несприятливих зовнішніх впливів, у тому числі і від бактеріального забруднення, оскільки крупні бактеріальні клітини не можуть проникнути у дрібнопористу матрицю.

Недоліком одержаних таким методом препаратів є певні дифузні труднощі при взаємодії ферменту з субстратом. А коли

субстратом є високомолекулярна сполука, то цей спосіб іммобілізації взагалі не може бути використаний.

Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок (мембран). Загальний принцип, який лежить в основі цього способу, полягає в тому, що водний розчин ферменту відділяється від водного розчину субстрату напівпроникною мембраною, яка є непроникною для ферменту й інших високомолекулярних сполук, але дає можливість вільно дифундувати через неї низькомолекулярним речовинам — субстратам і продуктам реакції (рис. 7.5). Фермент бере участь у каталітичній реакції, перебуваючи у нативному стані в розчині і, утримуючись мембраною, легко може бути відокремлений від продуктів реакції.

Існуючі модифікації цього методу відрізняються лише способами одержання напівпроникної мембрани: методи міжфазової поліконденсації, міжфазової коацервації і метод подвійної емульгації.

Мікрокапсулювання. Цей спосіб іммобілізації ферментів розроблений Т. Чангом (1964). Суть його полягає в тому, що водний розчин ферменту включають всередину мікрокапсул — замкнених сферичних пухирців з тонкою полімерною стінкою — мембраною (рис. 7.5, а). Залежно від способу одержання розміри мікрокапсул складають десятки або сотні мікрометрів, а товщина мембрани — соті-десяті долі мікрометра при діаметрі пор близько декількох нанометрів.

Метод мікрокапсулювання особливо зручний для іммобілізації поліферментних систем і може бути придатним для іммобілізації інших БАР, клітинних органел та інших субодиниць клітини, гомогенатів тканин тощо.

Включення ферменту у волокна. Це аналогічний мікрокапсулюванню метод, який відрізняється від мікрокапсулювання головним чином формою одержаних препаратів. У першому випадку утворюються сферичні мікрокапсули, а в другому — нитки.

Основа методу полягає у розчиненні волокнуутворюючого полімеру (похідні целюлози, полівінілхлорид, полі-L-метилглутамат) в органічному розчиннику, емульгації одержаного розчину з розчином або суспензією ферменту і протисненні емульсії через фільтри в рідину, яка викликає коагуляцію (наприклад, толуол).

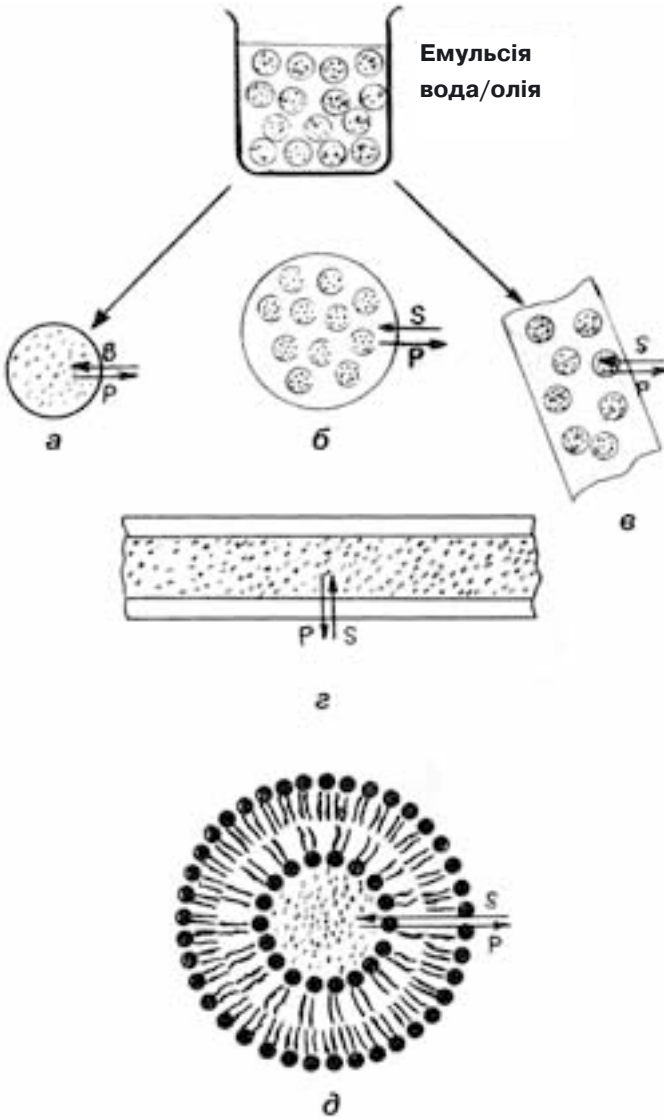


Рис. 7.5. Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок (мембран)
(за Березіним І.В. та ін., 1987):

а — мікрокапсулювання; б, в — включення у волокна; г — включення у порожнисті нитки з напівпроникними стінками; д — включення в ліпосоми; крапками позначені молекули ферменту; символами S і P субстрат та продукт ферментативної реакції відповідно

Одержані волокна — це пористі полімерні гелі, які містять гомогенну дисперсію невеликих крапель водного розчину ферменту розміром близько 1 мкм (рис. 7.5, в). Змінюючи умови процесу коагуляції, можна змінювати розмір пор у волокнах та кількість включеного ферменту. Однак не всі ферменти можуть бути інкапсульовані у волокнах. Перешкодою є жорсткі умови обробки (контакт з органічними розчинниками).

Для іммобілізації можуть використовуватись і одержані промисловістю готові полімерні порожнисті волокна, які застосовуються для очищення білків методом діалізу (рис. 7.5, г). Їх виготовляють з природних і синтетичних полімерів (целюлоза, полівінілхлорид, поліакриламід).

Для проведення ферментативної реакції волокна, заповнені розчином ферменту, занурюють у розчин субстрату, який дифундує через мембрану всередину волокна.

Недоліком методу є можливість використання тільки низькомолекулярних субстратів. Волокна, як і мікрокапсули, придатні для іммобілізації поліферментних систем, клітин, клітинних фрагментів.

Перевагою методу є його простота. Ферментомісткі волокна мають високу механічну міцність.

Включення ферменту в ліпосоми. Цей метод може використовуватись для іммобілізації практично всіх біологічно активних речовин, а одержані препарати широко застосовуються в медицині, а також для проведення фундаментальних досліджень, оскільки такі системи близькі до природних мембран і їх вивчення може дати цінну інформацію про ферментативні процеси в клітині.

Ліпосоми — це концентричні бішарові замкнуті ліпідні мембрани. Існують декілька способів їх одержання (рис. 7.5, д). У простішому випадку розчин ліпідів (зазвичай лецитину) розчиняють в органічному розчиннику, який упарюють у вакуумі, а на стінках посудини залишається тонка плівка ліпідів. Вона диспергується у водному середовищі, в якому міститься фермент (БАР), з утворенням сферичних капсул — ліпосом. Спосіб інкапсульовання (іммобілізації) ферментів (або інших БАР) в ліпосомах зводиться таким чином до диспергування ліпідної плівки у присутності розчину ферменту.

У другому варіанті методу розчин ліпиду в органічному розчиннику нашаровують на поверхню водного розчину ферменту, після чого органічний розчинник видаляють шляхом випарювання в струмі інертного газу, а ліпідну плівку, що утворилась, диспергують у водному розчині.

Розмір ліпосом залежно від методу їх одержання і фосфоліпідного складу може становить від 250 °А до 1мк і більше. Ліпосоми можуть бути полі- і моноламельярними, тобто складатись з декількох або одного ліпідного шару. Центральне водне ядро поліламельярних ліпосом має діаметр 0,15 мк, а відстань між сусідніми бішарами дорівнює ~ 75 мк.

Спосіб інкапсулювання ферментів (або інших БАР) в ліпосомах зводиться таким чином до диспергування ліпідної плівки у присутності розчину ферменту.

Характер взаємодії включеного білка-ферменту з ліпідними шарами різноманітний. Частина молекул взаємодіє із внутрішніми ліпідними шарами, частково проникаючи в них, а інші молекули ферменту можуть адсорбуватись на зовнішній поверхні ліпосоми.

Відмінність у властивостях структурних частин ліпосом розширюють можливості іммобілізації. Так, речовини, розчинні у воді, можуть включатись у внутрішню фазу ліпосом і/або водний простір між концентричними бішарами, а жиророзчинні можуть включатись у саму мембрану ліпосом. Включення в ліпосоми захищає інкапсульовану речовину від інактивуючого впливу оточуючого середовища.

Сучасні методи одержання ліпосом дають можливість включати в них майже 50 % ферменту, який знаходиться в розчині, причому практично без втрати каталітичної активності.

Іммобілізація ферментів з використанням систем двофазового типу. Відмінною рисою цього способу іммобілізації є те, що обмеження вільного переміщення ферменту в об'ємі системи досягається не за рахунок його взаємодії із жорстким носієм (сорбентом, гелем або мембраною), а внаслідок його здатності розчинятись тільки в одній із фаз двофазової системи, наприклад типу «вода — органічний розчинник, що не змішується з водою» (рис. 7.2, г). В таких системах фермент присутній тільки в одній фазі, а продукт ферментативної реакції зосереджується у

другій. Метод простий, однак використання його обмежується низькою швидкістю процесу, можливістю інактивації ферменту на межі розділення фаз, а також переходом ферменту в протилежну фазу, що призводить до забруднення продукту і втрати дорогого каталізатора. Перевагою систем такого типу є можливість перетворення макромолекулярних субстратів.

Отже, перевагою методів механічного включення є те, що іммобілізована біологічно активна речовина захищена від несприятливих зовнішніх впливів шаром носія, що дає можливість одержати стабільні іммобілізовані препарати.

Недоліком є неспецифічні взаємодії між включеним ферментом і носієм, а також можливі міжмолекулярні взаємодії білків, що спричинює їх автоліз.

7.5.2. Хімічні методи іммобілізації

Хімічні методи іммобілізації ґрунтуються на ковалентному зв'язку молекул ферменту з носієм як органічної, так і мінеральної природи. Основною позитивною якістю препаратів іммобілізованих ферментів, одержаних хімічними методами, є наявність міцних хімічних зв'язків між ферментом і носієм. Це важлива експлуатаційна характеристика іммобілізованого біокаталізатора, оскільки в процесі його використання не «змивається» фермент з носія (десорбція), чим забезпечується чистота продуктів реакції, що надто важливо при одержанні продукції медичного і харчового призначення, а також для забезпечення сталих, відтворюваних результатів у аналітичних системах. Крім того, хімічна іммобілізація ферментів дозволяє суттєво покращити важливі для практики якості — субстратну специфічність, каталітичну активність і стабільність. Саме хімічними методами шляхом багатоточкового ковалентного закріплення білкової структури вдається досягти найбільшої стабілізації ферменту.

7.5.2.1. Основні принципи конструювання препаратів ковалентно іммобілізованих ферментів. При проведенні іммобілізації хімічним методом використовується величезна різноманітність хімічних реакцій, вихідних компонентів та умов перебігу реакцій.

Практично всі функціональні групи білків (α і ϵ -аміногрупи, α , β і γ -карбоксильні групи, сульфогідрильні групи цистеїну, ароматичні кільця тирозину і триптофану, імідазольна група гістидину, гідроксильна група амінокислот) можуть бути використані для зшивання ферменту з носієм. Зокрема, широко використовують реакції, які ведуть до утворення пептидних зв'язків між аміногрупами ферменту і карбоксильними групами носія або, навпаки, між карбоксильними групами каталізатора і аміногрупами носія.

В основі методик, що використовуються для хімічної іммобілізації, лежать реакції утворення:

- а) амідного зв'язку [$-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$];
- б) карбамідних зв'язків (похідних сечовини):
 $-(\text{NH},\text{O})-\text{C}(\text{O},\text{S})-\text{NH}-$;
- в) вторинних амінів [$-\text{NH}-$];
- г) азосполучення (утворення азосполук зі зв'язком
 $-\text{N}=\text{N}-$);
- д) тіолдисульфідного обміну та інші.

Але незалежно від кількості і хімічної природи компонентів, які використовуються в процесі іммобілізації, кількості і труднощів окремих стадій цього процесу, створюється одна із трьох моделей, до складу яких входить не більше трьох елементів: фермент (Φ), носій (H) і зшиваючий бі- або поліфункціональний реагент (C , З), який називається «зшивка», «вставка», «спейсер», «ніжка» і займає проміжне положення між молекулами, що зшиваються.

Таким чином, ковалентна іммобілізація ферментів передбачає створення конструкцій, сполучених хімічними зв'язками трьох елементів: $\text{HЗ}\Phi$ (максимум) або двох $\text{H}\Phi$ і $\text{З}\Phi$ (мінімум). У свою чергу принципи конструювання відповідних моделей можна назвати термінами: «пришивкою» (для $\text{H}\Phi$), «зшивкою» (для $\text{HЗ}\Phi$) і «вшивкою» для ($\text{З}\Phi$).

Утворення хімічних зв'язків між елементами можливе тільки за наявності специфічних реакційноздатних груп у всіх реагентів, що вступають у взаємодію: ферменту, носія і зшиваючого агента.

За наявності на поверхні носія функціональних груп, здатних вступати у хімічні реакції з функціональними групами ферменту з утворенням ковалентних зв'язків, методика хімічної іммобілізації аналогічна адсорбційній. В розчин ферменту вводиться носій і на ньому проходить адсорбція ферменту, але вона незворотна, бо фермент пришивається до носія однією або декількома ковалентними зв'язками — Н-Ф (рис. 7.6, а).

У разі, коли тісний контакт з носієм може виявитись небажаним, наприклад, через несприятливі зміни мікросередовища ферменту, стеричних і дифузних обмежень, необхідно віддалити фермент від носія на деяку відстань. Ковалентна іммобілізація у цьому випадку відбувається шляхом зшивки ферменту з носієм за допомогою зшиваючого реагента різної довжини — Н-З-Ф (рис. 7.6, б).

За різноманітністю методичних прийомів цей спосіб незрівнянно багатший і гнучкіший за попередній за рахунок зшиваючого агента. По-перше, підбираючи довжину зшиваючого агента (або підбираючи оптимальну суміш зшиваючих агентів різної довжини), можна змінювати каталітичні характеристики іммобілізованого ферменту.

По-друге, можна спеціально конструювати зшивку так, щоб вона містила зв'язок, лабільний за певних умов або такий, що специфічно розщеплюється певними реагентами (зокрема, ферментативно). Це дає ключ до контрольованого відокремлення іммобілізованого ферменту від носія, наприклад, при вирішенні проблем направленої транспорту ферментів у живому організмі.

Ковалентна іммобілізація можлива і в системах, які початково не містять носія, а тільки фермент і зшиваючий реагент (З-Ф). Носій (як тверде тіло) формується безпосередньо у процесі іммобілізації, або ж сам фермент слугує одночасно і носієм. Таким чином, відбувається ковалентне вшивання молекули ферменту в різні типи сіток (рис. 7.6, в). Ідея конструювання ферментних сіток (ретикуляція ферментів) впливає із поліфункціональної природи самої молекули ферменту, який має на поверхні, окрім активного центру, велику кількість реакційноздатних груп. При введенні в розчин ферменту біфункціонального зшиваючого реагента окремі молекули ферменту зшиваються одна з одною і утворюють сітку, в якій вузлами слугують самі молекули ферменту. Залежно від природи і кількості зши-

ваючого агента можна одержати як водорозчинні, так і водонерозчинні препарати.

Інший спосіб ретикуляції заснований на використанні ферментів, попередньо ковалентно модифікованих зшиваючим реагентом, який має подвійний зв'язок (наприклад, акрилоїлхлоридом). У цьому випадку при співполімеризації білкового макромономера з низькомолекулярними мономерами (наприклад, з акриламідом), утворюються сітчасті полімерні гелі, зшиті

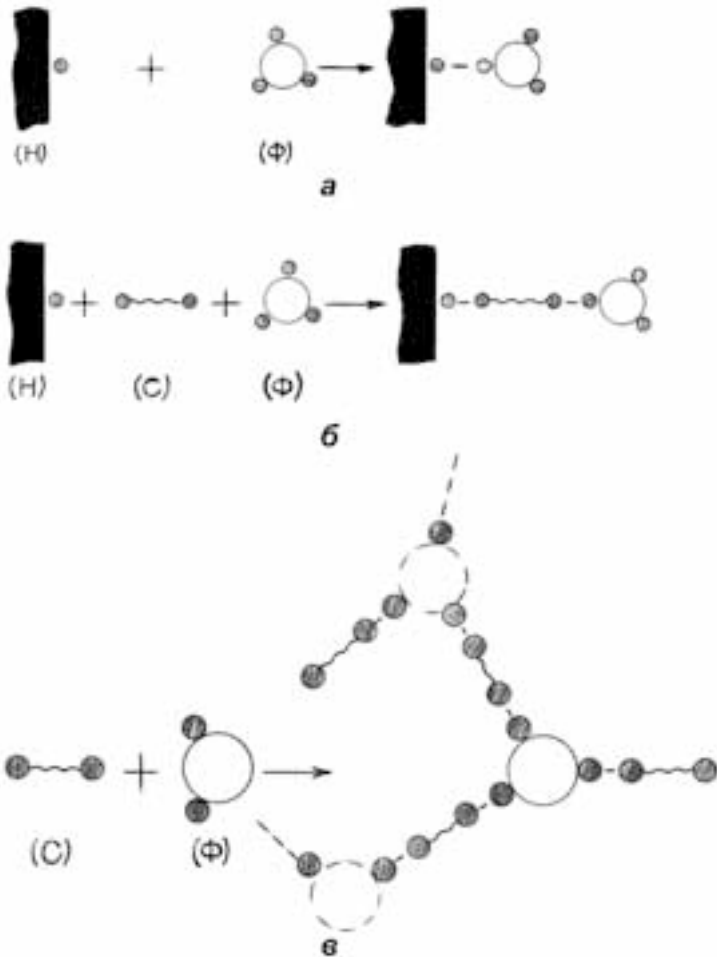


Рис. 7.6. Блок-схеми ковалентної іммобілізації ферментів
(за Березіним І.В. та ін., 1987)

білком або додатковим зшиваючим мономером (наприклад, N, N-метилен-біс-акриламідом). У наведеній системі вихідний стан — рідкий розчин, а кінцевий (після полімеризації) — тверде тіло (гель), причому, звичайно, воно набуває форми тієї посудини (реактора), в якій проводиться полімеризація.

Зшивкою білка в об'ємі розчинника (сополімеризація) одержують тривимірний гель (рис. 7.7, а) у вигляді крупного однорідного блока, який можна механічно подрібнювати і використовувати у вигляді частинок у суспензіях.

Тривимірний гель можна готувати і безпосередньо у вигляді дрібних частинок сферичної форми шляхом емульсійної полімеризації. Емульсії одержують диспергуванням водного розчину, який містить мономери в органічному розчиннику, що не змішується з водою. Варіантом таких систем є мікроемульсії або гідратовані обернені (спрямовані) міцели поверхнево-активних речовин (ПАР) в органічних розчинниках. В міцелярних системах розміри «крапельок», які містять модифікований фермент і мономери, можна варіювати і навіть одержувати їх близькими до власних розмірів молекул ферменту. При їх використанні можна обшивати окремі молекули ферменту полімерною оболонкою заданої товщини, тобто одягти фермент у «сорочку, яка зшита за міркою» (рис. 7.7, б). Це нова якість іммобілізації — **молекулярний рівень**.

Процес ретикуляції може відбуватись не тільки в розчині ферменту, але й при використанні його іммобілізованих препаратів. Так, додаткова обробка адсорбційно іммобілізованого ферменту на інертному носії зшиваючим агентом приведе до — підвищення міцності (задублення) препарату. Носій тут не бере участі в хімічній реакції, а слугує лише матрицею для організації шару (моношару) адсорбованого ферменту і обумовлює двовимірну направленість ретикуляції. До того ж, носій може бути взагалі видалений (наприклад, нітроцелюлозу розчиняють у метанолі) і таким чином одержують зшити ферментну плівку (рис. 7.7, в).

Препарати молекулярно іммобілізованих ферментів можуть бути одержані, якщо обидві групи біфункціонального зшиваючого реагента взаємодіють з однією і тією спмою молекулою білка — ферменту. Тут можна говорити про накладання «хімічних дужок», які внутрішньомолекулярно закріплюють структуру ферменту (рис. 7.7, г).

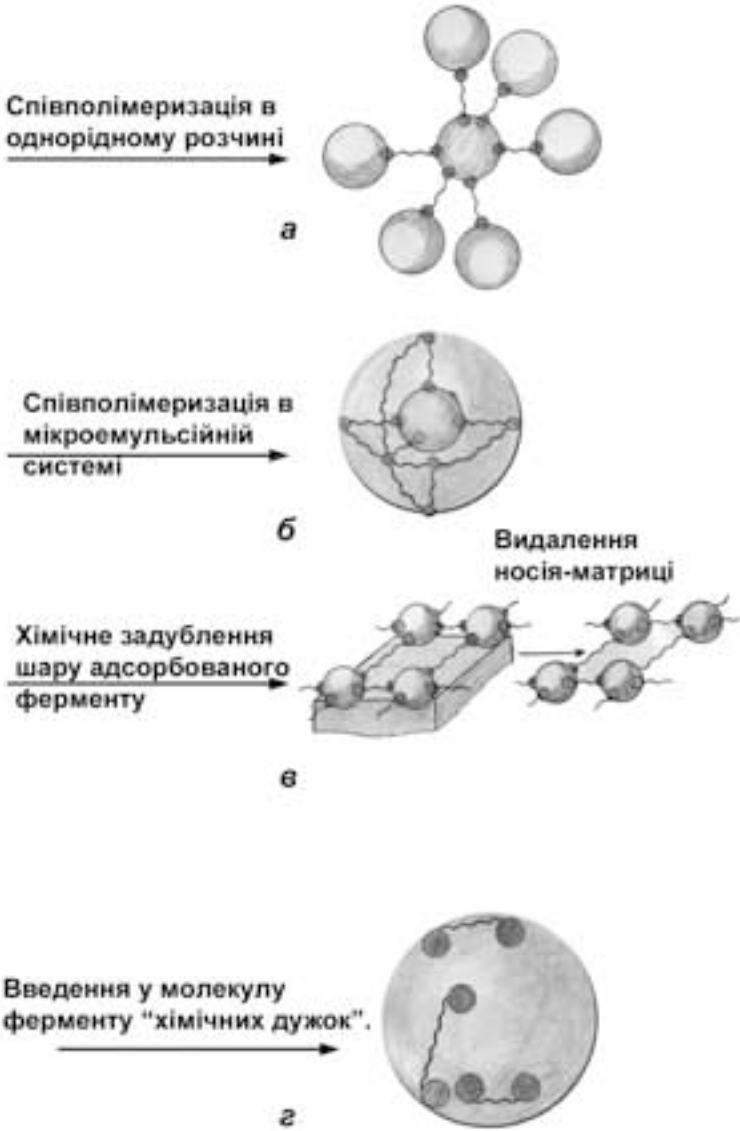


Рис. 7.7. Типи ретикуляції ферментів

(за Березіним І.В. та ін., 1987):

- а — міжмолекулярна трьохмірна сітка; б — сітчаста оболонка навколо молекули ферменту (молекулярно-іммобілізований фермент);
- в — міжмолекулярна двомірна сітка; г — внутрішньомолекулярна сітка із поліпептидних ланцюгів білка та «хімічних дужок».

7.5.2.2. Характеристика реагентів

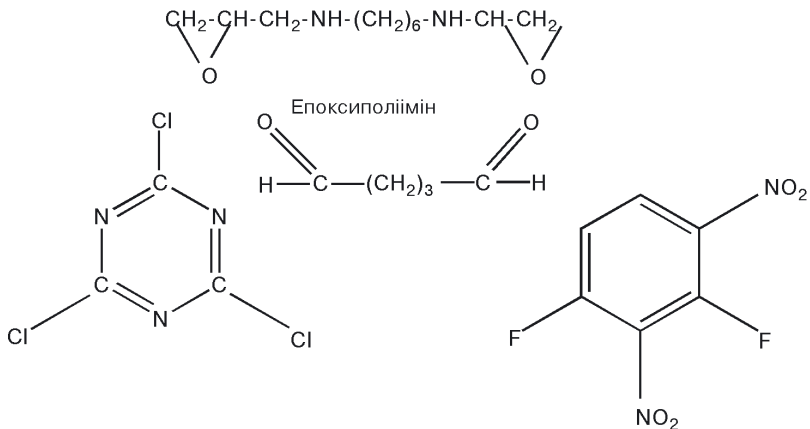
Носій. Для хімічної іммобілізації можуть використовуватись носії як органічної, так і неорганічної природи, природні або синтетичні. У кожному конкретному випадку використовується носій, який має реакційноздатні групи або в нього ці групи введені шляхом активації чи обробки модифікуючими агентами.

Активацію носіїв проводять з метою введення на поверхню електрофільних груп, які реакційноздатні стосовно до нуклеофільних груп білка (аміно- і SH-груп). Для цього, наприклад, вводять діазогрупи, альдегідні, імідоефірні, азидні групи.

Як активатори носіїв використовуються діальдегіди, бромціан, ароматичні хінони, карбодіміди, хлортриазини, епоксиди, реактив Вудворда тощо.

Зшиваючі реагенти. Можуть бути як простими біфункціональними (тобто з двома однаковими або різними за хімічною природою реакційноздатними групами) і складними, поліфункціональними, в тому числі і побудованих із різних за хімічною природою ланок з неоднаковими за міцністю зв'язками між ними.

Найбільш широко як багатофункціональні зшиваючі реагенти використовуються: глутаровий альдегід, 2,4-динітро-3,5-дифторбензол, низькомолекулярні карбодіміди, ціанурхлорид, епоксиполііміни.



Хлористий ціанур

Глутаровий альдегід

2,4-динітро-3,5-дифторбензол

Епоксиполііміни здійснюють поперечне зшивання біокатализаторів за рахунок епоксидних та іміногруп.

Хлористий ціанур містить три активних атоми хлору. Він взаємодіє з целюлозою (носієм) і ферментом, а третій реакційноздатний зв'язок $\text{C}-\text{Cl}$ може бути використаний для взаємодії з іншим компонентом.

Глутаровий альдегід, який є біфункціональним реагентом, своїми альдегідними $\text{C}=\text{O}$ групами при нейтральній реакції середовища утворює ковалентний зв'язок з вільними аміногрупами носія і ферменту. Недоліком його є те, що він може взаємодіяти з функціональними групами, які входять до складу активного центру, в результаті чого фермент інактивується. Щоб запобігти цьому, активний центр захищають глутатіоном, цистеїном або іншим низькомолекулярним тіолом тощо.

Зшиваючі реагенти використовуються для віддалення молекули іммобілізованого ферменту від носія на певну відстань. Це обумовлено тим, що у деяких випадках тісний контакт ферменту з носієм є небажаним, наприклад, через несприятливі зміни мікрооточення ферменту, стеричних і дифузійних обмежень. З цією метою використовуються зшиваючі реагенти різної довжини.

Мікрооточення іммобілізованого ферменту — це молекули та іони, що знаходяться дуже близько біля нього і впливають на його активність. Іммобілізація супроводжується зміною багатьох параметрів ферментативної реакції (оптимумів температури і рН, константи Михаєліса, максимальної швидкості реакції та ін.).

Носій впливає на мікрооточення іммобілізованого ферменту. Він може сприяти концентруванню на своїй поверхні або відштовхувати від неї молекули субстрату, продукту реакції, інгібітора, іонів водню та інших молекул і іонів, змінюючи при цьому їхній вміст у безпосередній близькості від ферменту.

Участь носія у створенні мікрооточення іммобілізованого ферменту відрізняється від розчинника. У зв'язку з цим вводиться поняття вільний розчин і мікрооточення ферменту. Якщо фермент, іммобілізований на поліаніононому носії і діє

на субстрат, який має позитивний заряд, то у зв'язку з електростатичною взаємодією концентрація субстрату у фазі вільного розчину і в мікрооточенні буде різною. Жоден з іонів, що є у розчині (субстрат, H^+), не розподіляється рівномірно в системі.

Носій впливає також на мікрооточення ферменту в результаті обмежень, створюваних носієм для вільної дифузії молекул (субстрату, продукту, кофактора тощо) як у напрямі до ферменту, так і від нього. Дифузійні обмеження спричинюються внутрішньою або зовнішньою перешкодою.

Зовнішня дифузійна перешкода пов'язана з наявністю навколо носія шару, що не перемішується (шару Нернста), товщина якого залежить від швидкості, з якою розчинник перемішується навколо носія. Зі збільшенням швидкості зменшується величина протидії, створюваної зовнішньою дифузійною перешкодою. Речовини розчинника дифундують у шар Нернста завдяки пасивній молекулярній дифузії і конвекції.

Внутрішні дифузійні перешкоди виникають через обмеження, створювані самим носієм. Визначальною щодо швидкості дифузії є одна з дифузійних перешкод — внутрішня або зовнішня.

Підбираючи довжину зшиваючого агента (або оптимальну суміш зшиваючих агентів різної довжини), можна, по-перше, змінювати каталітичні характеристики іммобілізованого ферменту. По-друге, можна спеціально конструювати зшивку так, щоб вона містила зв'язок, лабільний в певних умовах, або такий, що специфічно розщеплюється певними реагентами (ферментами). Це дає ключ до контрольованого відділення іммобілізованого ферменту від носія, наприклад, при вирішенні проблем направленого транспорту ферментів у живому організмі.

Фермент. Враховуючи, що основою будь-якого ферменту є білок, однією з головних умов успішного проведення іммобілізації хімічним методом є врахування специфічних особливостей будови білкової молекули. Білкові частини ферментів — це компактна конструкція з однієї або декількох поліпептидних ланцюгів, які ковалентно зв'язані (зшиті) між собою дисульфідними містками. Вони побудовані з ~ 20 амінокислот, з'єднаних між собою пептидним зв'язком. Кількість амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах білків складає від декількох

десятків до тисяч. Однак якісний склад білків (вміст тих чи інших амінокислотних залишків) виявляється дуже схожим. Майже половину усіх амінокислотних залишків білка складають амінокислоти з неполярними або слабополярними бічними групами. В результаті цього за рахунок гідрофобних взаємодій поліпептидні ланцюги скручуються у глобулярні структури таким чином, що ядро складають неполярні фрагменти поліпептидних ланцюгів, а зовнішній шар утворюють ланки з полярними та іоногенними групами, такими як $-SH$, $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$.

Звичайно, деяка кількість гідрофобних угруповань також може опинитися на поверхні. З них на глобулі формуються контактні ділянки для зв'язування субстратів і (або) для міжсубодиничних взаємодій.

Таким чином, білкові глобули несуть на своїй зовнішній поверхні реакційноздатні функціональні групи — мішені. Реакційна здатність білка — ферменту визначається набором і кількістю розміщених ззовні білкової молекули функціональних груп: тиольних (цистеїну), гідроксильних (серину, треоніну, тирозину), карбоксильних (глутамінової і аспарагінової кислот), гуанідинових (аргініну), імідазольних (гістидину) та аміногруп (лізину).

Найбільш реакційноздатними є SH -групи цистеїну. Вони здатні брати участь у різноманітних хімічних реакціях: окислення, ацилювання, алкілування і т.д. Однак SH -групи не зовсім підходять на роль груп-мішеней для ковалентної іммобілізації через низку причин. По-перше, вміст цистеїну в білках невеликий. По-друге — дуже часто в білках немає вільних SH -груп, тому що вони беруть участь в утворенні дисульфідних містків, які стабілізують структуру ферментів. По-третє: у разі, коли такі групи у білка є, вони, як правило, входять до складу активного центру ферменту і необхідні для каталітичної активності. Тоді при іммобілізації їх спеціально захищають обробкою ферменту різними речовинами. Але попри на це, SH -групи є дуже привабливими як групи-мішені. Тому розроблені методи введення в молекулу ферменту екзогенних SH -груп, наприклад, модифікацією аміногруп білка потрібними реагентами, зокрема, ацилюванням тіолактоном гомоцистеїна.

Для різних хімічних модифікацій і для ковалентної іммобілізації найчастіше використовуються аміногрупи білка. Це обумовлено низкою причин: їх у білку забагато; вони високо-реакційноздатні і поступаються лише SH-групам за кількістю та різноманітністю реакцій, у яких вони можуть брати участь; здебільшого аміногрупи відіграють другорядну роль у підтримці структури і функції ферментів.

Крім того, така важлива властивість аміногруп, як здатність бути донором протонів, забезпечує у фізіологічних умовах наявність на поверхні білка позитивних зарядів, які взаємодіють з негативно зарядженими карбоксильними групами білка з утворенням сольових містків. Для ковалентної іммобілізації через аміногрупи розроблена велика кількість носіїв і зшиваючих реагентів.

Таким чином, найбільш зручною групою-мішенню для хімічної іммобілізації є аміногрупа. Однак, крім аміногруп, у реакціях модифікації та іммобілізації можуть брати участь й інші групи білка: тіольні, імідазольні, гуанідинові, гідроксильні, а також небілкові компоненти ферменту, або ж реакційна система, зокрема, вода.

Головним завданням іммобілізації ферментів хімічним методом є максимальне збереження каталітичної функції ферменту шляхом використання функціональних груп, які не входять до активного центру ферменту і несуттєві для виявлення каталітичної активності, а також створення умов іммобілізації, які не викликають денатурації білкової молекули. Отже, при хімічній іммобілізації бажано захищати активний центр ферменту. Для цього можна використати різні захисні реагенти, субстрати, зворотні інгібітори тощо.

Загальною перевагою іммобілізованих хімічним методом препаратів є чітко визначені і контрольовані властивості, що дуже важливо при використанні їх у медицині і в аналітичній роботі.

Недоліком хімічних методів іммобілізації і одержаних таким методом препаратів є їх висока вартість, складність одержання і в зв'язку з цим недоцільність їх використання у великомасштабних промислових процесах. З цією метою більш придатними препаратами є ті, що одержані фізичними методами іммобілізації і особливо шляхом адсорбції.

Таким чином, при іммобілізації ферменти із розряду гомогенних каталізаторів (які знаходяться у тій же фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (які утворюють особливу фазу, що відділена від реагентів).

7.6. ФІЗИКО-ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ІММОБІЛІЗОВАНОГО ФЕРМЕНТУ

Фізико-хімічною характеристикою іммобілізованого ферменту є його стабільність. Стабільність ферменту — це здатність зберігати каталітичну активність в даних умовах. Визначається стабільність структурою самого ферменту, а також характером його взаємодії з оточуючими частинками в розчині, на поверхні, всередині носія або в об'ємі полімерного гелю.

Кількісною характеристикою стабільності ферменту є константа швидкості мономолекулярної інактивації ферменту (Кін). На практиці користуються або константою швидкості інактивації ферменту на певній глибині стадії його інактивації (50 або 75 %), або враховують час, протягом якого активність ферменту зменшується удвічі (тобто період напівжиття або напівінактивації ферменту).

Про стабільність ферменту роблять висновки також за його залишковою активністю після інкубації протягом певного часу, за певної температури або в присутності денатуруючого фактора. Коли йдеться про стабілізацію ферменту, мають на увазі зменшення константи швидкості інактивації ферменту.

Оцінку ефекту стабілізації або дестабілізації проводять шляхом порівняння Кін ферменту вихідного (нативного) з іммобілізованою формою при певній температурі.

7.7. КЛАСИФІКАЦІЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ

Згідно з рекомендаціями Міжнародної комісії з ферментної технології в 1972 р. для іммобілізованих ферментів складена така класифікаційна схема (рис. 7.8). Відповідно до такої схеми усі іммобілізовані ферменти поділяються на дві групи: вмонтовані і

зв'язані. Вмонтовані, у свою чергу, поділяються на дві підгрупи: укладені в матриці і мікроінкапсульовані.

Ферменти залежно від методу зв'язування поділяються на адсорбовані та ковалентно зв'язані. Ковалентно зв'язані, у свою черг, бувають зшитими (коли використовується зшивач, модель Ф–З–Н або З–Ф) і ковалентно приєднані до носія (модель Ф–Н).

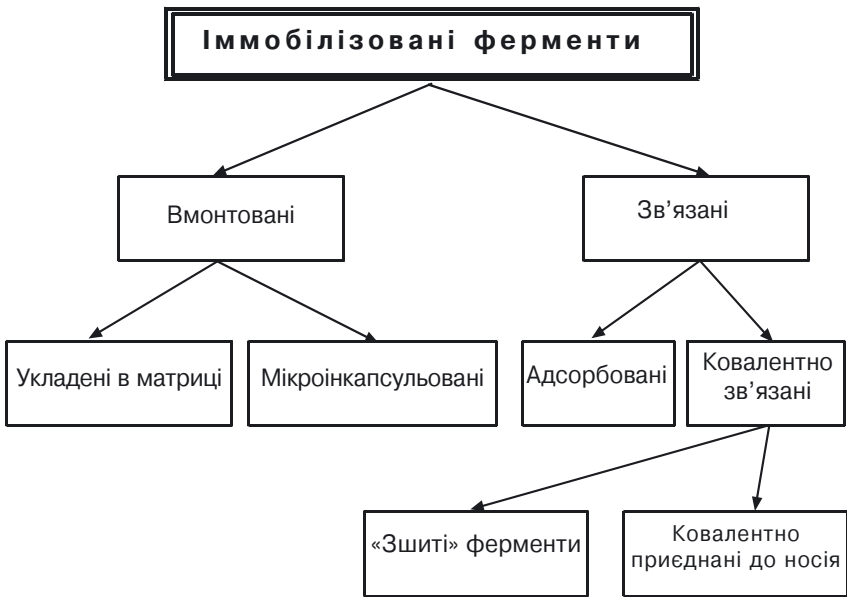


Рис. 7.8. Класифікація іммобілізованих ферментів
(О.В. Скородумова, Н.Г. Рибальський, 1990)

7.8. ІММОБІЛІЗАЦІЯ КЛІТИН (АДГЕЗІЯ)

Крім біологічно активних речовин (в т.ч. ферментів), можна іммобілізувати цілі мікробні клітини. Це явище називається адгезією.

Слід зазначити, що пріоритет в області іммобілізації клітин належить не вченим, а природі. У природі більшість мікроорганізмів знаходиться (на тій чи іншій стадії розвитку) в закріпленому стані на поверхні тіла тварин, рослин, у воді, в гірських породах і особливо в ґрунті. Без адгезії мікроорганізми не могли б існувати у природі. Вона є важливою екологічною рисою існування мікроорганізмів. Так, у ґрунті адгезія дозволяє мікроорганізмам утримуватись у ґрунтовому профілі і не вимиватись в нижні горизонти. Крім того, адгезовані клітини знаходяться на межі розділу твердого тіла і рідини, де зосереджені основні поживні речовини. Розкладання рослинних решток, деяких мінералів теж відбувається лише при адгезії мікроорганізмів.

Явище адгезії на різних носіях почали використовувати дуже давно. Ще більше 150 років тому в Німеччині використовували закріплені на буковій стружці бактерії для виробництва оцту. В 1857 р. Луї Пастер наголошував, що додавання адсорбентів стимулює спиртове бродіння.

Однією з перших робіт, яка започаткувала використання в області інженерної ензимології поряд з ферментами безпосередньо клітин, є робота шведських дослідників К. Мосбаха і П. Ларссона, опублікована в 1970 р. У Радянському Союзі вперше були опубліковані роботи в цьому напрямку в 1974 р.

Перший промисловий процес з використанням іммобілізованих клітин здійснено в 1973 році. Відома японська фірма «Танабе Сейяко» за допомогою іммобілізованих в поліакриламідному гелі клітин *Escherichia coli* здійснила процес одержання аспарагінової кислоти з фумарової кислоти. Тепер існує більше десятка біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків).

Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується також при очищенні стічних вод, особливо від токсичних сполук, наприклад фенолу, бензолу, гексаметилендіаміну.

Можлива також деградація і неприродних речовин, таких як циклічний дімер амінокапронової кислоти, який міститься у стічних водах з найлонового виробництва. Створені пілотні установки, в яких використовується суміш адсорбованих мікроорганізмів, що здійснюють денітрифікацію стічних вод, а також вилучення з них важких металів. Показана можливість використання цілих клітин *Algaligenes eutrophus*, іммобілізованих в альгінатний або карагінановий гель, для очищення стічних вод від тритію. 10 г клітин (сира біомаса) еквівалентні 1 г платинового каталізатора.

Іммобілізовані клітини використовуються для обробки не тільки стічних вод, але й органічних відходів. Реактор з адсорбованими клітинами в анаеробних умовах діяв два роки. Одержаний біогаз містив 90 % метану і менше 5 % CO_2 .

Для іммобілізації можуть використовуватись клітини у різному стані: живі і пошкоджені різною мірою. Одностадійні реакції можуть здійснювати і живі, і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять з використанням живих клітин, які тривалий час можуть регенерувати АТФ та інші коферменти (НАД, НАДФ).

Іммобілізовані клітини мають певні переваги над іммобілізованими ферментами: при використанні іммобілізованих клітин нема необхідності виділення і очищення необхідних ферментів, що має високу вартість; ферменти в клітині функціонують в нативному оточенні і їх денатурація в процесі роботи зводиться до мінімуму; клітини здійснюють одно- і складні багатостадійні процеси синтезу практично в один етап; у деяких випадках мають вищу ферментативну активність і стабільність окремих ферментів; значно ширший діапазон використання і більше можливості масштабування біотехнологічних процесів.

Основними недоліками адгезії є: обмеження дифузії як субстрату до клітини, так і продукта реакції у зворотному напрямку через стінку клітини, плазматичну або внутрішньоклітинну мембрану; необхідність підтримання цілісності клітини і утримання клітин у тій фазі росту, у якій синтезуються потрібні ферменти; через присутність у клітині великої кількості ферментів (що в деяких випадках є перевагою) можливі небажані побічні реакції.

Однак, незважаючи на недоліки, даний напрямок біотехнології дуже перспективний (судячи з кількості публікацій та оцінок спеціалістів) і поступово витіснятиме процеси з використанням як іммобілізованих ферментів, так і вільних клітин. Найбільш перспективним напрямком реалізації біотехнологічного потенціалу іммобілізованих клітин є клітинна і генетична інженерія, гібридомна технологія, субклітинна інженерія, ґрунтова біотехнологія тощо.

Варто зазначити, що іммобілізувати можна не тільки цілі клітини мікроорганізмів, але й клітини рослинних і тваринних тканин, використовуючи їх так, як і активні біокатализатори для синтезу фізіологічно активних речовин. Перспективною є також іммобілізація клітинних органел як активних поліферментних систем.

7.8.1. Основні методи іммобілізації клітин

Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів умовно можна розділити на три типи: фізичні, механічні і хімічні (рис. 7.9), але частота використання їх різна.

Фізичні методи. До них належать адсорбція і агрегація.

Адсорбція є одним із найбільш традиційних способів іммобілізації клітин. Як адсорбенти (носії) можуть використовуватись різні органічні і неорганічні носії — різні природні мінерали (пісок, глини, дерев'яна стружка тощо) і синтетичні матеріали (кераміка, капрон, поліуретан та ін.). Останнім часом особливої уваги заслуговують крупнопористі носії. Однак цей спосіб, маючи низку суттєвих переваг (низька вартість, проста іммобілізація, відсутність дифузних затруднень і екологічність), містить чимало недоліків, які обмежують сферу застосування крупнопористих носіїв. Головна із них — це незначна адгезія мікроорганізмів.

Агрегація. Цей метод полягає у зв'язуванні клітин між собою з утворенням агрегатів. Він рідко використовується в біотехнологічних процесах.

Механічні методи. Методи включення клітин у різні гелі одержали найбільше розповсюдження. Для цього найчастіше використовується поліакриламідний гель, карагенан, альгінатні

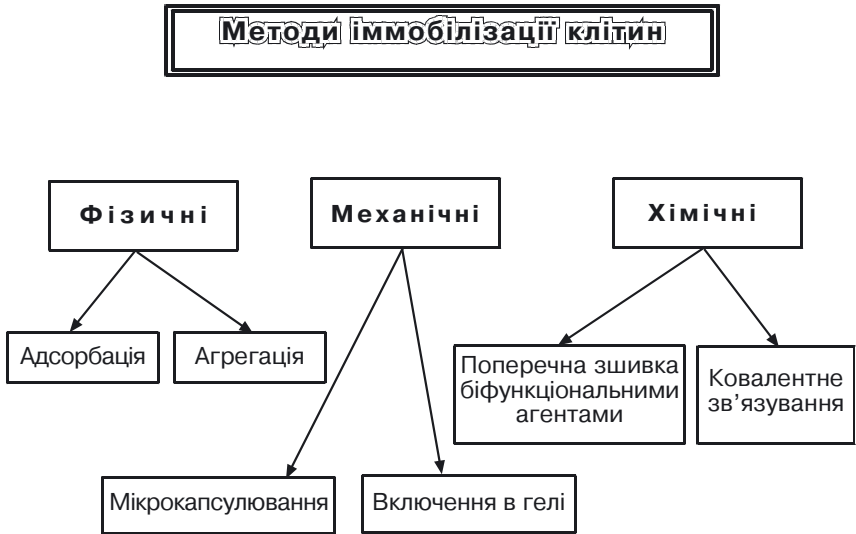


Рис. 7.9. Основні методи іммобілізації клітин
(Н.Г. Рибальський, І.Г. Чапліна, 1990)

гелі, а також фотопоперечношиті й уретанові полімери. Клітини, включені в поліакриламідний, Са-альгінатний і карагінановий гелі, можуть зберігати життєздатність і за присутності поживного середовища розмножуватись у приповерхневих шарах гелю.

Залежно від властивостей носія і характеру процесу використовують носії у вигляді гранул, волокон або мембран.

Мікрокапсулювання є одним з традиційних методів іммобілізації і останнім часом набуває широкого розповсюдження для іммобілізації клітин.

Хімічний метод. Він ґрунтується на утворенні ковалентних зв'язків з активованим носієм, на поперечній зшивці клітин за рахунок активних груп амінокислот та інших сполук у стінці клітин з біфункціональними реагентами, наприклад глутаровим альдегідом.

Хімічні методи іммобілізації клітин не знайшли такого широкого розповсюдження, як для іммобілізації ферментів та інших біологічно активних речовин. Це пов'язано, в першу чергу,

з токсичною дією на клітини різних біфункціональних реагентів, хоча останнім часом з'явилися різні методи, які зменшують токсичну дію реагентів, що дає можливість підвищити життєдіяльність клітин.

В останні роки запропонований абсолютно новий спосіб проведення ферментативних реакцій як для вільних, так і для іммобілізованих клітин — двофазові водно-органічні системи. Клітини при цьому локалізовані у водній фазі і меншою мірою зазнають впливу органічного розчинника, який не змішується з водою.

Японські дослідники розробили спосіб іммобілізації клітин у фоточутливі полімери. Іммобілізовані таким чином клітини є особливо прийнятними для використання двофазових систем і перетворення стероїдних сполук. Однак цей метод не підходить для живих клітин, але дає гарні результати при проведенні одностадійних реакцій.



Контрольні питання

1. Інженерна ензимологія і її основне завдання. Що лежить в основі сучасної інженерної ензимології?
2. Що таке іммобілізація та іммобілізовані ферменти?
3. З якою метою проводиться іммобілізація ферментів?
4. Які носії використовуються для іммобілізації і як вони класифікуються?
5. Що таке органічні полімерні носії і їх характеристика?
6. Чим відрізняються носії неорганічної природи і яким чином їх можна використати для хімічної іммобілізації?
7. Що таке місткість або ємність носія і від чого вона залежить?
8. Що таке модифікація і активація носія?
9. Яким вимогам мають відповідати носії? Які додаткові вимоги висуваються до полімерних носіїв?
10. Якими методами можна провести іммобілізацію ферментів?

11. Що таке адсорбційна іммобілізація і які носії можуть при цьому використовуватися? За рахунок чого відбувається утримання адсорбованої молекули ферменту на поверхні носія? Фактори, які впливають на адсорбцію?
12. Якої природи мають бути гелі для іммобілізації ферментів?
13. Що таке ліпосоми? За рахунок чого проходить іммобілізація ферментів при включенні їх у ліпосоми?
14. Які особливості має метод іммобілізації ферментів мікрокапсулюванням?
15. Як відбувається іммобілізація ферментів при використанні систем двохфазового типу?
16. На чому базуються хімічні методи іммобілізації?
17. Які основні принципи конструювання ковалентно-іммобілізованих ферментів?
18. Які носії використовуються для хімічної іммобілізації?
19. Що таке зшиваючий реагент і з якою метою він використовується при іммобілізації ферментів?
20. Чим визначається реакційна здатність білка-ферменту? Які функціональні групи білка є найбільш реакційноздатними?
21. Які реакційноздатні групи використовуються як групи-мішені для ковалентної іммобілізації?
22. Яке головне завдання при іммобілізації ферментів хімічним методом?
23. Які недоліки і переваги хімічного методу іммобілізації?
24. Що є фізико-хімічною характеристикою іммобілізованого ферменту?
25. Що покладено в основу класифікації іммобілізованих ферментів, коли і ким вона була запропонована?
26. Що таке іммобілізація клітин і значення цього явища?
27. Якими методами проводиться іммобілізація клітин?
28. Які переваги і недоліки має іммобілізація клітин порівняно з іммобілізацією ферментів?

ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ З ЛІКУВАЛЬНОЮ МЕТОЮ

Застосування ферментів та інших біологічно активних речовин (БАР) білкової природи в терапії має давні традиції. Сучасна медицина широко використовує високоочищені препарати БАР білкової природи як перспективні засоби медикаментозного лікування завдяки їхній високій активності і специфічності. Сьогодні визначилися такі основні напрями ензимотерапії:

- 1) усунення дефіциту ферментів з метою компенсації вродженої або набутої функціональної недостатності;
- 2) видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних уламків;
- 3) лізис тромбів;
- 4) комплексна терапія злоякісних новоутворень;
- 5) детоксикація організму.

Як лікувальні препарати ферменти застосовуються з метою поповнення відсутніх в організмі каталізаторів, що виникає внаслідок генетичних чи інших патологічних порушень, а також для специфічного руйнування шкідливих продуктів обміну, що накопичуються в організмі хворого.

На сьогодні дуже важливою проблемою є лікування уроджених ензимопатій. Нині досліджено майже 150 уроджених «лізосомних» хвороб накопичення, за яких через генетично обумовлену відсутність того чи іншого ферменту в клітині відбувається летальне нагромадження субстрату. Сюди ж варто віднести і захворювання, що виникають через відсутність ферменту, який каталізує певну стадію обміну. Наприклад, фенілкетонурія (хвороба, яка призводить до затримки розумового розвитку) викликається нестачею ферменту, що перетворює фенілаланін у тирозин. Відсутність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах призводить до виникнення невиліковного захворювання — фавізму. За захворювання печінки і нирок супро-

воджується нагромадженням в організмі токсичних продуктів життєдіяльності.

Теоретично з лікувальною метою у таких випадках потрібно ввести хворому відсутній фермент із чужорідного джерела. Але спроби лікувати внутрішньовенним введенням відповідних нативних ферментів, виділених з біологічних рідин і тканин, не дали бажаних результатів, особливо при лікуванні лізосомних хвороб.

Причиною неефективності терапії нативними ферментами є швидке виведення чужорідного білка-ферменту з кровотоку і захоплення його печінкою ще до його дії, а також зумовлення ними як чужорідними білками різних побічних реакцій (антигенність, алергенність, токсичність тощо), що може стати причиною летального наслідку.

В живому організмі ферменти і фізіологічно важливі білки майже завжди містяться всередині клітини. При цьому фермент знаходиться в оточенні, яке здатне підтримувати його нативну структуру, і часто локалізований у безпосередній близькості до інших ферментів, які переробляють продукт реакції першого. Ферментативні системи взаємодіють із субстратами через мембрану клітини за допомогою різних транспортних механізмів.

При безпосередньому введенні ферменту в організм, він може потрапити в умови, які сприяють його денатурації, і активність ферменту буде стрімко знижуватись одразу ж після ін'єкції. Небезпечними для ферментів є протеїнази організму, які розщеплюють введений білок на неактивні пептиди, а також інгібітори, які зв'язуються з ферментом через активний центр. В результаті вони будуть утилізовані лейкоцитами і фагоцитами. Крім того, введений у нативному стані фермент, як речовина високої молекулярної маси, дифундуватиме дуже повільно у потрібне місце (хворий орган), а введений безпосередньо у хвору ділянку буде швидко вимиватися кровотоком або іншими рідинами. Крім того, широке щоденне застосування ферментів обмежене й економічними факторами – їх високою вартістю, а цьому можна запобігти за рахунок іммобілізації ферменту, що сприяє його стабілізації і захищає певною мірою від реакції імунної системи, а також збільшує час його дії у кровотоці.

8.1. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ПРЕПАРАТІВ. НОСІЇ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ

Модифікація лікарської речовини дозволяє пролонгувати її дію в організмі, знизити токсичність препарату, що використовується, та уникнути його протеолізу.

Поряд з проблемою імуногенності одним з головних завдань при виготовленні лікарських препаратів на основі ферментів (білкових речовин) є виведення препарату з організму повністю. Наразі шляхи виведення ферменту в цілому з'ясовані і основною проблемою є виведення з організму носія.

Тому носії, які використовуються для іммобілізації білкових лікарських препаратів, мають відповідати певним вимогам, які залежать від способу їх застосування. Вони не повинні негативно впливати на організм і мають сприяти проникненню препарату до бажаної цілі (до хворого органу). І носії, і зшивка повинні бути нетоксичними, без антигенних властивостей. При безпосередньому введенні носій повинен з часом руйнуватися в тканинах і виводитися з організму або метаболізуватися. У зв'язку з цим молекулярна маса носія не має перевищувати 60000, щоб він міг виводитися нирками. Речовини з високою молекулярною масою забиватимуть ниркові каналці. Винятком можуть бути полімери, що деградуються, які руйнуються в організмі до нормальних метаболітів. До таких полімерів, наприклад, належить D, L-полімолочна кислота, декстрини.

Якщо ж іммобілізований фермент буде використовуватись у позаорганізмовому шунті, то кращий носій — вініловий полімер. Стабілізація терапевтичних ферментів у деяких випадках може здійснюватися без використання полімерних носіїв за рахунок хімічної модифікації білкової глобули низькомолекулярними реагентами, або введенням у глобулу внутрішньомолекулярних зшивок з біфункціональних реагентів, що ускладнює денатураційне розгортання молекули білка. Цей підхід важливий тоді, коли для здійснення функції ферменту має відбутися його взаємодія з рецептором клітинної мембрани (наприклад, паратромбін–тромбоцит), або проникнути всередину клітини.

У деяких випадках використовується міжмолекулярне зшивання ферментів біфункціональними реагентами типу глутаро-

вого альдегіду, що можна також розглядати як іммобілізацію однієї молекули ферменту на іншій. Така модифікація ферменту приводить до підвищення його стабільності й ефективності. Наприклад, таким чином удалося стабілізувати α -галактозидазу, яка використовується для лікування хвороби Фабрі.

Зв'язування ферментів з іншими білками також дає виражений ефект — кон'югати урикази або гемоглобіну з альбуміном здатні в декілька разів довше циркулювати в активному стані у кровотоці, ніж відповідні нативні білки (*Ларіонова Н.І., Торчилін В.П., 1982*).

Найкращими носіями є поліцукри, зокрема декстрини, завдяки високій біосумісності. Для іммобілізації терапевтичних ферментів можуть використовуватись і деякі нетоксичні та неімуногенні синтетичні полімери, наприклад, реакційноздатні похідні поліетиленгліколю, полівінілпіролідону, полівінілового спирту та ін.

Певну перспективу відкриває використання як носіїв природних сполук, які самі по собі мають корисну фізіологічну активність або здатні посилювати дію зв'язаного з ним ферменту. Так, для іммобілізації тромболітичних ферментів може використовуватись антикоагулянт гепарин.

Можливість регуляції імунної відповіді організму на введення терапевтичного ферменту є дуже важливим моментом. Багато перспективних ферментних препаратів не можуть використовуватись через те, що викликають, як чужорідні білки, негативні реакції організму. В той же час іммобілізація таких ферментів на природних або синтетичних полімерах, наприклад, на поліцукрах або поліетиленгліколі, різко знижує імунологічні й алергічні реакції, мабуть, за рахунок стеричних перешкод взаємодії антиген–антитіло, які створюються матрицею.

8.2. МЕТОДИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ І ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ

Іммобілізація терапевтичних ферментів та інших білкових препаратів може проводитися різноманітними методами ковалентної і нековалентної фіксації ферментів на нерозчинних і

розчинних носіях різної природи. Вибір методу залежить від призначення препарату та способу його введення.

Існують два принципово різних підходи до одержання і застосування іммобілізованих терапевтичних ферментів: 1) введення в організм; 2) використання у реакторах за допомогою позаорганізмowego шунта (штучної нирки) чи імплантації реактора з іммобілізованим ферментом як протеза кровоносної судини.

Перший підхід обумовлюється різновидами, що залежать від патологічних уражень організму. При різних системних ураженнях, коли необхідна присутність терапевтичного ферменту в різних органах і тканинах, доцільно використовувати тим чи іншим методом іммобілізований водорозчинний препарат, який має підвищену стабільність та уповільнене виведення з організму. До нього належать різні ферментовмісні «штучні клітини» типу мікрокапсул, ліпосом, «тіней» еритроцитів.

З іншого боку, для терапії локальних уражень, коли присутність ферменту потрібна лише у місці ураження, доцільно створювати біосумісні ферментовмісні полімерні частини (які біодеградуються чи просто тимчасово імплантуються), що можуть бути локалізовані в певному місці і залишатися там деякий час, виділяючи безперервно в оточуюче середовище терапевтичний фермент.

Препарати іммобілізованих ферментів для локального застосування можуть бути одержані як на основі нерозчинних полімерів, так і носіїв, які біодеградуються. У першому випадку носій після закінчення дії ферменту механічно видаляється з вогнища ураження, а в другому — самостійно руйнується у тканинах.

З використанням мікрогранул зшитого декстрану-сефадексу були одержані препарати тромболітичних ферментів з заданою швидкістю біодеградації — фібролізін, стрептокіназа і урокіназа. Вони можуть створювати локальне депо при терапії тромбозів.

Другий підхід в одержанні і застосуванні іммобілізованих ферментів — це використання їх у різних екстракорпоральних апаратах для перфузійного очищення різних біологічних рідин.

Екстракорпоральна перфузія з використанням ферментів широко застосовується для виведення токсинів з організму. Носіями є сферичні частинки з полімерів, скла, кераміки, силікатів. Вимоги до цих носіїв такі: вони мають бути з мінімальною неспецифічною сорбцією, не повинні викликати деформацію формених елементів крові і не мають бути дорогими, тому що колонки для гемодіалізу і детоксикації одноразового використання.

Окремим випадком цього підходу є створення ферментних реакторів, які використовуються як тромбобезпечні протези кровоносних судин. Сюди належить також перев'язувальний матеріал, який містить зазвичай протеолітичні ферменти, що використовуються для очищення гнійних ран.

При лікуванні системних уражень розчинні препарати іммобілізованих ферментів можуть використовуватися для традиційного **внутрішньовенного введення**. Але краще їх вводити **у черевну порожнину**, де каталітична активність зберігається протягом 8 місяців. Так, модифіковані декстраном карбокси-пептидаза G і аргіназа при внутрішньочеревному введенні мишам з прищепленою мастоцитомою мають здатність створювати більш високу і тривало діючу концентрацію активності у кровотоці, ніж нативні ферменти. Іммобілізація на розчинних полімерних носіях дає можливість одержати більш стабільні, активні і безпечні терапевтичні препарати. Таким методом можна з успіхом іммобілізувати інші препарати білкової природи — різні фізіологічно активні поліпептиди типу панкреатичного інгібітора трипсину і, що надто важливо, гормону інсуліну.

Перспективним методом іммобілізації і застосування модифікованих форм ферментів для лікування є створення різного типу **«штучних клітин»**.

Лікарські препарати, в яких співвідношення білок : полімер за масою дуже високе і досягає сотень тисяч і вище, можуть бути виготовлені за допомогою методу так званої «штучної клітини», а також ліпосом. Ці препарати є свого роду мікросферами з більш-менш твердою і проникною оболонкою. Їхнє призначення різне.

Першим типом «штучних клітин» є **мікрокапсули**, які були одержані Чангом Т.М. в 1965 році. Мікрокапсульовані препара-

ти ферментів – це крихітні реактори діаметром від 10^3 до 510^4 нм, тонка полімерна оболонка яких (200–400 нм) проникна для низькомолекулярних сполук, тобто для низькомолекулярних субстратів і продуктів їх перетворення. Фермент, який знаходиться всередині оболонки, надійно утримується, не контактує з біологічними рідинами і тканинами організму, не руйнується протеїназами, не інгібується та не викликає імунної реакції. В мікрокапсулу можуть бути включені відносно високі концентрації ферменту, досягти яких у кровотоці при використанні нативного ферменту неможливо, а також різні ферменти одночасно.

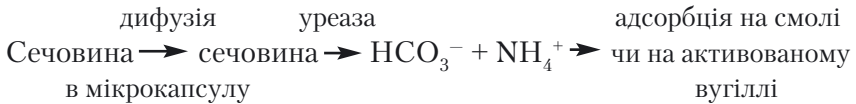
Основною перевагою мікрокапсул є можливість імплантувати їх у потрібне місце, наприклад у безпосередній близькості до пухлини. Фермент, включений у капсулу, може бути попередньо стабілізованим, або поряд з ним можуть бути включені сполуки, також високомолекулярні, які сприяють його стабілізації.

Капсули можуть містити мікроскопічні ділянки тканин. Наприклад, є експериментальні дані зі створення депо інсуліну в організмі шляхом імплантації мікрокапсул, що містять острівки Лангерганса, які синтезують у підшлунковій залозі інсулін (Березін І.В. та ін., 1987).

Всередину мікрокапсул можуть бути включені поліферментні системи і їх кофактори, модифіковані з метою збільшення молекулярної маси та утримання всередині мікросфери.

Полімерна стінка мікрокапсул зазвичай виготовляється із міцних синтетичних полімерів (поліамідів, поліуретанів та ін.), або з природних (полімолочної кислоти). Полімолочна кислота біодеградується з достатньою швидкістю і тому зникає проблема утилізації матеріалу оболонок мікрокапсул в організмі, а такі ферментні препарати є дуже перспективними. Однак застосування мікрокапсул із синтетичних полімерів дуже ефективно при позаорганізмовому їх використанні: у вигляді колонок для діалізу в апараті «штучна нирка». Це дає можливість зменшити об'єм препарату і відповідно кількість необхідних дорогих розчинів. Наприклад, для мікрокапсульованої «штучної нирки» потрібна колонка об'ємом усього 30 мл, яка працює майже у 100 разів швидше за звичайний апарат.

Уреазу з носієм (іонообмінною смолою чи активованим вугіллям) поміщують в одну мікрокапсулу. Аміак, який утворюється в процесі розкладу сечовини, адсорбується всередині мікрокапсули:



Вірогідно, ферментні реактори на мікрокапсулах будуть використовуватися для деградації недіалізованих матеріалів.

У деяких випадках для виготовлення мікрокапсул використовуються високомолекулярні сполуки, розчинні за одних умов і зберігають високу міцність оболонок — за інших. Таким чином поводить себе ацетилфталілцелюлоза, мікрокапсули з якої інтактні у шлунковому соці і розчиняються у кишечнику, звільнюючи вміст.

Всередину мікрокапсул можуть включатися магнітні частинки. У цьому випадку ззовні підводять магнітне поле і препарат утримують поблизу органу-мішені (хворого органу).

Перші успішні експерименти із застосування мікрокапсульованих ферментів на тваринах були проведені з використанням уреазу для зниження сечовини в крові, каталази для лікування тварин з каталазною недостатністю і аспарагінази для пригнічення росту аспарагінозалежних пухлин (Ларіонова Н.І., Торчлін В.П., 1982).

Наступним після мікрокапсулювання методом створення штучних клітин є включення ферментів у **ліпосоми** — штучні фосфоліпідні мікробульбашки, які ще називають контейнерами-переносниками.

Ліпосоми — це бішарові сферичні утворення діаметром від 20 до 10³ нм, які одержують найчастіше при механічних впливах на дисперсії фосфоліпідів (Ларіонова Н.І., Торчлін В.П., 1982). Ліпосоми цілком біосумісні, не викликають імунологічних реакцій, а фосфоліпідні ліпосом при їхній деградації можуть бути використані для синтезу клітинних мембран. На відміну від мікрокапсул ліпосоми мають здатність доставляти включений у них препарат безпосередньо до клітин, з якими ліпосоми взаємодіють, та сприяти надходженню відсутнього ферменту в лізо-

соми. Однак уже через 15–30 хвилин після введення 50–80 % ліпосом поглинаються клітинами ретикулоендотеліальної системи, насамперед печінки і селезінки. Отже, є проблема специфічного поглинання ферменту, укладеного в ліпосомах, певними тканинами. Є ідеї, реалізація яких дозволить ліпосомам доставляти фермент за адресою, тобто до хворого органу. Для цього передбачається на поверхню ліпосом включати антитіла до антигенних структур, що знаходиться на поверхні тих клітин, для яких призначений фермент.

З великої кількості ферментів, уже включених у ліпосоми, викликає інтерес аспарагіназа, що використовується для лікування деяких форм лейкозу. Установлено, що деякі лейкозні клітини не можуть синтезувати амідаспарагін, а отже, не можуть рости без використання екзогенного аспарагіну. Введення в кров'яне русло іммобілізованої за допомогою включення в ліпосоми чи капсули з полімолочної кислоти аспарагінази призводить до зниження концентрації цього аміду в крові до мінімального рівня. Загибель лейкозних клітин настає від аспарагінового голодування.

Враховуючи те, що клітини ретикулоендотеліальної системи, зокрема печінки, являють собою природну мішень для ліпосом, то включені у ліпосоми ферменти можуть виявитися дуже ефективними для лікування різних ферментних нестач печінки.

Як контейнери для включення ферментів можуть використовуватися і оболонки клітин крові, зокрема мембрани або «тіні» **еритроцитів**. Одержують їх шляхом часткового гемолізу еритроцитів з подальшим заповненням ферментом та повним відновленням цілісності мембрани. Таким методом одержали «тіні» еритроцитів, які заповнені β -глюкозидазою, β -галактозидазою, β -глюкуронідазою, аспарагіназою.

Крім еритроцитів, використовуються і оболонки інших клітин. Так, одержані лікарські препарати, які включені в **оболонки макрофагів** (Березін І.В. та ін., 1987). Макрофаги мають тенденцію накопичуватись у вогнищах запалення, а значить і можуть транспортувати туди як низько-, так і високомолекулярний лікарський препарат. Позитивним щодо «тіней» клітин як носіїв є їх повна сумісність з організмом людини чи тварини, оскільки цей носій готують на основі клітин, виділених із організму пацієнта.

Певний інтерес становлять **міцели** — утворення, які менші за діаметром від ліпосом. Вони дуже перспективні як носії ферментів для виготовлення складних мазевих композицій, в яких ферменти нестійкі.

8.3. ТЕРАПІЯ ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Завдяки перевагам, яких набувають іммобілізовані ферменти порівняно з нативними (стабільність, неімуногенність, не піддаються протеолізу, дії мікроорганізмів, можуть мати властивість концентруватись у бажаному органі), вони є дуже перспективними для застосування у клінічній практиці. Найбільших успіхів досягнуто у двох напрямках: лікуванні гострої серцевої недостатності і терапії процесів, викликаних ранами.

Найбільш широко використовуються в клінічній практиці протеолітичні ферменти. Одержані іммобілізовані протеази — субтилізин, трипсин, α -хімотрипсин, терилітин і ін.

У колишньому Радянському Союзі вперше в світі у лікувальну практику була впроваджена іммобілізована на поліцукристу носії стрептокіназа, яка з успіхом і зараз використовується для лікування різних тромболітичних захворювань. Препарат «Стрептодекіназа» не має антигенних властивостей, нетоксичний і стабільний.

Відомо, що протеїнази, розщеплюючи денатуровані білки, сприяють очищенню ран і, відповідно, їх загоюванню. Як носії для іммобілізації протеолітичних ферментів з цією метою найчастіше використовуються волокнисті матеріали на основі целюлози, полівінілового спирту, солей альгінової кислоти, поліамідні і колагенові волокна. Готують також препарати, іммобілізовані на гранульованих носіях — целюлозних кульках, гранулах декстрину тощо. Готують нитки, в які при формуванні включають фермент і використовують їх як зшивний матеріал.

Порівняльний аналіз дії нативних та іммобілізованих протеїназ (в основному α -хімотрипсину, трипсину, терилітину, субтилісину, колагенази) показав, що уже на 2–4-й день рана очищається від некротичних мас і вдвічі швидше настає грануляція. Іммобілізовані протеолітичні ферменти з великим успі-

хом використовуються у лікуванні гнійних захворювань легень і плеври. Природний полімер колаген ефективний як носій при використанні протеїназ для введення у черевну порожнину, лікування емпієм, абсцесів.

Для створення протезів судин зі зниженою або виключеною можливістю тромбоутворення використовуються біосумісні полімерні трубки, на внутрішній поверхні яких іммобілізують протеїнази.

Іммобілізовані протеолітичні ферменти ефективно використовуються для лікування гнійних захворювань та опіків у людей та тварин (*Анюліс Е. і ін., 1989, Щетинін В.В., 1991*).

Такі протеолітичні ферменти як профезим і процель, іммобілізовані на гемоцелюлозі методом ковалентного зв'язування, застосовують при лікуванні гнійних ендометритів, гнійних маститів та гнійних ран кінцівок тварин (*Анюліс Е. і ін., 1989*). Перевага цих ферментів ще й у тому, що вони не всмоктуються в кров і не впливають на якість продукції.

Дуже важливими при лікуванні різних патологій є білки-інгібітори ферментів, і, зокрема, основний полівалентний інгібітор протеїназ. Його іммобілізували на поліцукрі КМ-декстрані (карбоксиметилдекстран), який, у свою чергу, модифікували залишками галактози. Білкові інгібітори протеїназ застосовуються при лікуванні сепсису, бактеріального (ендотоксичного) шоку, алергічних захворювань, артрозоартритів та ін. При інфаркті міокарда інгібітори протеїназ мають антишемічну дію, зменшуючи некротичну зону і покращуючи колатеральний кровообіг.

На основі іммобілізованих білкових інгібіторів протеїназ синтезовані біоспецифічні сорбенти, які використовуються для лікування таких патологій як сепсис, гнійний перитоніт, опікова хвороба, нирково-печінкова недостатність (*Валуєва Т.А. і ін., 1988*).

Одержаний іммобілізований на органічному носії поліетиленоксиді протеолітичний фермент протосубтилін, який застосовується у виробництві біопрепаратів, гуманній і ветеринарній медицині (*Салганік Р.І. і ін., 1988*). Препарат має підвищену активність і термостабільність і, крім того, активний в більш широкому діапазоні рН.

Одержаний також комплексний вітамінний препарат, іммобілізований на колагені і призначений для профілактики порушень обміну речовин. Іммобілізація вітамінних комплексів (аскорбінової кислоти, тіаміну, броміду пірідоксину) на колагеновому носії проводилася методом включення вітамінів у гель. Дослідами на лабораторних тваринах встановлено, що використання іммобілізованого комплексу вітамінів більшою мірою впливає позитивно при порушенні обміну речовин, ніж застосування водного розчину цих же вітамінів окремо.



Контрольні питання

1. У яких випадках використовуються ферментні препарати з лікувальною метою?
2. З якою метою проводиться іммобілізація ферментних препаратів, призначених для ензимотерапії?
3. Які носії використовуються для іммобілізації терапевтичних ферментів?
4. Які вимоги до носіїв, що використовуються для іммобілізації лікувальних ферментів і від чого вони залежать?
5. Які методи іммобілізації застосовуються для одержання терапевтичних препаратів?
6. Які існують методи використання іммобілізованих терапевтичних ферментів?
7. У чому полягає перспективність методу іммобілізації шляхом створення «штучних клітин»?
8. Які особливості іммобілізації та застосування у терапії мікрокапсул?
9. Що таке ліпосоми та їх характеристика? Які переваги і недоліки має цей метод іммобілізації?
10. Які особливості має метод включення терапевтичних ферментів у «тіні» еритроцитів та в оболонки макрофагів, їх застосування?
11. Які іммобілізовані ферменти застосовуються у гуманній і ветеринарній медицині?

ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ У АНАЛІТИЧНІЙ РОБОТІ

Унікальна специфічність дії і висока каталітична активність, а також дедалі більша доступність індивідуальних ферментів стали причиною їх широкого використання для аналітичних цілей, в медицині (гуманній і ветеринарній), харчовій, мікробіологічній і медичній промисловості, для контролю оточуючого середовища і наукових досліджень.

Поряд із вдосконаленням різних фізико-хімічних інструментальних методів (хроматографічних, радіохімічних, люмінесцентних та ін.) методи аналізу з використанням як реагентів ферментів застосовуються для виявлення і кількісного визначення різних речовин: металів, органічних і неорганічних сполук, метаболітів, ферментів, мутагенів, онкогенів тощо.

Особливістю сучасних підходів до створення біохімічних методів аналізу на основі ферментів є високі вимоги до їх чутливості, точності, специфічності, відтворюваності, можливості автоматизації, вартості. Крім того, аналіз має бути експресним, розрахованим на використання мікрокількості зразка і можливість проведення дослідження у багатокомпонентних середовищах, наприклад, таких як сироватка крові, стічні води тощо.

Ще однією характерною рисою сучасного аналізу є його різномасштабність залежно від умов використання: поодиноких у промисловості (1–100 аналізів на день) і масових (10^3 – 10^4) при епідеміологічних обстеженнях, причому аналізи повинні проводитися як у стаціонарних, так і в пересувних лабораторіях.

Наведені вище вимоги зумовили створення численних видів ферментних аналізаторів.

Однак попри на переваги ферментативних методів аналізу, їх використання донедавна обмежувалося сферою клінічної біохімії. Це пояснюється такими причинами:

- 1) ферменти – це, у більшості випадків, дуже дорогі препарати, які виділяються із дефіцитної рослинної або тваринної сировини;
- 2) багато ферментів є нестабільними і швидко втрачають свою каталітичну активність, зберігаються, як правило, при низькій температурі;
- 3) розчинні ферменти дуже чутливі до дії різних домішок, які можуть міститися в об'єктах, що аналізуються;
- 4) розчинні ферменти можуть бути використані лише однократно, що також підвищує вартість аналізу.

Для широкого впровадження ферментних методів аналізу в медицину (гуманну і ветеринарну), екологію і технологічне виробництво необхідно було вирішити декілька практично важливих завдань: знайти дешевші і доступні джерела ферментів, підвищити стабільність біокатализаторів, зробити можливим багаторазове використання ферментів. Це досягається методами біотехнології, технічної мікробіології, генної інженерії та інженерної ензимології. Ферменти рослинного і тваринного походження поступово замінюються на мікробні ферменти. Біотехнологи навчилися одержувати «на замовлення» такі штами-мутанти, які синтезують необхідний фермент у десятки і сотні разів більших кількостях, ніж вихідні штами.

Принциповим кроком у розвитку ферментативного аналізу було впровадження в аналітичну практику іммобілізованих ферментів, які мають переваги над розчинними формами:

- 1) багаторазове використання в реакторах періодичної і безперервної дії;
- 2) висока стабільність при зберіганні і в умовах проходження процесу;
- 3) знижена чутливість до дії активаторів та інгібіторів, що підвищує специфічність аналізу;
- 4) простота використання у вигляді готових реагентів;
- 5) можливість проведення послідовних вимірів з одним і тим самим зразком;
- 6) зниження вартості аналізу за рахунок вартості самих ферментів, допоміжних реагентів, особливо кофакторів;

- 7) можливість використання іммобілізованих ферментів у різноманітному обладнанні;
- 8) скорочення часу аналізів;
- 9) збільшення рН і температурного оптимуму дії ферментів.

Для іммобілізації ферментів використовують різноманітні типи носіїв, залежно від конструктивних особливостей обладнання. Наприклад, для ферментних електродів використовуються синтетичні полімери, які утворюють плівку з включеними в їхні пори ферментами. Для автоаналізаторів фотометричного типу перспективними виявилися найлонові трубки, на поверхню яких пришиті ферменти. Такі трубки дозволяють проводити з одним зразком до 10000 аналізів (*Єгоров А.М., 1984*). Для колончастих реакторів ефективні макропористі носії на основі модифікованих кремнеземів.

Перші роботи з аналітичного використання іммобілізованих ферментів належать до середини 60-х років минулого століття. У 1965 р. Дж. Гілболт включив холінестеразу в крохмальний гель, який нанесли на поліуретанову пластинку і використали для виявлення фосфоорганічних пестицидів у повітрі (*Березін І.В. та ін., 1987*). Іммобілізована холінестераза використовується сьогодні в автоматичних датчиках у промислового виробництва інсектофунгіцидів для постійного контролю повітряного середовища цехів.

У 1966 р. Г. Хікс і С. Апдайк вперше використали аналітичні колончасті реактори з ферментами, включеними в поліакріламідний гель. За допомогою глюкозооксидази визначали глюкозу, а лактатдегідрогенази – молочну кислоту. Субстрати пропускали через невеликі колонки об'ємом 1–5 мл. Продукт, який утворюється (H_2O_2 або $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$), досліджували колориметрично. З однією колонкою, тобто з однією порцією іммобілізованого ферменту вдавалося провести десятки і навіть сотні аналізів. Відтоді і розпочалась ера іммобілізованих ферментів у хімічному аналізі. Подальший розвиток робіт у цій сфері відбувався за наступними напрямками.

9.1. АНАЛІТИЧНІ ПРОТОЧНІ РЕАКТОРИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Використання іммобілізованих ферментів відкрило можливість створення проточних аналізаторів, необхідних для контролю технологічних процесів.

Були запропоновані різноманітні реактори з іммобілізованими ферментами – у вигляді колонок, трубок, порожнистих ниток. Для заповнення колонок використовували ферменти, ковалентно зв'язані з носіями – амінованим склом, акриловими полімерами, агарозою або сефарозою, найлоновим порошком, силікагелем, силохромом тощо.

Головною вимогою до носіїв є: здатність зв'язувати найбільшу кількість ферменту (висока місткість), забезпечувати швидке проходження аналізованої суміші через реактор і відсутність сильної неспецифічної сорбції її компонентів на носії, тому що це може призвести до зниження активності ферменту і до збільшення тиску в колонці.

Одним з найкращих носіїв для колончастих реакторів є сефароза, активована бромціаном. На ній успішно іммобілізували не тільки окремі ферменти, але й поліферментні системи. Першою на такому реакторі визначали незамінну амінокислоту – триптофан.

Р. Сандерем (1977) як ферментні реактори використовував найлонові трубки. Внутрішня поверхня була частково гідролізована кислотою, а потім на найлоні був ковалентно іммобілізований фермент. Ці трубки приєднували до автоматичних проточних аналізаторів фірми «Технікон». За допомогою таких реакторів визначали різні метаболіти і ліки в сироватці крові: сечовину, сечову кислоту, амінокислоти, глюкозу, лактозу, мальтозу, пеніцилін та ін.

Оригінальний варіант ферментного реактора запропонували італійські хіміки (*Марконі В. і ін., 1975*). Вони розробили метод включення ферменту всередину порожнистих ниток триацетатцелюлози в момент її формування, тобто в момент витягування нитки з розчину. Фермент опинявся включеним у внутрішню порожнину, куди могли проникати тільки низькомолекулярні субстрати. Ці нитки накручували у вигляді кату-

шок, поміщали у скляну оболонку і через такий ферментний реактор пропускали аналізовану суміш. За допомогою такого методу сьогодні визначається пеніцилін, сечовина, глюкоза й інші речовини.

9.2. ФЕРМЕНТНІ МІКРОКАЛОРИМЕТРИЧНІ ДАТЧИКИ

Для харчової і мікробіологічної промисловості на основі іммобілізованих ферментів розроблені датчики на вуглеводи, які дозволяють проводити їх безперервне визначення.

У 1975 р. К. Мосбах зі співробітниками (Швеція) вперше запропонували використовувати в колонних ферментних реакторах мікрокалориметричний датчик для аналізу метаболітів. Датчик (рис. 9.1) складається із двох ідентичних колонок, заповнених іммобілізованим на склі або сефарозі ферментом. В нижній частині кожної колонки є термістор. Якщо через колонки прокачується буферний розчин, то ніякої реакції не відбувається і різниця температур між двома термісторами дорівнює нулю. Коли в колонку вводиться буферний розчин з аналізованим субстратом, то в результаті ферментативного перетворення останнього виділяється тепло. Температура в цій колонці підвищується. Різниця температур між двома термісторами пропорційна кількості перетвореного субстрату.

Перевагою методу є те, що його можна використовувати для будь-якої ферментної системи, непрозорих середовищ, для реакцій, де не утворюються забарвлені продукти. Чутливість методу дає можливість виявляти мікромольні кількості різноманітних речовин.

9.3. ФЕРМЕНТНІ ЕЛЕКТРОДИ

Це тип ферментних реакторів, у яких фермент і електрод утворюють єдину конструкцію, яка не потребує для їхнього функціонування додаткових реагентів, окрім буферного розчину. Такі електроди одержали назву «безреагентних» датчиків, а методи аналізу, що ґрунтуються на їх використанні називаються «безреагентними». Електроди разом з іммобілізованими ферментами,

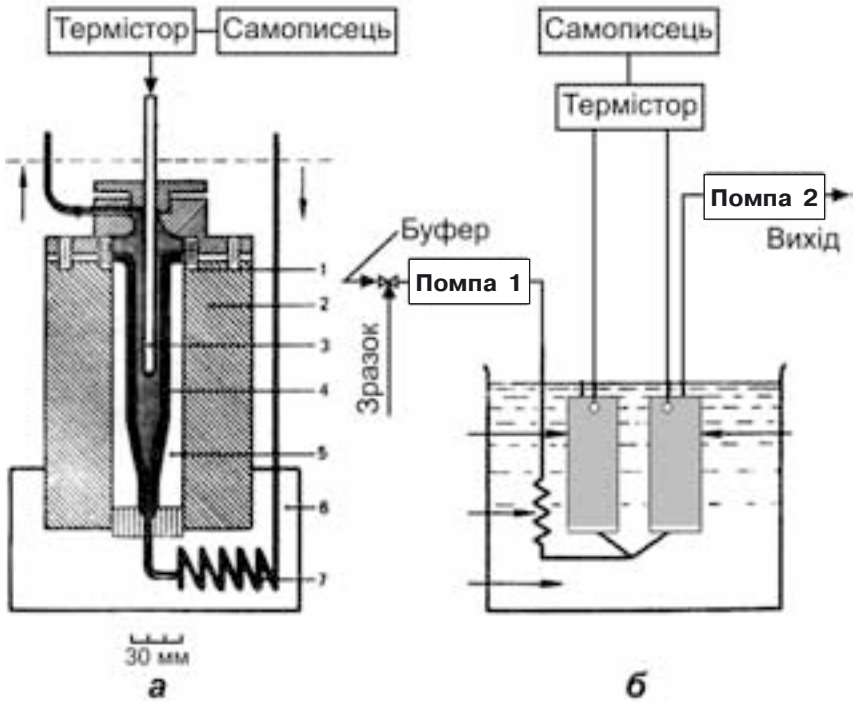


Рис. 9.1. Мікрокалориметричний датчик для аналізу метаболітів за допомогою іммобілізованих ферментів (за Березіним І.В. та ін., 1987):

- а* – пристрій вимірювального блока: 1 – кріплення верхньої і нижньої частини колонки; 2 – металевий блок; 3 – термістор; 4 – мікроколонка, яка заповнена іммобілізованим ферментом; 5 – внутрішня частина блока; 6 – водяна баня; 7 – теплообмінник;
- б* – загальна схема установки: стрілками показано напрям потоку розчину, який аналізується; 1 – колонка з ферментом; 2 – теплообмінник; 3 – колонка порівняння; 4 – водяна баня.

утворюючи єдину конструкцію, являють собою ферментний електрод (рис. 9.2).

Єдина конструкція створюється шляхом розміщення розчинного або іммобілізованого на розчинному носії ферменту в приелектродному шарі, який відділений від решти простору

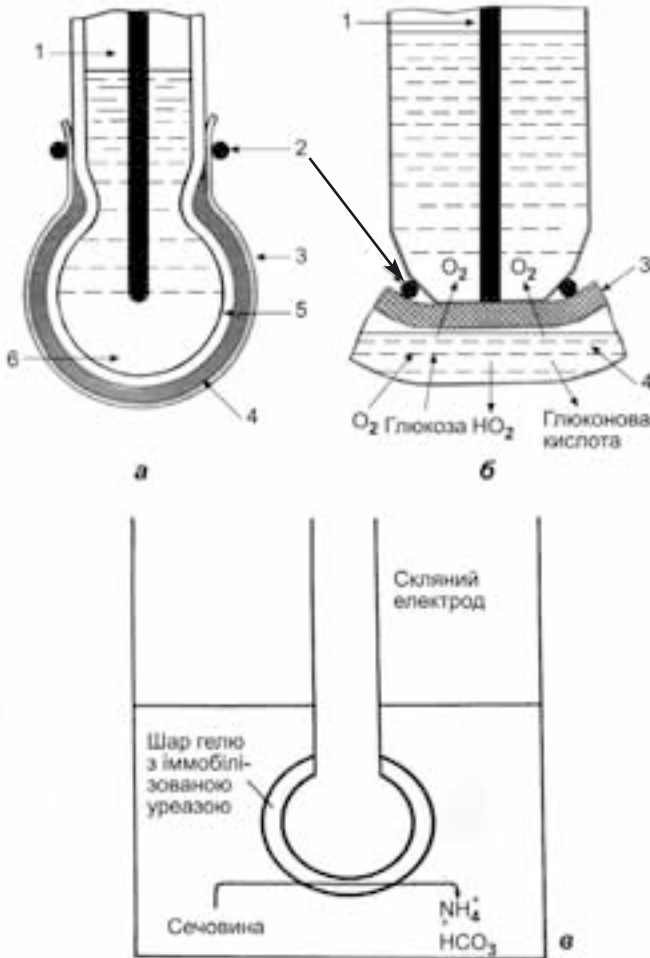


Рис. 9.2. Ферментні електроди (за Березіним та ін., 1987):

а — ферментний електрод на основі скляного електрода для вимірювання рН:
 1 — металевий електрод; 2 — гумове кільце; 3 — діалізна плівка або інша напівпроникна мембрана; 4 — розчин ферменту або шар полімерного гелю, що містить фермент; 5 — скляна мембрана, яка проникна для іонів водню; 6 — приелектродний буферний розчин;

б — схема електрода для визначення глюкози:

1 — катод; 2 — електрод порівняння, який знаходиться у внутрішньому буферному розчині; 3 — напівпроникна полімерна мембрана; 4 — шар іммобілізованої глюкозооксидази;

в — електрод для визначення сечовини; в цьому електроді уреаза іммобілізована в гелі, який нанесений на поверхню скляного електрода.

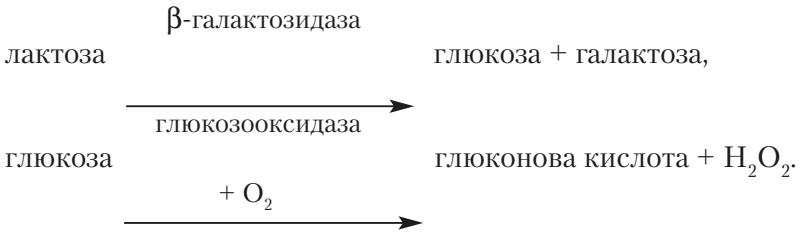
діалізною мембраною. Однак частіше ферменти включають у полімерні або гелеві плівки альбуміну, желатину, колагену, агар-агару, гідроксиду алюмінію або ковалентно приєднують до напівпроникних целюлозних, полікарбонатних мембран чи до поверхні скляних дисків. Потім така плівка (або диск) прикріплюється до поверхні електрода.

У ферментних електродах, як і в інших ферментних аналітичних системах, можуть використовуватися не тільки одноферментні, але й поліферментні системи і навіть клітини мікроорганізмів. В останньому випадку одержують так звані «бактеріальні» електроди. Так, іммобілізовані нітрифікуючі бактерії окислюють аміак з утворенням нітриту киснем, зниження якого вимірюється електродом Кларка. Аналогічні методи були розроблені для визначення метану і інших газів, а також для етанолу, оцтової кислоти, мутагенів. Мікробні електроди прості, селективні, стабільні і можуть використовуватися для контролю забруднення довкілля.

Г. Рехніц у 1977 р. покрити NH_3 -чутливий електрод пастою клітин *Streptococcus faecalis* і за його допомогою визначав аргінін за реакцією дезамінування. Час роботи такого електрода складав 20 діб, а час відповіді – 20 хв. Якщо на електрод наносити попередньо зруйновані клітини, то час відповіді скорочується до 10 хв, а тривалість роботи електрода збільшується до 40 діб.

Потенціометричні ферментні електроди використовуються для визначення амінокислот, сечовини, нітрат- і нітритіонів, пеніциліну. З ферментів у них використовуються оксидази або декарбоксилази амінокислот, уреаза, нітрит- і нітратредуктаза та ін.

Важливим напрямом сучасного ферментативного аналізу є використання мультиферментних систем, у яких один з ферментів забезпечує специфічність реакції, а інший – переведення продуктів цієї реакції у речовину, яка легко детектується (виявляється) фізико-хімічними методами. Наприклад, деякі ферментативні реакції, пов'язані з утворенням перекису водню, можуть використовуватися для фотометричного аналізу разом з пероксидазою. Для визначення різних вуглеводів як універсальний детектор використовується глюкозооксидаза. Наприклад, визначення лактози здійснюються таким чином:



На основі електрода на глюкозооксидазу можуть бути створені електроди на різні вуглеводи (лактоза, цукроза, поліцукри).

9.4. БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ МІКРОАНАЛІЗ

Одним з перспективних методів аналізу є біолоюмінесцентний метод на основі світлячкової і бактеріальної люциферази.

Під час аналізу реєструється світло, яке випромінюється збудженими продуктами реакції, інтенсивність якого за оптимальних умов проведення процесу пропорційна концентрації таких важливих метаболітів або коферментів, як АТФ, НАД · Н₂, Н₂О₂, гемін, ФМН тощо. Висока специфічність цих реакцій стосовно субстратів, високий квантовий вихід (від 0,01 до 1,0) дозволяє аналізувати багато речовин з межею виявлення до 1 фмоль при використанні поліферментних спряжених (поєднаних) реакцій.

У 1976 р. вперше були одержані препарати іммобілізованої люциферази бактерій. У 1977 р. люциферазу світлячків іммобілізували на скляних кульках і на BrCN-сефарозі. Зі скляних кульок були виготовлені стрижні, за допомогою яких визначали 10⁻⁶ моль/л і більш високі концентрації НАД · Н₂ та АТФ. Згодом як носії використовували діалізні плівки, ацетатцелюлозні мембрани, целюлозу і ін. Іммобілізовані люциферази мають в 10–100 разів вищу стабільність, їх можна використовувати багаторазово для визначення АТФ, НАД · Н₂.

На рис. 9.3 показаний аналізатор з колонним проточним реактором, у якому знаходиться ковалентно іммобілізована люцифераза на BrCN-сефарозі для визначення концентрації АТФ. Аналогічний реактор з іммобілізованою біферментною системою бактерій дозволяє визначати мікрокількості НАД · Н₂.

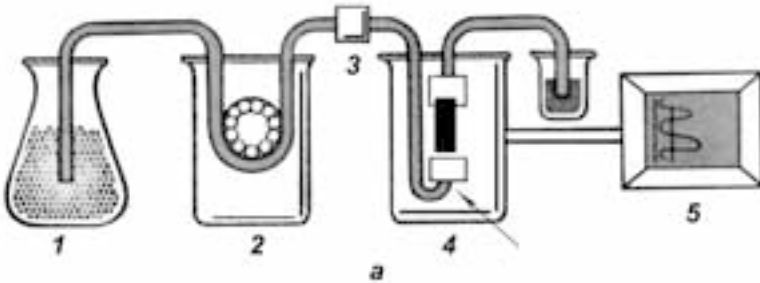


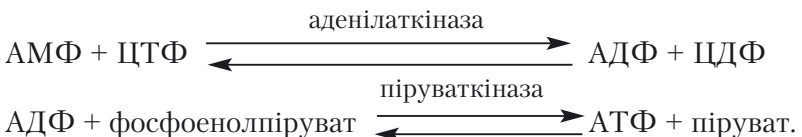
Рис. 9.3. Біоломінесцентний мікроаналіз з колонним реактором
(за Березіним І.В. та ін., 1987):

- a* — схема установки; 1 — розчин субстрату; 2 — перистальтична помпа;
3 — пристрій для введення зразка, що аналізується; 4 — колонка з
імобілізованою люциферазою в кюветному відділі люмінометра;
5 — реєструючий пристрій (самописець або дисплей).

Біоломінесцентним методом сьогодні визначаються багато діагностично важливих біохімічних тестів, у яких визначаваною речовиною є АТФ або НАД · Н₂. Наприклад, підвищення в сироватці крові активності креатинкінази спостерігається при таких важких захворюваннях, як інфаркт міокарда, інсульт або мускульна дистрофія. Біоломінесцентний метод дозволяє встановити активність цього ферменту від 0,1 до 1000 МО (в нормі сироватка містить менше 10 МО креатинкінази). Ферментативний метод аналізу креатинкінази заснований на таких реакціях:



Наприкінці кінці ХХ століття з'явилося чимало робіт з використання в мікроаналізі соімобілізованих поліферментних біоломінесцентних систем. Наприклад, за допомогою триферментної соімобілізованої системи: аденілаткіназа + піруваткіназа + люцифераза світлячків визначають різні аденінові нуклеотиди: АМФ, АДФ і АТФ таким чином:



Потім АТФ вимірюють люциферазою світлячків. При аналізі АДФ, окрім люциферину, беруть субстрат піруваткінази – фосфоенлпіруват, а для визначення АМФ у реакційну суміш вводять цитидинтрифосфат (ЦТФ). Отже, один біокаталізатор, що містить три співіммобілізованих ферменти, використовується для визначення трьох нуклеотидів.

Триферментна система: бактеріальна люцифераза + оксидоредуктаза + форміатдегідрогеназа, що співіммобілізовані на ВrCN-сефарозі, використовуються для визначення НАД в інтервалі концентрації 10^{-12} – 10^{-6} моль/л і форміату з межею виявлення 10^{-12} моль/л. У цьому випадку НАД перетворюється за реакцією:



який вимірюється біолоюмінесцентно.

Великою перевагою співіммобілізованих поліферментних систем є те, що активність співіммобілізованих ферментів зростає у десятки, а іноді в сотні разів порівняно з їх розчинними формами. Певно, при співіммобілізації досягається значно вища локальна концентрація ферментів і продуктів проміжних реакцій на поверхні носія, полегшується дифузія продуктів однієї ферментативної реакції до активного центру іншого ферменту.

Сьогодні 4-, 7- і навіть 13-ферментні співіммобілізовані системи використовуються для біолоюмінесцентного мікроаналізу різних метаболітів: стероїдів, тригліцеридів, жовчних кислот тощо.

9.5. БІОСЕНСОРИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Біосенсори з іммобілізованими ферментами найбільш придатні для вирішення біоаналітичних завдань в медицині (гуманній і ветеринарній), харчовій, мікробіологічній, хімічній промисловості, біотехнології і екології для контролю оточуючого середовища, а також в наукових дослідженнях.

Десятки біохімічних тестів виконуються при постановці діагнозу і для контролю за ходом лікування. Чимало з них ґрунтуються на використанні ферментів, в тому числі іммобілізованих.

Наприклад, ферментний електрод на глюкозу, вмонтований в автоматичну систему, допомагає не тільки контролювати рівень глюкози в крові хворим на діабет, але й корегувати цей рівень, подаючи сигнали на дозатор інсуліну в організм.

У харчовій промисловості ферментні датчики дають можливість визначити якість вихідної сировини і, що дуже важливо, визначити залишкові кількості пестицидів та інших шкідливих речовин. Аналізатори з іммобілізованою холінестеразою, контролюючи склад повітря в хімічних цехах, допомагають забезпечити належні умови праці людей на особливо шкідливих підприємствах.

Контроль за стерильністю зразків є важливим завданням біохімічної, фармакологічної промисловості і медичної мікробіології. Його можна забезпечити аналізатором на основі іммобілізованої люциферази, за допомогою якої можна виявити біolumінесцентним методом 500–1000 клітин в 1 мл.

9.6. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА) І ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ

Серед вимог до сучасних методів біохімічного аналізу найважливішим є специфічність, тобто здатність детектувати (виявляти) дану речовину у складних багатокомпонентних середовищах, таких як сироватка крові, сік рослин або ферментаційне середовище. Найбільшу специфічність мають імунохімічні методи, що ґрунтуються на реакції антитіл з антигеном, які утворюють одне з одним стійкі комплекси.

Сутність будь-якого імунохімічного аналізу зводиться до того, щоб після завершення реакції антиген-антитіло визначити концентрацію надлишкового компонента (антигена або антитіла), який не вступив у реакцію. Оскільки ці концентрації невисокі (10^{-12} – 10^{-8} моль/л), для їх виявлення зазвичай використовують легко детектовану мітку (радіоактивний йод, трітій). Нові можливості були відкриті при використанні ферментів для підвищення чутливості імунохімічних методів аналізу. Виявилося, що без втрати чутливості методу радіоактивна мітка може бути замінена приєднанням ферменту, який після реакції виявляється за його каталітичною активністю.

Поєднання ферментативних та імунохімічних методів аналізу зумовило створення імуноферментних методів аналізу, в яких антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, за допомогою якого **візуалізується** утворення комплексу. В ІФА використовуються різноманітні методи ферментативного аналізу, що визначає її високу специфічність і чутливість.

Принципи імунохімічного аналізу

ІФА – процес утворення кон'югату відомого антитіла і ферменту та наступного приєднання отриманої комплексної сполуки до антигена.

Для проведення ІФА потрібна іммобілізація антитіла або антигена на твердому носії (підкладці) шляхом гідрофобної, електростатичної взаємодії або в результаті ковалентного зв'язування антитіла чи антигена з носієм.

Антитіло, утворюючи комплекс з антигеном, може забезпечити унікальне за специфічністю виявлення речовини в будь-яких складних багатокомпонентних системах. Спочатку основою імуноферментного аналізу була властивість антитіл (Ab) «склеювати» антигени (Ag). Цей процес подається наступною системою рівняння:



Оскільки молекули антитіл є двовалентними, вони здатні зв'язуватися з двома молекулами антигену в комплекс, який, у свою чергу, може зв'язувати інше антитіло і т.д. Утворення таких агрегатів можна виявити за збільшенням помутніння розчину, або за випадінням в осад. Цей підхід використовується, наприклад, для визначення груп крові при «склеюванні» еритроцитів антитілами тієї чи іншої специфічності. Така реакція одержала назву гемаглютинації і досі широко використовується. Взаємодія білкових антигенів з антитілами викликає їх осаджування, тобто преципітацію. Цей метод також широко застосовується при визначенні білків плазми крові в концентрації 10^{-6} г/мл. Але ці методи не можуть забезпечити кількісне визначення речовин. Вони належать до якісних або напівкількісних.

Принципово новий крок був зроблений при використанні в імунохімічних реакціях компонентів, помічених маркером, який детектується одним із відомих фізико-хімічних методів з високою чутливістю.

Визначення концентрації антигену ґрунтується на принципі конкурентного зв'язування антитілами міченого і неміченого антигена. Суть цих методів подається таким рівнянням:



де: Ag^* і Ag – визначуваний антиген з міткою і без мітки;
 Ab – антитіла;
 AgAb і Ag^*Ab – відповідні комплекси.

Для визначення концентрації комплексу Ag^*Ab його потрібно відокремити від вільного міченого антигена Ag^* , або змінити властивості маркера в комплексі з антигеном. Обидва принципи знайшли практичне застосування в методах імунохімічного аналізу.

Маркери в імунохімічному аналізі

Як мітки використовуються різні речовини: радіоактивні ізотопи ^{125}I або ^3H , ферменти або їх субстрати, флуоресцюючі барвники. Від чутливості маркера залежить чутливість методу аналізу. Вибір маркера і способу його «прив'язування» до антигену є одним із важливих етапів у проведенні аналізу.

Радіоактивні мітки. Вперше вони були запропоновані американськими дослідниками (*Берсон С.А., Ялоу Р.С., 1959*) і спочатку мали широке застосування. Однак сьогодні перевага надається маркерам-ферментам. Це зумовлено труднощами, пов'язаними з використанням ізотопних маркерів. Це складність і висока вартість обладнання, необхідність централізованої системи розподілу імунохімічних наборів, мічених радіоактивними ізотопами та небезпека ізотопів для навколишнього середовища. Тому були запропоновані маркери-ферменти.

Ферментні мітки. З відомих нині понад 2000 різних ферментів, тільки деякі використовуються в імуноферментному аналізі. Це пояснюється високими вимогами, які висуваються до властивостей ферментів-маркерів. Фермент має бути високоактивним, а продукти його реакції виявлятися з високою чутливістю; стабільним, щоб активність його зберігалася протягом року; вміст ферменту-маркера у досліджуваному зразку має бути мінімальним. Через це для різних об'єктів використовуються різні ферменти. У багатьох випадках, коли необхідний якісний резуль-

тат, оцінка імунохімічної реакції може бути проведена візуально.

Субстратні мітки. Крім ферментів, як маркери можуть використовуватися субстрати. Зокрема, часто використовуються як мітки АТФ і НАД, що можуть бути «пришиті» до молекули антигену через аденіновий залишок таким чином, що зберігається їх здатність взаємодіяти з ферментом. Аналогічно були використані субстрати пероксидази (люмінол, ізолюмінол).

Одержання кон'югатів з ферментами

Для введення ферментної мітки розроблено багато різних хімічних, біохімічних та імунологічних способів. Першим реагентом, який використовувався для синтезу імуноферментних кон'югатів, був глутаровий альдегід, що реагує з аміногрупами лізину білкових молекул. За його допомогою були одержані кон'югати антитіл і антигенів з пероксидазою, лужною фосфатазою, глюкооксидазою, глюкоамілазою. Склад одержаних кон'югатів можна варіювати, змінюючи концентрацію альдегіду і білкових компонентів.

З водонерозчинних карбодіімідів найбільш успішно для синтезу кон'югатів використовуються 1-етил-3-(3-діметиламінопропіл) карбодіімід і 1-циклогексил-3-(2-морфоліноетил) карбодіімідметил-п-толуолсульфонат, які утворюють пептидний зв'язок між вільними карбоксильними і NH_2 -групами білкових компонентів.

Широкого розповсюдження набув метод синтезу імунопероксидазних кон'югатів, в основі якого лежить окислення перйодатом натрію вуглеводної частини молекули пероксидази з утворенням альдегідних груп.

Розроблені методи одержання імуноферментних кон'югатів з β -галактозидазою, що містить до 20 SH-груп. Вони базуються на тому, що зв'язування через них антигенів не відображається на каталітичних функціях ферменту.

Враховуючи те, що ферменти з великою молекулярною масою можуть інгібувати реакцію антиген-антитіло за рахунок стеричного екранування антигенних детермінант, у деяких випадках доцільно використовувати як мітки не цілу молекулу ферменту, а пептид, який має специфічну активність. Такий синтез здійснювався при одержанні кон'югата Fab-фрагмента з гемоктапептидом, що має пероксидазну активність.

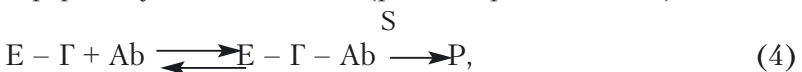
Ковалентні методи одержання імуноферментних кон'югатів широко розповсюджені, однак у деяких випадках дія зшиваючого реагента негативно впливає на ферментативну та імунологічну активність компонентів гібридної макромолекули.

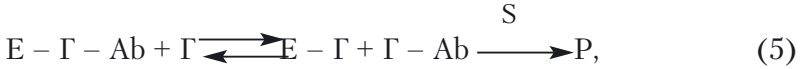
У зв'язку з цим певний інтерес викликають імунологічні методи введення ферментної мітки – це метод «гібридних антитіл». Гібридомна технологія відкриває принципово новий шлях одержання гібридних антитіл. Він полягає в тому, що зливаються моноклональні клітини, специфічні проти даного антигену і ферменту-маркера, в результаті чого утворюються гібридами другого покоління, які синтезують антитіла з двома специфічностями.

Розділення вільних і зв'язаних маркерів

Одним із важливих моментів у проведенні імуноферментного аналізу є розділення вільних і зв'язаних з антитілами мічених компонентів. Найбільш розповсюдженим є метод, заснований на іммобілізації антитіл на твердій підкладці (стінки полістирольних пробірок або кульок, целюлозні диски, гранули макропористих носіїв для хроматографії). Особливо перспективними є полістиролові пробірки або планшети, що містять 96 лунок. Суть методів розділення полягає в тому, що одні з компонентів, наприклад, антитіла, можуть бути сорбційно іммобілізовані на поверхні вимірювальної кювети. Після проведення інкубації зі зразком антиген сорбується на поверхні, а всі інші компоненти залишаються в розчині і можуть легко відділитися, наприклад, за допомогою пористих частин під дією магнітного поля. Основні проблеми, які виникають при реалізації твердофазових методів розділення, є стандартизація поверхні і зменшення неспецифічного зв'язування мічених компонентів з носієм.

Інший шлях розділення мічених і немічених компонентів ґрунтується на принципі модуляції активності ферментів антитілами. При взаємодії антитіл з гаптенем, «пришитим» поблизу активного центру ферменту, відбувається повне інгібування його активності. При додаванні до такої системи вільного гаптена відбувається дисоціація комплексу, в результаті чого активність ферменту відновлюється (рис. 9.4, рівняння 4, 5):





де: E- Γ – комплекс ферменту (E) з гаптенем (Γ);

Ab – антитіло;

S – субстрат;

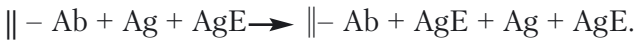
P – продукт ферментативної реакції.

Ці методи одержали назву гомогенного аналізу.

Методи імуноферментного аналізу (ІФА)

Методи ІФА поділяються на дві великі групи: твердофазові і гомогенні.

При **твердофазових** методах, які одержали назву ELISA (enzyme linced immunosorbent assy), використовується принцип іммобілізації одного із компонентів (антигену Ag або антитіла Ab) на твердому носії (підкладці) шляхом гідрофобної, електростатичної взаємодії. Як носій найчастіше використовують полімерний матеріал. Речовина, що визначається (антитіло чи антиген), відповідно конкурує з аналогічними речовинами, в які введений фермент-маркер, за зв'язування на сорбенті:



Після видалення речовин, які не прореагували, визначається концентрація ферменту, що зв'язався з носієм.

У системах твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) антигенів (рис. 9.5) можна виділити декілька основних методів (варіантів).

1. Прямий конкурентний метод – антитіла, іммобілізовані на твердій фазі (носії), а мічений і немічений антигени, додані одночасно, конкурують один з одним за зв'язування (рис. 9.5, а).
2. Метод послідовного насичення – спочатку з антитілами інкубують зразок, а потім після видалення компонентів, які не зв'язалися, додають мічений антиген. Використовується у випадку, коли досліджуваний зразок може впливати на маркер, або якщо константи зв'язування обох компонентів з антитілами різні (рис. 9.5, б).
3. Метод інгібування з використанням подвійних антитіл. Базується на конкуренції вільних антитіл з антигеном, який попередньо іммобілізований на носії, і антигеном, що визначається і знаходиться у розчині (рис. 9.5, в).

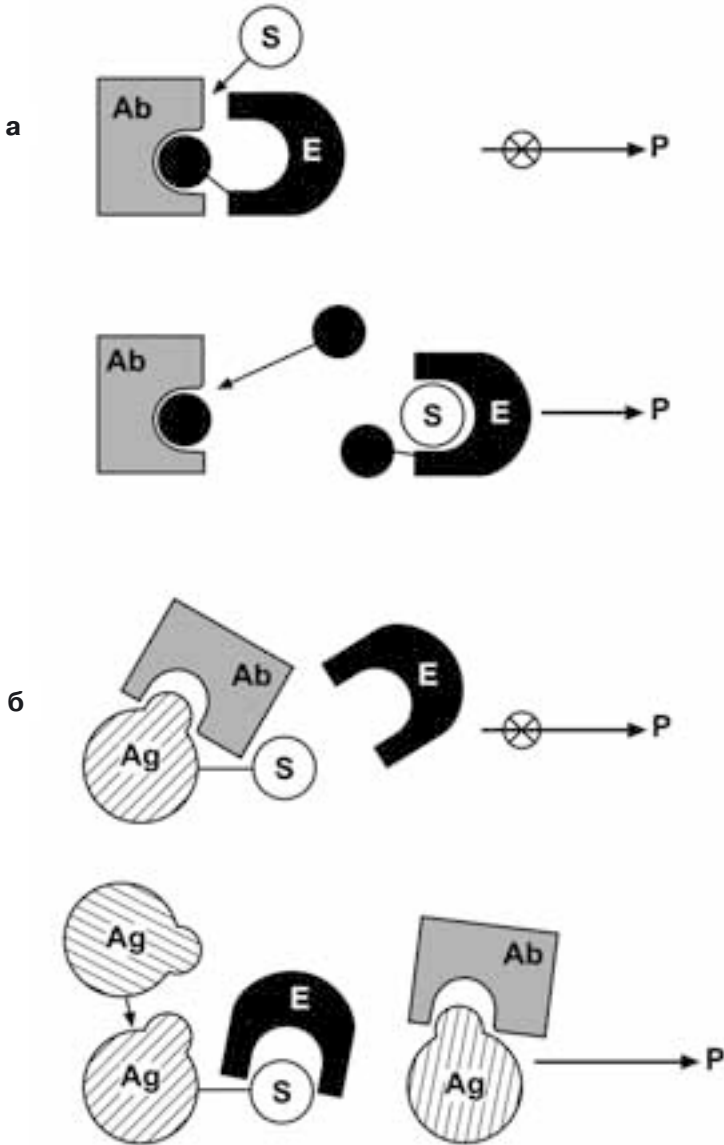


Рис. 9.4. Принципові схеми гомогенних методів імуноферментного аналізу (за Березнім І.В. та ін., 1987):

а–Г – вільний гаптен; Е–Г – мічений ферментом гаптен; Ab – антитіла;
 S і P – субстрат і продукт ферментної реакції; б – Ag–S – мічений субстратом антиген; Ag – вільний антиген; Е – фермент; P – продукт ферментної реакції; символ х – інгібування ферментної реакції.

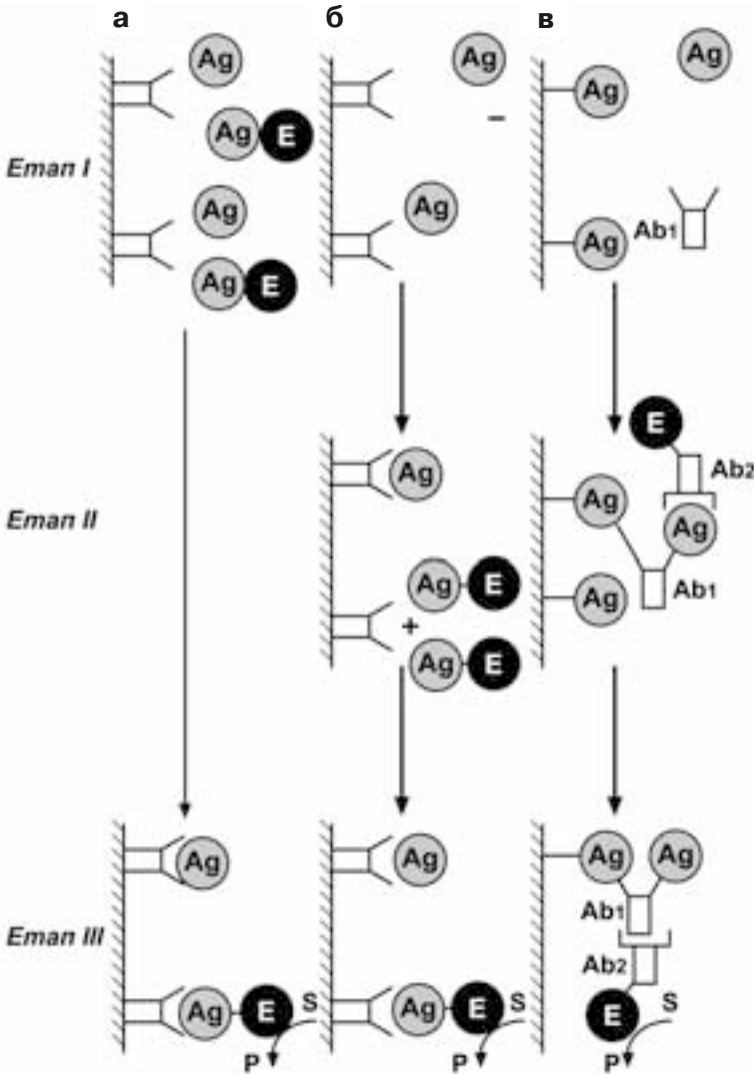


Рис. 9.5. Схеми конкурентних методів твердофазового аналізу (за Березіним І.В. та ін., 1987):

а – прямий конкурентний метод; б – метод послідовного насичення; в – метод інгібування з використанням подвійних антитіл;

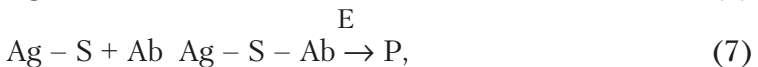
Ab1 – Ag – антитіла і антигени, які адсорбовані на носії; Ag-E і Ag – мічений ферментом і вільний антиген; Ab-E – другі антитіла, які мічені ферментом; S і P – субстрат і продукт ферментної реакції; стадії I і II – інкубація з наступним відмиванням компонентів, що не зв'язалися; стадія III – додавання субстрату і детекція ферментної активності.

Гомогенні методи аналізу ЕМІТ (enzyme multiplay immuno-technic) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, ліків, гормонів, фізіологічно активних речовин. Суть методів полягає в тому, що гаптен пришивається ковалентно поблизу активного центру ферменту таким чином, що після його взаємодії з антитілом молекула ферменту втрачає свою каталітичну активність.

Додавання до цієї системи вільного гаптену приводить до пропорційного збільшення активності ферменту внаслідок витіснення антитіл із комплексу. Принципові схеми гомогенних методів імуноферментного аналізу наведені на рис. 9.4.

Як ферменти в таких системах використовуються лізоцим, малатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; як субстрати – кофактори. Певно, при утворенні комплексу фермент-гаптен з антитілом, останній так змінює конформацію білкової глобули, що кофактор не може продуктивно зв'язуватися з активним центром ферменту, в результаті чого його активність зникає.

Антигени, мічені субстратами і кофакторами, також знайшли застосування в гомогенних методах ІФА. Суть цих методів (рівняння 6, 7, 8) полягає в тому, що при взаємодії міченого антигену з антитілами субстрат стає недоступним для дії ферменту, внаслідок чого продукт ферментативної реакції не накопичується в системі (рис. 9.4, б):



де: $\text{Ag} - \text{S}$ – комплекс антигену з субстратом.

Отже, утворення комплексу $\text{Ag}-\text{Ab}$ може відбутися в розчині без спеціального розділення вільних і зв'язаних компонентів безпосередньо в пробірках.

Гомогенний аналіз на основі біоломінесценції (ЛІКА). При ньому маркером є молекула АТФ, яка пришта до інсуліну. Додавання антитіл проти інсуліну призводить до екранування молекули АТФ і її недоступності для світлячкової люциферази.

Аналогічний підхід був використаний для застосування як

маркера НАД. У цьому випадку детектуючою системою слугувала алкогольдегідрогеназа печінки коня, за допомогою якої в системі внутрішньої регенерації можна визначити до 10^{-7} М інсуліну.

Особливістю гомогенних методів є простота й експресність – час аналізу займає декілька хвилин (до 15 хв), тому що в них відсутні дифузійні ускладнення імунохімічної реакції, характерні для твердофазових методів аналізу.

Метод широко застосовується при визначенні гормонів, барбітуратів, антиепілептичних засобів та ін.

Використання ІФА

Серед різних напрямів розробки ІФА неабиякий інтерес викликає створення методів, які дозволяють в одному зразку визначити декілька речовин. Наприклад, при діагностиці вірусного гепатиту важливим є одночасне визначення декількох антигенів, що дає можливість визначити стадію інфекційного процесу. Використання суміші антитіл, мічених різними ферментами, – один із шляхів, який дає можливість вирішити проблему.

Методи ІФА знайшли широке розповсюдження у медицині (гуманній і ветеринарній), контролі технологічних процесів і якості біотехнологічної, фармацевтичної, харчової продукції та наукових дослідженнях.

У медичній діагностиці методи ІФА використовуються для виявлення мікробних та вірусних збудників і антитіл проти них, а також збудників паразитарних інфекцій (гельмінти, малярійний плазмодій та ін.), що мають складний і мінливий антигенний склад.

Методи ІФА широко застосовуються і в діагностиці неінфекційних захворювань, таких як діабет, рак, серцево-судинні й ендокринні захворювання.

Методи гомогенного ІФА використовуються для контролю лікарської терапії, особливо препаратів, які впливають на серцево-судинну систему, антибіотиків, психотропних речовин. Ці методи дають можливість швидко виявляти отруєння, наявність наркотиків і допінгових препаратів у організмі.

У ветеринарній практиці метод ІФА найчастіше застосовують для виявлення антитіл вірусу ящуру, хвороби Ауескі, африканської чуми свиней, чуми великої рогатої худоби, ротавірусної та коронавірусної інфекцій, для оцінки ефективності вакцинації, а також при епізоотичному обстеженні тварин. Методи ІФА вважаються особливо ефективними при виявленні

невідомих, важко культивованих і таких збудників, що дуже складно виявляються в лабораторних умовах, а також для розпізнавання маловідомих хвороб.

Можливість візуального виявлення комплексу антигілофермент, чому сприяє утворення кольорового продукту ферментної реакції під час розщеплення певного субстрату, робить цей метод доступним для застосування у виробничих лабораторіях. Можливість експрес-діагностики окремих захворювань дає змогу проводити досліді на великому поголів'ї.

Налагоджено випуск антивидових мічених ферментами анти-тіл до глобулінів кролів, мишей, свиней, великої рогатої худоби, а також створені тест-системи для виявлення вірусних антигенів і вірус-специфічних антитіл, що створило сприятливі умови для впровадження методів ІФА у ветеринарну практику.

У зв'язку з інтенсивним розвитком промислової біотехнології методи ІФА дедалі ширше застосовуються для контролю технологічних процесів і якості біотехнологічної продукції. Так, у мікробіологічних виробництвах методи ІФА використовуються для швидкого виявлення високоефективних мікроорганізмів-продуцентів різних фізіологічно активних речовин (ферментів, антибіотиків та ін.), контролю наявності сторонніх мікроорганізмів і бактеріофагів у ферментерах, для визначення забруднення повітря промислових приміщень на наявність шкідливих речовин, які викликають професійні захворювання обслуговуючого персоналу.

Важливими є методи ІФА при виробництві лікарських препаратів, в тому числі із сировини тваринного походження і донорської крові. Домішки супутніх речовин або вірусних антигенів можуть бути дуже шкідливими для організму. Важливим є виявлення у донорській крові вірусу гепатиту В, білкових домішок у препаратах інсуліну тощо.

У наукових дослідженнях імуноферментний аналіз застосовується як у традиційних сферах біохімічних досліджень, так і в нових, пов'язаних з розробкою методів генетичної і клітинної інженерії. Наприклад, одержання гібридом цілком базується на використанні ІФА при клонуванні клітин. При генно-інженерних роботах ці методи дозволяють швидко відбирати клони-продуценти.

Методи ІФА ефективні при вирішенні фундаментальних проблем онкології, вірусології, біохімії, фізіології тощо.



Контрольні питання

1. Які передумови використання ферментів у аналітичній роботі?
2. Яка особливість сучасних підходів до створення біохімічних методів аналізу на основі ферментів?
3. Які переваги мають іммобілізовані ферменти над розчинними у ферментативних методах аналізу?
4. Які є носії для іммобілізації ферментів з їх наступним використанням в аналітичній роботі і від чого залежить вибір такого носія?
5. Які обставини стали передумовою використання іммобілізованих ферментів у хімічному аналізі?
6. Який вигляд мають аналітичні проточні реактори? Де вони застосовуються?
7. Які носії використовуються в аналітичних проточних реакторах і яким вимогам вони мають відповідати?
8. Що таке ферментні мікрокалориметричні датчики і для чого вони розроблені?
9. Що є перевагою ферментних мікрокалориметричних датчиків?
10. Що таке ферментні електроди і як вони створюються?
11. Де використовуються ферментні електроди?
12. На чому базується біолоюмінесцентний метод мікроаналізу?
13. Які носії використовуються для іммобілізації ферментів і поліферментних систем?
14. В яких галузях застосовуються біосенсори з іммобілізованими ферментами?
15. На чому базуються методи імуноферментного аналізу (ІФА)?
16. Які маркери (мітки) використовуються в ІФА?
17. Які недоліки мають радіоактивні мітки?
18. Якими властивостями мають бути наділені ферментні маркери?
19. Які субстратні мітки найчастіше використовуються?
20. Які є способи введення ферментної мітки (або одержання кон'югатів з ферментами)?
21. Як проводиться розділення вільних і зв'язаних маркерів?
22. За яким принципом класифікуються методи ІФА?
23. Які особливості мають твердофазні методи?
24. Суть гомогенних методів ІФА і для визначення яких сполук вони використовуються?
25. Які особливості має гомогенний аналіз на основі біолоюмінесценції (ЛІКА)?
26. Де використовуються методи ІФА?

ЗАСТОСУВАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

10.1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕТВОРЕННЯ КРОХМАЛЮ НА ГЛЮКОЗУ

Глюкоза використовується як вихідна сировина для виробництва глюкозофруктозних сиропів, в органічному синтезі для одержання амінокислот і вітамінів, а також у медицині. Для одержання глюкози використовується дешева і доступна сировина – крохмаль.

Утворення глюкози з крохмалю – це двоступінчастий процес. На першому етапі під дією α -амілази з крохмалю утворюються декстрини невеликої молекулярної маси (олігоцукристі фрагменти) і певна кількість мальтози. На другому етапі під дією ферменту глюкоамілази від олігоцукристих фрагментів відщеплюються кінцеві залишки глюкози.

Для промислового виробництва α -амілазу одержують шляхом мікробного синтезу продуцентами *Bacillus subtilis*, грибами *Aspergillus niger* і *A. oryzae*. Для *B. subtilis* сполученням методів мутагенезу і селекції з методами генетичної інженерії було отримано штам, здатний до надсинтезу α -амілази, вихід якої у 200 разів перевершував вихідні форми. Доведено, що вихід цукристих речовин збільшується при підвищенні температури процесу гідролізу крохмалю. Японські дослідники отримали термостабільну α -амілазу шляхом введення в сінну паличку гена, який контролює синтез цього ферменту.

Перспективними продуцентами глюкоамілази є гриби з родин *Rhizopus*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, а також бактерії із родин *Aerobacter*, *Clostridium*.

Технологічна схема одержання глюкози:

1. Желатинізація крохмалю при нагріванні (62–72 °С).
2. Декстринізація крохмалю за допомогою бактеріальної α -амілази (80–110°, рН 6,5–6,7).

3. Оцукрення декстринізованого крохмалю за участю грибної глюкоамілази (50–60°, рН 4–5). Одержання крохмальної патоки різного вуглеводного складу.

4. Очищення та одержання глюкозних сиропів. Кристалізація глюкози.

Лімітуючою ланкою у біотехнологічному процесі є третя стадія, проблема якої полягає в одержанні іммобілізованого препарату глюкоамілази, який би зберігав стабільність при параметрах технологічного процесу.

Процес одержання іммобілізованої α -амілази поки що не стоїть на порядку денному, тому що низька її вартість не викликає необхідності проведення регенерації ферменту.

У 1970–1980 рр. фірма «Корнінг Глас» продемонструвала першу пілотну установку з використанням глюкоамілази, іммобілізованої шляхом ковалентного приєднання до поверхні макропористого кремнезему. У реакційну колону висотою близько 2 м і діаметром 15 см подається 30% розчин частково гідролізованого крохмалю (декстрини), який протягом 9-хвилинного контакту з іммобілізованою глюкоамілазою перетворюється на глюкозний сироп. Для порівняння: час контакту розчинної глюкоамілази з декстринами для одержання глюкози – 724 хв. Протягом 80 днів роботи установки при 40 °С іммобілізована глюкоамілаза практично не інактивується. Однак до сьогодні промисловий процес одержання глюкози з використанням гетерогенного біокатализатора не реалізований.

Основними перешкодами на шляху промислового освоєння процесу створення технології крупнотоннажного виробництва глюкозних сиропів за участю іммобілізованої глюкоамілази були такі обставини. По-перше, недостатньо висока стабільність одержаних препаратів іммобілізованої глюкоамілази при температурі пастеризації (60–65 °С); по-друге, зниження виходу глюкози на 7–10 % (90–93 %) при використанні іммобілізованого ферменту порівняно з нативним, який забезпечує конверсію крохмалю в глюкозу на рівні 98 %. Технологія може бути поставлена на комерційну основу за умови одержання стабільних препаратів з періодом інактивації тривалістю 3–4 тижні. Промислової установки з перетворення крохмалю у глюкозу з застосуванням іммобілізованої глюкоамілази поки що немає.

В результаті досліджень останнього десятиріччя з іммобілізації глюкоамілази на неорганічних матеріалах розроблені біокатализатори з досить високою стабільністю іммобілізованої глюкоамілази (табл. 10.1). Глюкоамілаза, іммобілізована на попередньо оброблених частинках кістки свині, зберігала практично повністю первинну активність протягом 700 год роботи при температурі 37°. На носіях, поверхня яких покрита каталітичним волокнистим вуглецем (КВВ), іммобілізована глюкоамілаза мала найбільшу стабільність. Активність іммобілізованого ферменту зростала на порядок порівняно з його активності у розчині. Іммобілізована глюкоамілаза не втрачала каталітичної активності через 1–1,5 роки зберігання при кімнатній температурі. Використання макроструктурованих КВВ-містких носіїв дозволило виготовити ефективні гетерогенні біокатализатори складної геометричної форми (сотові моноліти, пористі пеноматеріали), які мали високу стабільність і активність у процесі оцукрення крохмалю. При періодичному функціонуванні при 50 °С протягом 8–8,5 міс. ці біокатализатори практично повністю зберігали ферментативну активність.

Традиційно в біотехнологічному процесі одержання глюкози з крохмалю використовуються проточні біореактори з розміщенням гетерогенного біокатализатора у вигляді нерухомого шару. Останнім часом розроблений принципово новий тип біокаталітичного реактора – роторно-інерційний біореактор (РІБ) на рівні лабораторного зразка (Коваленко Г.А. та ін., 2004). Його основним функціональним елементом є контейнер з закріпленим гетерогенним біокатализатором, який обертається навколо своєї осі (рис. 10.1). Частота обертів контейнера складає від 3 до 170 об./хв; загальний об'єм контейнера – 1,2 л; об'єм біокатализатора становив 360 м³. Температура в біореакторі підтримувалася на рівні 50–55 °С. Біокатализатор отримували шляхом адсорбційної іммобілізації глюкоамілази на вуглецевовмісній пенокераміці.

Випробування показали, що біореактор нового типу (РІБ) в оптимальних умовах роботи (частота обертів контейнера не менше 80 об./хв, швидкість подачі субстрату не більше 0,2 л/год) в 1,5–2 рази ефективніший за продуктивністю, ніж традиційний реактор з нерухомим шаром. Активність біокатализатора в 3–3,5 рази вища, ніж у традиційному реакторі.

Таблиця 10.1.

*Глюкоамілаза, іммобілізована на різних носіях
(за Коваленко Г.А. та ін., 2002)*

<i>Носій / спосіб іммобілізації</i>	<i>Стабільність</i>	<i>Тип реактора</i>	<i>Конверсія субстрату, % субстрат</i>
<i>Роботи 70–80 рр. XX ст.</i>			
Пористе скло / ковалентне зв'язування	Деактивація через 300 год безперервної роботи при 37–60 °С	Проточний з нерухомим шаром гранул біокатализатора	до 30 (хрохмаль)
Алюмогель, оксид алюмінію / ковалентне зв'язування, поперечна зшивка ГА*	269–417 дб при 50 °С та 300 год при 60 °С	Проточний з шаром гранул біокатализатора	92–93 (хрохмаль)
Активоване вугілля / адсорбція, поперечна зшивка ГА*	36 год без втрати активності; 1 міс. при 30 °С зберігається 80% активності	Періодичний з перемішуванням	– (мальтоза)
<i>Роботи останнього десятиріччя</i>			
Магнітні частинки, покриті поліетиленіміном/ковалентне зв'язування	2 тижні, 50 °С, зберігається 96% активності	Проточний з шаром біокатализатора	71
Кісткова тканина, оброблена хрохмалем / поперечна зшивка ГА*	700 год безперервного гідролізу при 37 °С без втрати активності	Періодичний з перемішуванням	95 (хрохмаль)
Полістеренові магнітні частинки / адсорбція	11 год роботи без втрати активності	Проточний з шаром біокатализатора	– (мальтоза)
Активоване вугілля / адсорбція	2 тижні без втрати активності	Проточний колонічний з нерухомим шаром гранул біокатализатора	10 (декстрини)
Кістковий порошок / адсорбція	Після 20 циклів роботи конверсія субстрату знизилася на 3%	–	98 після 11 циклів (хрохмаль)
КВВ-вмістні керамічні носії	40 год роботи без втрати активності	Проточний реактор на основі сотового моноліту	70 (хрохмаль)

* ГА – глутаровий альдегід.

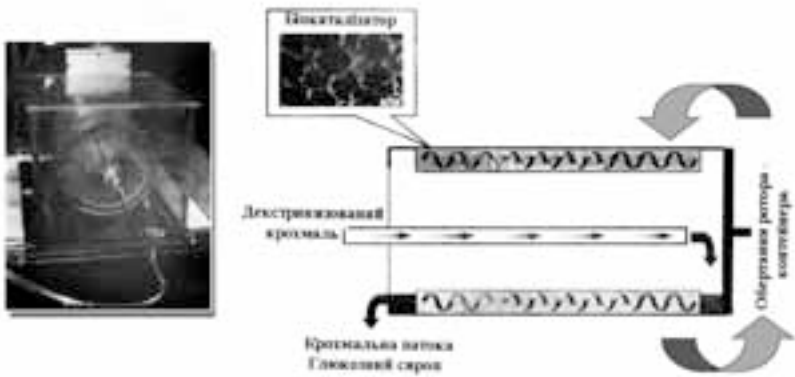


Рис. 10.1. Роторно-інерційний біореактор для гетерогенних біокаталітичних процесів (Коваленко Г.А. та ін., 2004)



Контрольні питання

1. Де використовується глюкоза як вихідна сировина?
2. Які особливості технологічного процесу отримання глюкози із крохмалю і що є лімітуючим у біотехнологічному процесі?
3. Які біокаталізатори використовуються при одержанні глюкози і способи їх отримання?
4. Які суттєві проблеми має біотехнологія перетворення крохмалю на глюкозу?

10.2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ СИРОПІВ З ВИСОКИМ УМІСТОМ ФРУКТОЗИ

Фруктоза (фруктовий, плодовий чи медовий цукор) широко розповсюджена в природі, міститься у багатьох фруктах і плодах. Особливо багаті на неї яблука, а також бджолиний мед, який майже наполовину складається із фруктози. Порівняно зі звичайним цукром (до складу молекул якого фруктоза теж входить, але у вигляді хімічної сполуки з менш солодкою глюкозою) фруктоза має більш приємний смак, і згідно з професійною термінологією смак фруктози – «медовий», а звичайного цукру – нудно-солодкий.

Фруктоза в 1,65 раза солодша за сахарозу і більш ніж у 2,2 раза солодша глюкози, що відповідно зменшує її споживання, а це, в свою чергу, призводить до зниження калорійності продукту. Це дуже важливо з точки зору дієтології харчування. Крім того, фруктозу на відміну від глюкози чи цукру можуть споживати хворі на діабет. Фруктоза в суміші з глюкозою не кристалізується (не зацукрується), що важливо для виробництва морозива, кондитерських виробів тощо.

Сироп з високим умістом фруктози застосовується для виготовлення тонізуючих і ацидофільних напоїв, морозива, кондитерських виробів, консервованих фруктів та інших продуктів. Отже, підвищення солодкості сиропів за рахунок збільшення в них фруктози, потенційним джерелом якої може бути глюкоза, має практичне значення. У світі були розпочаті спроби пошуку ефективних методів одержання цього продукту.

Солодкі фруктозні сиропи можна отримувати **із цукрози** шляхом кислотного гідролізу (сірчаною, лимонною кислотами, рідше соляною при підвищеній температурі), або більш ефективним ферментативним способом – інверсією за допомогою ферменту інвертази (сахарази). Під дією інвертази із цукрози утворюється суміш D-глюкози і D-фруктози.

Здатність до біосинтезу інвертази мають багато мікроорганізмів, але найбільш вивченою групою серед них є дріжджі і зокрема *Sacharomycetes cerevisiae*. Останнім часом одержані результати, які свідчать проте, що дріжджі *K.marxianus* синтезують інвертазу, активність якої у 2–3 рази вища, ніж *S. cerevisiae* (Жеребцов Н.А. та ін., 2003).

У біотехнологічному процесі одержання інверту використовується інвертаза, іммобілізована на різноманітних носіях органічної і неорганічної природи.

Біокаталізатором у пілотній установці фірми Snam Progetti для безперервного процесу інверсії сахарози є дріжджова інвертаза, яка іммобілізована шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Біокаталізатор має високу стабільність. За 10 років роботи при температурі 25 °С він втратив лише 20 % своєї первинної активності.

Включення інвертази у поліакриламідний гель дає можливість отримати біокаталізатор, який має високу стабільність при температурі 30°– за 450 діб безперервної роботи активність інвертази зменшилася лише на 10 %.

Індійська національна корпорація NRDC розробила промисловий процес інверсії цукру, біокаталізатором якого є дріжджові клітини, іммобілізовані на неорганічному носії.

Коваленко Г.А. та ін. (2003) одержали високостабільний гетерогенний біокаталізатор для процесу інверсії цукру шляхом адсорбційної іммобілізації інвертази на керамічних носіях, покритих каталітичним волокнистим вуглецем (КВВ).

Інвертний цукор кристалізується порівняно з сахарозою повільніше, тому його використовують при виготовленні продуктів, в яких кристалізація цукру є небажаною, наприклад, при виробництві напіврідких начинок цукерок, а також лікерів, штучного меду, сиропів.

Більш перспективним є шлях одержання фруктози **із глюкози**, яка утворюється в результаті гідролізу крохмалю.

Відомо, що глюкозу можна перетворити на фруктозу ферментативним шляхом за участю ферменту глюкоїзомеразу як розчинної, так і іммобілізованої. У промисловості глюкоїзомеразу використовують винятково в іммобілізованій формі. Комерційні препарати іммобілізованої глюкоїзомеразу отримують різноманітними способами іммобілізації: адсорбцією ферменту на різних носіях (іонообмінних смолах і пористих неорганічних носіях); висушуванням цілих клітин продуценту, коли внутрішньоклітинний фермент залишався зв'язаним з клітиною; ковалентним зв'язуванням глюкоїзомеразу на органічних і неорганічних носіях; включенням в гель і нитки; включенням в гель з подальшою

зшивкою. В табл.10.2 наведені способи іммобілізації найбільш розповсюджених промислових препаратів глюкоїзомераз.

Таблиця 10.2.
Промислові препарати іммобілізованої глюкоїзомераз
(за Нахаетян Л.А., Меняйловою Л.Л., 1988)

Фірма (країна)	Назва препарату	Продукт	Метод іммобілізації
Novo Industri (Данія)	Sweet-zyme	Bacillus coagulans	Руйнування клітин, зшивка глутаровим альдегідом
Gist Brocades (Нідерланди)	Maize-zyme	Actinoplanes missouriensis	Зшивка глутаровим альдегідом клітин, змішаних з желатином
Miles Kall-Chemie (США – Німеччина)	Optis-weet 22	Streptomyces rubiginosus	Ковалентне зв'язування з кремнеземним носієм розчинного ферменту
ICI (Великобританія)	Immobilase	Arthrobacter species	Включення цілих клітин у сітку із полікатионів і аніонів
Nagase (Японія)	Sweetase	Streptomyces phaeochromogenes	Висушування цілих клітин
Roquette Freres (Франція)	Lysase	Streptomyces violaceoniger	Зшивка глутаровим альдегідом клітин, змішаних з желатином
Suomen Sokeri (Фінляндія)	Spezyme	Streptomyces rubiginosus	Зв'язування розчинного ферменту іонообмінною адсорбцією на композиційному носії із DEAE-целюлози, полістиролу і двоокису титану

Незважаючи на всі переваги фруктози над цукром, її виробництво у світі практично було відсутнє до середини 60-х років минулого століття.

У 1966 р. в Японії вперше застосували розчинний препарат глюкоїзомераз для виробництва сирупу з високим вмістом фруктози. Отриманий продукт містив 42 % фруктози, 50 – глюкози і 8 % інших цукрів.

У 1973 р. в США компанією «Клінтон Корн» вперше було розпочато промислове виробництво сирупів з високим вмістом

фруктози, але використовували для цієї мети не розчинну глюкоїзомеразу, як японці, а іммобілізований на целюлозному іонообміннику фермент у реакторі з плоским шаром.

Наукові основи процесу наступні. Фермент глюкоїзомераза каталізує перетворення (ізомеризацію) глюкози до фруктози за одну стадію, і реакція відбувається до тоді, доки в реакційній системі кількість глюкози і фруктози не стане майже однаковою. Після цього реакція припиняється і одержану суміш можна використовувати у вигляді глюкозо-фруктозного сиропу або відділити фруктозу, а глюкозу, яка залишилася, знову піддати ізомеризації.

Біотехнологічний процес ізомеризації глюкози здійснюється в реакторах, що мають форму колон висотою до 5 м, які попередньо заповнюють іммобілізованим ферментом у вигляді гранул, порожнистих ниток, кусочків гелю тощо. В колону безперервним потоком зверху вниз подають розчин глюкози (попередньо отриманий при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю), а з колони витікає глюкозо-фруктозний сироп.

Про ефективність такої технології свідчать такі дані: на 1 кг іммобілізованого ферменту за 100 днів роботи одержують 4 т фруктози (у перерахунку на сухий продукт). Час напівінактивації ферменту (час, за який активність ферменту зменшується удвічі) становить від 20 до 50 днів. Каталізатор (іммобілізований фермент) підлягає заміні тільки один раз у 2–3 міс., завдяки чому процес є економічно вигідним. Вартість продукту з іммобілізованим ферментом складає лише 61 % від вартості продукту з розчинним ферментом.

Для підтримки високої продуктивності установки протягом більш тривалого часу рекомендується використовувати чисту вихідну сировину. А.А. Клесов наводить дані компанії «Денкі Кагаку», що при використанні кристалічної глюкози продуктивність реактора була 4000 кг сухої фруктози з розрахунку на 1 кг іммобілізованого ферменту. Напівінактивація каталізатора відбувалась протягом 50 днів. При більш низькій якості глюкози продуктивність реактора зменшувалася до 1500 кг продукту на 1 кг іммобілізованого ферменту, а час напівінактивації скорочувався до 20 днів.

Японська компанія «Кійова Хакко» для одержання сиропу з високим умістом фруктози використовує глюкоїзомеразу, іммобілізовану адсорбцією на фенолформальдегідній смолі Дуоліт А7. Вихідною сировиною є 40 % розчин глюкози при температурі 60 °С (рН 8,2), який пропускають через колонну з Дуолітом А7 (рис. 10.2), а готовий продукт для видалення солей

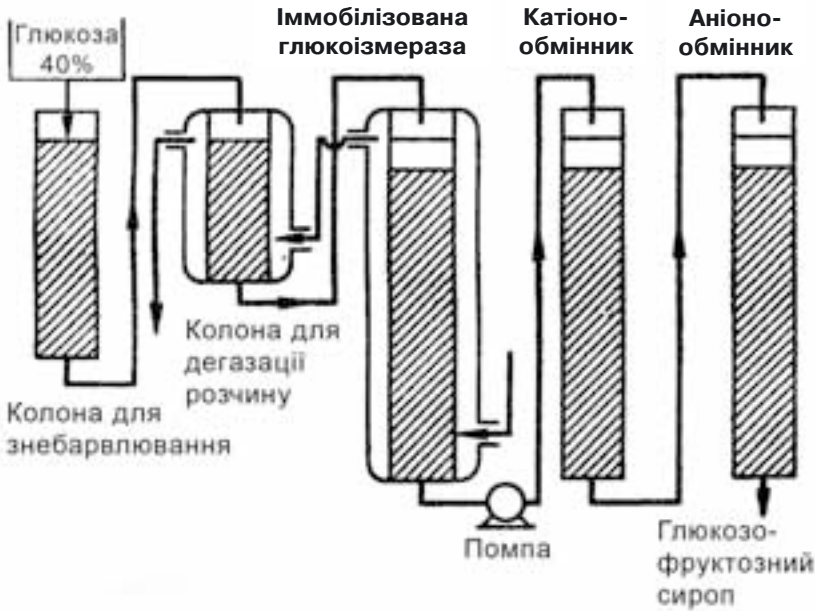


Рис. 10.2. Схема процесу ізомеризації глюкози у фруктозу за допомогою глюкоїзомеразу, яка іммобілізована на фенолформальдегідній смолі (за Клесовим А. А., 1982)

пропускають послідовно через катіонообмінник і аніонообмінник. При безперервній роботі реактора протягом 40 днів не було встановлено мікробного забруднення системи через високу температуру (60 °С). Напівінактивується іммобілізована глюкоїзомераза протягом 6 днів. Вартість виробництва при застосуванні іммобілізованого ферменту становила 61,5 % вартості продукту, виготовленого із застосуванням розчинної глюкоїзомеразу.



Контрольні питання

1. Які переваги має фруктоза над глюкозою і де застосовуються сиропи з високим умістом фруктози?
2. Яким методом і за участю яких ферментів глюкозу можна перетворити на фруктозу?
3. Які способи використовуються для отримання препаратів іммобілізованої глюкоїзомерази?
4. В яких установках здійснюється біотехнологічний процес ізомеризації глюкози і який принцип їх роботи?

10.3. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ГЛЮКОЗИ Й ЕТАНОЛУ З ЦЕЛЮЛОЗИ

Розробка цієї технології в масштабах крупнотоннажного виробництва має виняткове народногосподарське значення. Інтенсивна дослідницька робота з вивчення ферментативного гідролізу целюлози проводиться в США, Японії, Швеції, Фінляндії, Італії; у менших обсягах – у Польщі, Чехії, Словаччині та Болгарії. Провідним напрямом є пошук економічно вигідних шляхів одержання, в першу чергу, етанолу як джерела енергії, а не харчової глюкози, що пов'язано зі сформованою енергетичною ситуацією. Розробка високорентабельної технології одержання етилового спирту з поновлюваних ресурсів (рослинної біомаси, відходів сільського і лісового господарств, а також промисловості) дозволить зменшити енергетичний голод.

При розробці технології виробництва харчової глюкози нездоланні поки що труднощі, пов'язані з вибором джерел, якістю целюлозовмісної сировини і ферментних препаратів, що входять у целюлозний комплекс. Їхнє співвідношення й активність повинні бути в такий спосіб збалансованими, щоб кінцевим продуктом гідролізу була харчова глюкоза, а не суміш глюкози з іншими ді- та олігоцукрами, непридатними для використання у харчовій промисловості. Гідролітична деградація целюлози здійснюється не менш ніж чотирма ферментами, що складають так званий целюлозний комплекс. Слід зазначити факт існування у природних умовах іммобілізації ферментів або автоіммобілізації. Міцно адсорбувавшись на субстраті, ферменти целюлозного комплексу здійснюють свою каталітичну функцію. Продуктами гідролітичної реакції є глюкоза (20–40 %), дисахарид целобіоза і певна кількість більш складних олігоцукрів. Склад кінцевих продуктів визначається видом целюлозовмісної сировини, складом і співвідношенням ферментів у целюлозному комплексі.

Цукри, що утворюються при гідролізі целюлози, можуть у реакційній суміші зброджуватись ферментами дріжджових клітин з утворенням етанолу. Через те, що целюлозні комплекси, які каталізують утворення з целюлози глюкози, ще не отримані, практичні зусилля спрямовані на створення технологій виробництва етанолу, який використовується як енергетичне джерело.

Усі виробники етанолу використовують целюлозний комплекс мікробного походження.

Одна з установок з переробки целюлозної сировини знаходиться в США і працює у пілотному режимі. Тут одержують целюлозний комплекс ферментів і потім використовують його для переробки паперової макулатури у вуглеводи, які за допомогою целюлозного комплексу мікробного походження зброджуються з утворенням етанолу. На другій пілотній установці (у її створенні на кооперативних засадах брали участь компанія «Голф Ойл», університети Пітсбурга і Канзаса (США) та японська компанія «Ниппон Майнинг») проходить відпрацювання біотехнологія виробництва етанолу з паперової макулатури і відходів сільськогосподарського виробництва.

Гідроліз целюлози у глюкозу можна провести за допомогою продуцента *Trichoderma reesii*, целюлаза якої руйнує кристалічну і нерозчинну целюлозу. У США (С. Альбер, 1987) одержали мутант *T. reesii*, який продукує у 2–4 рази більше целюлази, ніж штам дикого типу. Процес гідролізу целюлози дуже простий. Гриб вирощують у середовищі, яке містить відходи деревини і мінеральні солі. Потім культура фільтрується. До фільтрату з ферментом додається подрібнений папір. Усе поміщають в реакційний чан та інкубують за температури 50 °С й певного атмосферного тиску. Під час реакції гідролізу утворюється неочищений глюкозний сироп, а негідролізована целюлоза і фермент використовуються повторно. Вихід глюкози складає 50 % вихідної целюлози. На думку американських фахівців, процес перетворення відходів целюлози на спирт більш перспективний ніж одержання спирту із крохмалю кукурудзи.



Контрольні питання

1. Що є проблемним у біотехнологічному виробництві глюкози і етанолу з целюлози?
2. Які ферменти здійснюють біодеградацію целюлози?
3. Що є продуктом гідролізу целюлози?
4. Яким шляхом у світовій практиці здійснюється переробка целюлозовмісної сировини?

10.4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-ЯБЛУЧНОЇ КИСЛОТИ

L-яблучна кислота має попит на світовому ринку як заміник лимонної кислоти в харчовій і фармацевтичній промисловості. Хімічним методом (гідролізом ангідриду яблучної кислоти) одержують тільки рацемічну суміш оптичних D, L-ізомерів яблучної кислоти, а мікробіологічний синтез L-яблучної кислоти є непридатним для промислового виробництва через його високу вартість.

Однак L-яблучну кислоту можна одержати шляхом ферментації з тієї самої фумарової кислоти, з якої одержують L-аспарагінову кислоту. За участю ферменту фумарази проходить гідратація фумарової кислоти (приєднання за подвійним зв'язком води) з утворенням L-яблучної кислоти. Як біокатализатор використовують клітини, які містять фермент фумаразу.

Для одержання L-яблучної кислоти у великих кількостях японська фірма «Танабе Сейяку» використовує іммобілізовані мікробні клітини в поліакриламідному гелі. Однак вони, окрім основного процесу утворення L-яблучної кислоти, каталізують небажаний, побічний у данному випадку процес утворення янтарної кислоти. Для гальмування цієї реакції іммобілізовані мікробні клітини додатково обробляють. Іммобілізація підвищує стабільність клітинної фумарази. Час її напівінактивації при температурі 37 °C складає 55 днів, тоді коли цей показник для інтактних (необроблених) клітин сягає 6 днів.

Італійська компанія «Снам Проджетті» для виробництва L-яблучної кислоти використовує фермент фумаразу, яку іммобілізують шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Окрім цього, компанія використовує для іммобілізації цілих мікробних клітин замість поліакриламідного гелю інший гель на основі карагінану (поліцукру із морських водоростей). Це збільшило час напівінактивації ферменту до 160 днів.



Контрольні питання

1. Де застосовується L-яблучна кислота і за участю якого ферменту її отримують?
2. Які форми ферменту використовують у біотехнологічному процесі одержання L-яблучної кислоти?

10.5. ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ У МОЛОЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Нині у молочній промисловості біотехнології з використанням іммобілізованих ферментів можуть бути застосовані для видалення лактози з молока і продуктів його переробки, у процесах виробництва сирів, а також для збільшення терміну збереження молока.

При переробці молока для одержання сирів утворюється дуже багато молочної сироватки, у якій міститься в невеликих кількостях білок, різні солі і лактоза (близько 5 %). Так, при виробництві 1 т сиру утворюється 9 т сироватки. В кожній тонні сироватки міститься близько 5 кг високоякісного білка, вітаміни групи В, комплекс вільних амінокислот, усі найважливіші мінеральні елементи, в тому числі кальцій і фосфор. Але найціннішим компонентом сироватки є лактоза, якої в 1 т майже 50 кг.

Лактоза, діцукор або молочний цукор, є цінною сировиною для харчової і мікробіологічної промисловості. Вона має низьку розчинність і малу солодкість, і тому в харчовій промисловості не може використовуватися без попередньої обробки. При дії на неї ферменту лактази або β -галактозидази розщеплюється на два моноцукри – глюкозу і галактозу, які у 1,5 раза солодші за цукор. Вони використовуються у харчовій промисловості, наприклад, для виготовлення морозива з тривалим терміном зберігання (до 4 міс.) та замість меляси для одержання цукристих речовин.

Сироватка може використовуватись у мікробіологічній промисловості як субстрат для вирощування культури кормових дріжджів, які мають лактазну активність (*Saccharomyces fragilis*, *Zygosaccharomyces lactic*, *Candidia pseudotropicalis* і ін.).

Така переробка молочної сироватки зменшує забруднення навколишнього середовища, тому що в більшості випадків ці відходи переробки молока не утилізуються. Хімічний гідроліз лактози економічно не вигідний через високу вартість очищення отримуваних з неї продуктів.

Вилучення лактози з молочної сироватки. Поки що немає промислових установок з переробки молочної сироватки, хоча доступна і дешева сировина та цінні продукти, що утворюються при гідролізі, викликають неабиякий інтерес. У деяких країнах працюють пілотні установки. Так, у США фірмою «Корнінг Глас» налагоджена переробка депротейнізованої і знесоленої сироватки. В установці, що працює при 50 °С, використовується лактоза, іммобілізована методом ковалентного зв'язування з пористим силікагелем за допомогою глутарового альдегіду. Час напівінактивації ферменту залежить насамперед від складу вихідної сировини і при переробці знесоленої депротейнізованої сироватки досягає 62 днів. Собівартість 1 т цукрів, отриманих при ферментативному гідролізі сироваткової лактози, на цій установці складає близько 175 доларів.

У 1978 р. в Англії розпочали переробку молочної сироватки з вилучення лактози на напівпромисловій установці (рис. 10.3). Наразі використовується лактоза, іммобілізована на пористому

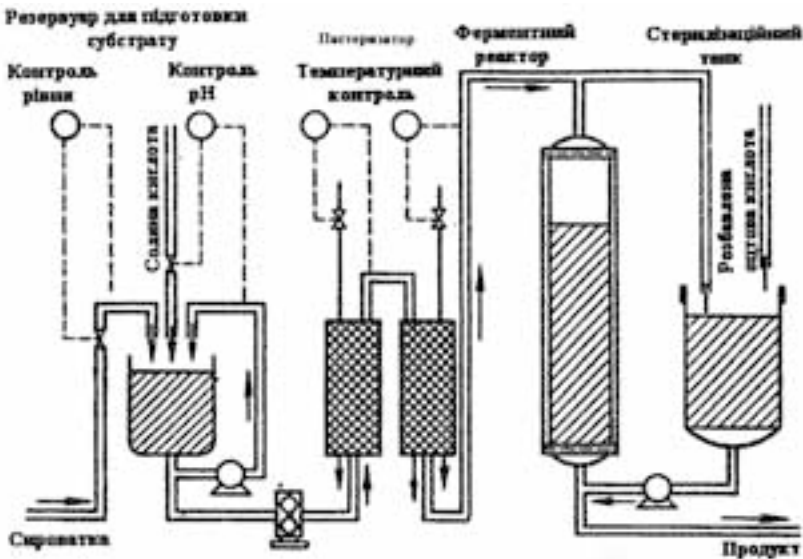


Рис. 10.3. Схема напівпромислової установки для гідролізу лактози у молочній сироватці (за Клесовим А.А., 1982)

силікагелі шляхом ковалентного зв'язування за допомогою глутарового альдегіду за методом фірми «Корнінг Глас». У реактор надходить попередньо пастеризована, депротейнізована і демінералізована сироватка. Протягом 5 днів безупинної роботи на установці переробляється близько 30 т сироватки, з якої одержують 1,7 т цукрового сиропу або 1,2 т сухих цукрів. Ступінь конверсії лактози – 80 %. Аналогічна установка за участю тих же партнерів уведена в дію 1978 р. у Франції. Її продуктивність – 500 л/год сироватки. На промисловій установці з денною продуктивністю 200 т цукрового сиропу при 80 % конверсії лактози собівартість 1 кг отриманих цукрів складає 1,25–1,80 французького франка.

Для вилучення лактози з молочної сироватки біокатализатор (іммобілізована лактаза) розміщується в реакторі горизонтально у вигляді нерухомого шару.

Вилучення лактози з молока. Необхідність вилучення лактози з незбираного молока викликана тим, що деякі люди, особливо в країнах Азії й Африки, не засвоюють лактозу через відсутність у їхньому організмі лактази. При вживанні в їжу молока в них з'являється діарея, метеоризм, біль у животі. Елімінувавши лактозу з молока, можна вирішити дуже важливе питання поліпшення харчування значної частини населення, насамперед дітей в економічно відсталих країнах.

Однак виникає багато проблем, пов'язаних з особливими фізико-хімічними властивостями цього продукту. У зв'язку з тим, що молоко – колоїдний розчин, при використанні реактора з нерухомим шаром існує потенційна небезпека забивання колонок. Крім цього, для збереження високої якості і запобігання мікробного забруднення технологією передбачена обробка молока при низьких робочих температурах. У цьому випадку зменшується активність іммобілізованого ферменту, тому що оптимум дії лактази становить 37 °С. Зменшення активності лактази спричиняє збільшення часу витримання молока в реакторі. Це, в свою чергу, може призвести до забруднення молока ферментом і носієм, очищення молока від яких дорого коштує.

Успішне подолання багатьох з названих проблем дозволило здійснити перший комерційний проект з одержання безлактоз-

ного молока. З 1975 р. в Італії працює промислова пілотна установка з використанням лактази (рис. 10.4).



Рис. 10.4. Схема пілотної установки для одержання безлактозного дієтичного молока за допомогою іммобілізованої лактази

(за Клесовим А.А., 1982)

Джерелом для комерційних препаратів розчинної лактази є гриби (з них лактаза більше підходить для переробки кислої сироватки) і дріжджі (лактаза більш придатна для обробки молока).

Для попередження закупорки реактора швидкість, з якою протікає молоко через колонку, значно збільшили. Іммобілізація дріжджової лактази проведена шляхом включення крапельок ферменту у порожнисті нитки триацетатцелюлози, що змотуються в мотки і дуже рихло розміщуються паралельно осі реактора та закріплюються в його верхній і нижній точках. Таке рішення одночасно забезпечує низький опір струму рідини і дуже велику площу поверхні ферменту. Стійкість триацетатцелюлози перешкоджає потраплянню носія у продукцію. Іммобілізований таким методом фермент має високу стабільність: 0,5 кг ферментомістких волокон триацетатцелюлози після переробки 500 тис. л молока при 4–7 °С втратили тільки 10 % своєї первинної ферментативної активності.

Для усунення мікробного забруднення колонки періодично промивають бактерицидними розчинами.

При високій вартості лактази (дріжджової β -галактозидази) економічного ефекту можна досягнути за рахунок високої експлуатаційної стабільності ферменту і високої конверсії лактози. Проблему вирішили, використавши реактор з нерухомим шаром і рециркуляцією (реактори з нерухомим шаром потребують менше ферменту при виході такої ж кількості продукту). Установа має 20-метровий реактор, у якому знаходиться 4 кг лактази, іммобілізованої шляхом включення у волокна триацетатцелюлози. Фермент досить стабільний. Протягом 50 днів роботи його активність зменшилася тільки на 20 %. Потужність установки – не менше 8000 л молока на день. Переробці піддається збиране молоко, що стерилізується протягом 3 с при температурі 142 °С, потім швидко охолоджується до 4–7 °С і кількаразово прокачується зі швидкістю 7 л/хв через реакційну колонку до досягнення необхідного ступеня конверсії (75 %). При 7 °С безлактозне молоко може зберігатися протягом 3–4 місяців.

Джерелом для комерційних препаратів розчинної лактази є гриби (з них лактаза більш підходить для переробки кислої сироватки) і дріжджі (лактаза більш придатна для обробки молока).

Виробництво сирів. Використання іммобілізованих ферментів може бути перспективним при переробці молока для виробництва сирів. При виробництві сирів використовується сичужний фермент реннін. В результаті його дії із незбираного молока виділяється білок казеїн, який після коагуляції стає основою усього процесу виробництва сичужних сирів. Процес згортання (зсідання) молока проходить у дві стадії. На першій, ензиматичній, відбувається зміна структури казеїну, який стає менш стійким і під дією іонів кальцію на другій неензиматичній стадії випадає в осад. Крім того, відомо, що сичужний фермент суттєво впливає на якість сиру і, як наслідок, на економіку виробництва.

Природний сичужний фермент (реннін) виготовляють із сичугів молодих телят, які одержували з раціоном тільки моло-

ко. Практично в усіх країнах з розвинутою молочною промисловістю не вистачає сичугів телят, а отже, сичужного ферменту. У колишньому Радянському Союзі щорічно для потреб сироваріння потрібно було 200–250 т сичужного ферменту, який можна виділити з 8–10 млн сичугів телят (Артамонов В.І., 1989). Підраховано, що загальна потреба в ренніні у світі оцінюється сумою близько 100 млн дол.

Замість шлунків молодих телят у виробництві сирів почали використовувати сичуги більш дорослих телят, в яких міститься менше реніну, однак вони мають підвищену кількість пепсину та небажаних баластних речовин, що негативно впливає на якість сирів, які виготовляються. Все це зумовило інтенсивний пошук альтернативних джерел ренніну за допомогою мікроорганізмів.

Мікроорганізми продукують різноманітні ферменти. Ще з кінця ХІХ століття було відомо, що деякі мікроорганізми синтезують ферменти, які викликають згортання молока. До них належать *Bac. subtilis*, *Bacterium prodigiosum*, *Aspergillus oгуzae* та ін. Мікробні ферменти для згортання молока у промислових масштабах виробляються в Японії, США, Данії та інших країнах. Продуцентами ферментів, які використовуються в Японії є *Mucor parasitica*, у США – гриб *Endothia parasitica*, а у Данії – плісень *Mucor miehei*. Фірмою Cooney et Emerson випускається фермент реннілаза, у Франції – формоза, а в колишньому Радянському Союзі вироблявся мезентерин ГР і мукор. Мікробні ферменти можна використовувати окремо, а також у суміші з природним ренніном, витрати якого зменшуються удвічі.

На жаль, мікробний реннін має деякі недоліки. Він зберігає активність протягом тривалого часу і має ширший спектр дії порівняно з ренніном тваринного походження. Завдяки цьому мікробний реннін сприяє видаленню природних ароматів сирів, негативно впливає на процеси консервації і старіння сирів та погіршує його смакові властивості. Тому останнім часом для одержання більш якісного ренніну використовуються методи генетичної інженерії.

Перспективним є застосування іммобілізованого ренніну чи інших альтернативних протеаз, можливість їх реактивації і

тривалого використання, а також автоматизація процесу, що забезпечить значний економічний ефект.

Перспективним є також використання іммобілізованих ферментів для стабілізації молока. При обробці трипсином молоко скисає повільніше і довше зберігає свої первинні смакові властивості. Обробка іммобілізованим трипсином збільшила термін зберігання молока на 2–3 тижні. Використання іммобілізованих ферментів ефективніше за традиційні способи обробки молока – стерилізацію або обробку струмом високої частоти.



Контрольні питання

1. З якою метою використовуються іммобілізовані ферменти в молочній промисловості?
2. Біотехнологія вилучення лактози з молочної сироватки.
3. На якому носії іммобілізується лактаза для вилучення лактози з молочної сироватки і як розміщується біокаталізатор у реакторі?
4. Як відбувається вилучення лактози з молока і які труднощі виникають при цьому?
5. На якому носії і яким методом проводиться іммобілізація лактази для обробки молока? Як розміщується біокаталізатор у реакторі установки?
6. Які перспективи використання іммобілізованих ферментів у технології одержання сиру?

10.6. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА D-ФЕНІЛГЛІЦИНУ

D-фенілглїцин – це амінокислота, яка необхідна для виготовлення напівсинтетичних антибіотиків – ампіциліну і цефалексину. Це антибіотики широкого спектру дії, які згубно діють як на грамнегативні, так і грампозитивні мікроорганізми та мають низьку токсичність.

Італійська компанія «Снам Проджетті» розробила технологію одержання оптично активних амінокислот із рацемічних сумішей з використанням як біокатализатора іммобілізованого ферменту гідантоїнази шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Джерелом цього ферменту є печінка телят. В процесі іммобілізації активність гідантоїнази знижується на 20% і становить 80 % активності нативного ферменту.

D-фенілглїцин одержують шляхом хімічного синтезу. При взаємодії альдегідів з ціаністим калієм і карбонатом амонію утворюється рацемічна суміш, тобто суміш D, L-ізомерів – гідантоїнів амінокислот. Гідантоїназа взаємодіє тільки з D-гідантоїнами з подальшим перетворенням їх у карбамоїлпохідні D-амінокислот. L-гідантоїни амінокислот довільно перетворюються на рацемічну суміш, яка складається з D, L-гідантоїнів. D-ізомери за участю гідантоїнази знову елімінуються з рацемічної суміші, перетворюючись на карбамоїлпохідні D-амінокислот. Останні у присутності гідроксиду кальцію при температурі 100 °C гідролізуються до D-амінокислот, тобто таким шляхом одержується D-фенілглїцин. Є дані, що 3 кг фенілгідантоїну в реакторі періодичної дії при 30 °C і рН 8,5 протягом 5 год перетворюються на D-фенілглїцин.



Контрольні питання

1. До яких речовин належить D-фенілглїцин і де він застосовується?
2. Біотехнологія одержання D-фенілглїцину?
3. Що є біокатализатором у біотехнологічному процесі отримання D-фенілглїцину і як його застосовують?

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА АНТИБІОТИКІВ

Відкриття основних груп антибіотиків і весь комплекс генетичних і біохімічних досліджень їхніх продуцентів у 40–50-ті роки минулого століття, які дозволили створити масштабне виробництво принципово нових лікарських препаратів, можна віднести до найважливіших досягнень біотехнології.

Демографічний вибух в одних країнах і різке збільшення тривалості життя в інших на той час були обумовлені значною мірою антибіотиками. Серед продукції фармацевтичної промисловості розвинених країн антибіотики посідають перше місце за всіма показниками.

Незважаючи на знання структури практично всіх відомих речовин з антибіотичною дією, їхній хімічний синтез громіздкий і неефективний. У промисловості одержують антибіотики медичного чи ветеринарного призначення, використовуючи здатність відповідних штамів-продуцентів генерувати даний антибіотик у певній фазі росту і заданому режимі культивування.

Антибіотики – це низькомолекулярні речовини, які розрізняються за хімічною структурою. Загальне в цих сполуках є те, що, залишаючись продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, вони в дуже малих концентраціях порушують ріст мікроорганізмів. Більшість антибіотиків належать до вторинних метаболітів, так званих ідіолітів.

Мікроорганізми, які виробляють вторинні метаболіти, спочатку проходять стадію швидкого росту – трофофазу, під час якої синтез вторинних метаболітів незначний. У міру сповільнення або припинення росту через виснаження однієї або декількох необхідних поживних речовин у культуральному середовищі мікроорганізми переходять в ідіофазу. У цей період синтезуються ідіоліти (антибіотики). Більшість мікроорганізмів у процесі трофофазу чутливі до власних антибіотиків, однак

у період ідіофази вони втрачають цю властивість. Щоб зберегти мікроорганізми, продукуючі антибіотики, від самознищення, потрібно швидко досягти ідіофази і потім культивувати мікроорганізми у цій фазі.

На сьогодні відомо близько 6000 антибіотиків та антибіотичних речовин природного походження, продуцентами яких в основному є шість родів нитчастих грибів, три роди актиноміцетів (майже 4000 різних антибіотиків) і два роди справжніх бактерій (майже 500 антибіотиків).

Із нитчастих грибів плісняві гриби родів *Cephalosporium* і *Penicillium* є продуцентами так званих β -лактамних антибіотиків – пеніцилінів і цефалоспоринів. Більша частина синтезованих актиноміцетами антибіотичних речовин, включаючи тетрацикліни, належить до роду *Streptomyces* (один тільки вид *Streptomyces griseus* синтезує понад п'ятдесят антибіотиків).

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів, до β -лактамних антибіотиків належать цефаміцини, продуцентами яких є нитчасті бактерії актиноміцети, які належать до роду стрептоміцетів *Streptomyces*.

У 1945 р. Бротзу з Інституту гігієни в Кальарі (Сардинія) виділив із проби морської води плісень *Cephalosporium acremonium*, яка синтезує декілька антибіотиків, у тому числі цефалоспорин С, який особливо ефективний проти стійких до пеніциліну грампозитивних бактерій.

У період 40-х – 70-х років ХХ ст. кількість щорічно винайдених антибіотиків збільшувалася лінійно: щорічно відкривали приблизно 200 нових сполук. Наприкінці 70-х років ХХ ст. антибіотики виявляли зі швидкістю 300 сполук на рік, з них 150 продукувались актиноміцетами (*Альбер Сассон, 1987*).

Серед відомих тепер 5000–6000 природних антибіотиків і антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється лише 100, більшість яких (69) одержана зі стрептоміцетів. До найважливіших антибіотиків терапевтичного призначення, які використовувались донедавна і використовуються тепер належать наступні їх класи (табл. 11.1).

Перелік наведених класів антибіотиків поповнюється щороку. Причини такої уваги до пошуку нових антибіотиків пояснюються токсичністю існуючих антибіотиків, алергічними

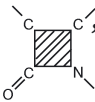
Таблиця 11.1.
Найважливіші антибіотики тералевитичного призначення (за Єворовим Н.С., 1987)

Клас	Типові антибіотики	Продукенти	На кого діє	Механізм дії	Трудищі пералевитичного застосування
β-лактамі	Пеніциліни, цефалоспори́ни	Гриби родів <i>Penicillium</i> , <i>Serphobotrytis</i>	Грампозитивні й грамінгативні бактерії	Порушення синтезу клітинної стінки	Алергійні реакції
Аміноглікозиди	Стрептоміцин, гентоміцин, канаміцин, тобраміцин, амікаци́н	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i> , бактерії родів <i>Micromonospora</i> , <i>Bacillus</i>	В основному грамінгативні бактерії	Незворотне пригнічення синтезу білка	Токсична дія на слуховий нерв і нирки
Тетрацикліни	Одроме́нні антибіотики	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i>	Грампозитивні й грамінгативні бактерії, рикетсії, хламідії, найпростіші	Зворотне подолання синтезу білка	Розповсюдження стійких штамів
Макроліди	Антибактеріальні: еритроміцин, Протигрибкові і антипротозойні: полібі́н	Актиноміцети роду <i>Streptomyces</i> Те ж саме	Грампозитивні бактерії Гриби, деякі найпростіші	Те ж саме Порушення плазматичної мембрани	Токсичність
Поліпетиди	Поліміксин, граміци́дин, бацитраци́дин	Різні мікроорганізми	В основному грамінгативні бактерії	Механізм дії різний	Висока токсичність

реакціями на їх введення, підвищенням стійкості до них патогенних мікроорганізмів, а також необхідністю пошуку засобів боротьби зі збудниками, проти яких недостатньо ефективні відомі тепер препарати.

У світі в 1978 р. було реалізовано антибіотиків на 4,2 млрд. доларів. Із цієї суми 1,5 млрд. доларів припадає на β -лактамні антибіотики (пеніциліни і цефалоспорини) та антибіотики, які синтезуються актиноміцетами (1 млрд. доларів). У 1980 р. світове виробництво антибіотиків складало приблизно 25000 т, з них 17000 т – пеніциліни, 5000 – тетрацикліни, 1200 – цефалоспорини і 800 т – еритроміцини.

Починаючи з середини 60-х років ХХ ст. у зв'язку зі зростаючою складністю виділення ефективних антибіотиків і розповсюдження стійкості до широко вживаних антибіотиків у значної кількості патогенних бактерій, дослідники перейшли від пошуку нових препаратів до модифікації структури уже отриманих. Вони прагнули підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист їх від інактивації ферментами стійких бактерій і покращити фармакологічні властивості препаратів. Більшість досліджень було зосереджено на пеніцилінах і цефалоспоринах, структура яких включає **чотиричленне β -лактамне кільце, що складається з трьох атомів вуглецю і одного атома азоту:**



11.1. ВИРОБНИЦТВО β -ЛАКТАМНИХ АНТИБІОТИКІВ

Одержання пеніцилінів. Вперше антибактеріальну дію пеніциліну і можливість його використання як лікувального препарату встановили у 1940 р. А. Флемінг, Х. Флорі і Е. Чейн зі співробітниками Оксфордського університету. Продуктивність лабораторного штаму плісені була на той час 2 мг препарату на 1 л культуральної рідини, що було недостатнім для налагодження промислового виробництва антибіотика. Продуктивність гриба вдалося збільшити шляхом багаторазового систематичного впливу на нього такими мутагенами, як рентгенівське й

ультрафіолетове опромінювання, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями й відбором найкращих продуцентів. Завдяки цьому концентрація пеніциліну в культуральній рідині була доведена до 2 %, тобто збільшена в 10 тис. разів (20 г/л культуральної рідини).

Метод підвищення продуктивності штамів-продуцентів антибіотиків, який ґрунтується на безладних мутаціях, незважаючи на великі затрати праці й часу, використовується й нині. Це є наслідком того, що біосинтез антибіотика відбувається в результаті сумісної дії 10–30 різних ферментів, кодованих відповідною кількістю генів. Полігенний механізм, покладений в основу біосинтезу антибіотика, є причиною того, що зміни окремих генів не дають бажаних результатів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджено, молекулярні механізми їх біосинтезу дотепер не з'ясовані.

Для масштабного виробництва пеніциліну G використовують високопродуктивний промисловий штам *Penicillium chrysogenum*, який був одержаний у результаті послідовних циклів мутагенезу і селекції. Вирощують його глибинним методом у ферментерах за допомогою фенілоцтової кислоти, яка є попередником бензильного бокового ланцюга молекули антибіотика. Інтенсивний синтез пеніциліну розпочинається за наявності великої кількості біомаси міцелію при повному використанні глюкози і молочної кислоти в середовищі, при рН, наближеному до нейтрального. Мікробіологічна стадія при виробництві пеніциліну триває близько 200 год. Після закінчення ферментації культуральну рідину фільтрують, а клітини плісені промивають. З фільтрату і промивок за допомогою бутанолу й іонів калію у спеціальних установках – кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну G (чистота – 99,5 %), яка є вихідним матеріалом для наступних хімічних модифікацій.

До цього часу пеніцилінові антибіотики становлять найважливішу групу хіміотерапевтичних засобів. Ядром пеніцилінів є 6-амінопеніциланова кислота, або 6-АПК, яку використовують для отримання напівсинтетичних пеніцилінів (рис. 11.1).

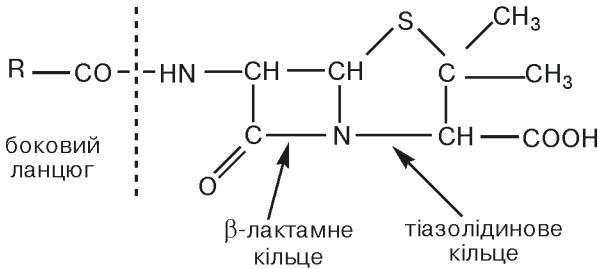


Рис.11.1. Будова молекули пеніциліну

Отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду.

Цефалоспорины – друга велика група екстрацелюлярних β -лактамних антибіотиків, у яких шестичленне дигідротіазіноне кільце з'єднане з β -лактамним кільцем. Завдяки цьому ядром цефалоспоринів є 7α -аміноцефалоспоринова кислота або 7-АЦК (**цефемове ядро**), вперше виділене у процесі очищення цефалоспориноу С.

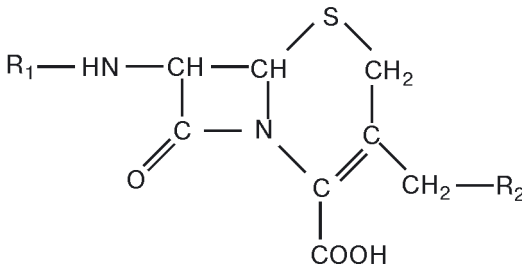


Рис. 11.2. 7-аміноцефалоспоринова кислота (7-АЦК)

При виробництві цефалоспориноу С поєднують мікробіологічний метод з подальшою хімічною модифікацією. Як продуцент антибіотика використовується *Cephalosporium acremonium*. У цього антибіотика поєднується антибактеріальна активність як проти граммпозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів. Проте для досягнення лікувального ефекту потрібні високі концентрації цефалоспориноу С. Він є матеріалом для подальших хімічних модифікацій.

11.2. МОДИФІКАЦІЯ β -ЛАКТАМНИХ АНТИБІОТИКІВ

За декілька десятиліть використання антибіотиків з лікувальною метою нагромадилась велика кількість патогенних мікроорганізмів, які набули спадкової стійкості до препаратів, що раніше викликали їх загибель. Вихід зі складного становища був знайдений завдяки хімічній і ферментативній трансформації природних антибіотиків.

В результаті одержали так звані напівсинтетичні антибіотики, в структуру яких внесені деякі зміни, які не займають основного угруповання атомів, відповідальних за антибіотичний ефект. Таким чином модифікували природні пеніциліни і цефалоспорины за допомогою іммобілізованого ферменту пеніцилінамідази.

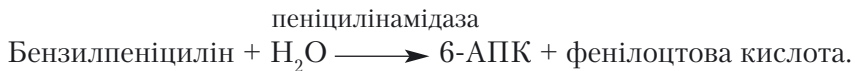
Одержання нових, більш ефективних аналогів пеніциліну пов'язане зі зміною його бічного ланцюга при збереженні цілості решти частини, так званого «ядра» антибіотика – 6-амінопеніциланової кислоти.

Це відкрило доступ до широкомасштабного виробництва напівсинтетичних пеніцилінів, стійких в кислому середовищі, які володіють високою активністю по відношенню до великої кількості мікробів, низькою токсичністю, а також стійкістю до ферменту β -лактамази, яка гідролізує лактамне кільце, що призводить до повної втрати антибіотичної активності. Остання властивість дуже важлива, тому що багато мікроорганізмів, які містять β -лактамазу, стійкі до дії бензилпеніциліну і деяких інших пеніцилінів.

11.2.1. Одержання 6-амінопеніциланової кислоти (6-АПК).

Це ключовий продукт синтезу нових пеніцилінів. Похідними 6-АПК є напівсинтетичні пеніциліни. Одержують їх шляхом гідролізу бензилпеніциліну (пеніциліну G). Оброблений ферментом пеніцилінамідазою, продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штам *E. coli*, пеніцилін G в результаті вибіркового видалення з молекули бензильної групи при 37 °C у водному середовищі перетворюється на 6-амінопеніциланову кислоту.

Другим компонентом, який утворюється в процесі гідролізу, є фенілоцтова кислота:



На ранніх етапах (1976 р.) 6-АПК одержували шляхом обробки бензилпеніциліну бактеріальною масою *E.coli*, тобто інтактними клітинами, які містять фермент пеніцилінамідазу, що без побічних реакцій розщеплював саме той амідний зв'язок, необхідний для утворення 6-АПК.

В результаті використання іммобілізованих бактеріальних клітин (*E.coli*), які містять пеніцилінамідазу, а потім і самої іммобілізованої пеніцилінамідази, значно підвищилася продуктивність і економічність промислового процесу одержання 6-АПК. У 1975 р. процес одержання 6-АПК з використанням іммобілізованої пеніцилінамідази впроваджено у тодішньому Радянському Союзі, і це було першим процесом інженерної ензимології.

В кожній країні іммобілізацію проводять різними шляхами. Італійська компанія використовує іммобілізовану пеніцилінамідазу шляхом включення ферменту в порожнисті нитки триацетату целюлози, що забезпечує загальний вихід 6-АПК на рівні 85 % з чистотою 96 %. За технологією японської компанії «Танабе Сейяку» використовуються іммобілізовані в поліакриламідному гелі цілі бактеріальні клітини (з часом напівінактивациї 42 доби при 30 °С або 17 діб при 40 °С). Загальний вихід 6-АПК – приблизно 80 %.

У колишньому СРСР весь об'єм 6-АПК вироблявся за допомогою пеніцилінамідази, іммобілізованої включенням у поліакриламідний гель, модифікований глутаровим альдегідом.

Отримана 6-АПК має слабку антибактеріальну активність і не використовується самостійно як лікувальний засіб. Однак ядро 6-АПК є зручною основою для модифікацій, в результаті яких при приєднанні бічних груп антибактеріальна активність препарату значно підвищується. Наприклад, при заміні бічних груп дістають **метицилін**, стійкий проти інактивациї дії бактеріальних ферментів, а також **ампіцилін**, який діє на грамозитивні бактерії.

На сьогодні в різних країнах виробляють біосинтетичні (за допомогою *Penicillium notatum* або *P. chrysogenum*) антибіотики і на їх основі – напівсинтетичні антибіотики β -лактами (табл. 11.2).

Таблиця 11.2.
Природні і напівсинтетичні пеніциліни
(Єлінов Н.П., 1995)

Назва	Радикал, R	Ефективність per os	Стійкість до β -лактамаз		Гідролізується після всмоктування
			<i>Staph. aureus</i>	грам-негат. бактерій	
1	2	3	4	5	6
Бензилпеніцилін	Бензил	-	-	-	-
Феноксиметил-пеніцилін	Феноксibenзил	+	-	-	-
Метцилін	2,6-Диметокси- феніл	-	+	+	-
Оксацилін	5-Метил- 3-феніл- 4-ізоксазоліл	+	+	+	-
Клоксацилін	3- α -Хлорфеніл- 5-метил- 4-ізоксазоліл	+	+	+	-
Флуоксацилін	2-Хлор-6-фтор- феніл-5-метил- 4-ізоксазоліл	+	+	+	-
Ампіцилін	α -D-(-)- амінобензил	+	-	-	-
Амоксицилін	p-Окси- α -D-(-)- амінобензил	+	-	-	-
Карбеніцилін	Натрієва сіль α -D- (-)-карбоксі- бензил	-	-	+	-
Тикарцилін	Натрієва сіль карбоксі (тін- 3-іл) ацетил	-	-	+	-
Карфеніцилін*	Феніл (фенокси- карбоніл)-ацетил	+	-	+	+
Кариндацилін*	Індан-5-іл- оксикарбоніл- феніл-ацетил	+	-	+	+

Продовження табл. 11.2.

Назва	Радикал, R	Ефективність рег. ос.	Стойкість до β -лактамаз		Гідролується після всмоктування
			Staph. aureus	грам-негат. бактерія	
1	2	3	4	5	6
Півампіцилін*	Амінофеніл-ацетил	+	-	-	+
Талампіцилін*	Див. ампіцилін [®]	+	-	-	+
Бакампіцилін*	Див. ампіцилін*	+	-	-	+
Піперацилін**	2,3-Діоксопіперазін-1-іл-карбоніламіно (феніл) ацетил	-	-	-	-
Азлоцилін**	4-Оксопіразолідин-1-іл-карбоніламіно (феніл) ацетил	-	-	-	-
Мезлоцилін**	3-Метилсульфоніл-2-оксоімідазолідин-1-іл-карбоніламіно (феніл) ацетил	-	-	-	-
Мецілінам**	Пергідроазепін-1-іл-метилен	-	o	?	
Півмецилінам**	Див. мецилінам [®]	+	o	?	+

Примітка: [†] ефіри карбеніцилану;

* ефіри ампіцилану;

** заміщені ампіциліни;

** 6- β -амідинозаміщені пеніциліни;

в позиції 3-тіазолідинового циклу (у формі складного ефіру): [†]-півазолілоксиметил, [®]3-оксо-1,3-дигідрозобензофуран-1-іл, [†]2-етоксикарбонілоксетил або 4-етоксикарбонілоксетил; (+) – відповідь позитивна; (-) – відповідь негативна; (o) – не діє на грампозитивні бактерії; (?) – інформація відсутня.

З пеніциліну G можна одержати 6-АПК і хімічним шляхом, вдаючись до багатостадійних хімічних перетворень при досить жорстких умовах (низька температура, наявність певних розчинників і видалення із середовища, де відбувається реакція, навіть слідів вологи). Через складність хімічного методу перевагу надають ферментативному, який, крім того, має менше етапів.

11.2.2. Одержання 7- α -аміноцефалоспоринової кислоти – 7-АЦК.

Пеніцилінамідази властива унікальна субстратна специфічність, яка дозволяє здійснювати гідроліз не тільки пеніциліну, але й цефалоспорину, причому відщеплюється тільки бічна група (R_1 або R_2), β -лактамний цикл лишається незмінним (рис. 11.2).

Із виробленого мікробіологічним шляхом цефалоспорину С під дією пеніцилінамідази проводиться елімінація бічного амідного ланцюга і отримується 7-АЦК, яка є ключовою сполукою для синтезу нових цефалоспоринів. Приєднуючи до неї різні бічні ланцюги, отримують активні антибактеріальні напівсинтетичні препарати цефалоспоринового ряду. Відомо майже 20 цефалоспоринів, створених методом напівсинтезу з АЦК: цефалоспоридін (цепорин), цефуроксим, цефокситин, цефалотин, цефацетрил, цефалексин, цефазолін, цефаридин, цефотаксим тощо.

11.3. СТВОРЕННЯ НОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА І ЗАСТОСУВАННЯ АНТИБІОТИКІВ

Нова біотехнологія ґрунтується на досягненнях молекулярної біології, молекулярної генетики і генетичної інженерії. Сьогодні розробляються перспективні напрями, що ґрунтуються на знаннях шляхів біосинтезу антибіотиків або їхніх окремих ключових структур. Для створення нової біотехнології масштабного виробництва антибіотиків передбачається використання різних прийомів або напрямів.

1. Генноінженерний напрям передбачає конструювання продуцентів з використанням плазмід *E.coli* як вектора для створення рекомбінантних ДНК. Вони містять гени, які контролюють біосинтез ферментів, які каталізують лімітуючі етапи біосинтезу антибіотика.
2. Виділення лімітуючих реакцій і за допомогою генетичної інженерії конструювання генів «вузьких місць» та одержання відповідного штаму-продуцента, який виробляє достатню кількість первинного метаболіту, що раніше лімітував швидкість біосинтезу антибіотика. Реалізація цього прийому дала змогу підвищити продуктивність продуцента цефалоспоринової групи.
3. Введення в геном мікроорганізму інформації про фермент, який необхідний для модифікації продукованого антибіотика, наприклад, його метилювання за допомогою метилази.
4. Використання сильних індукторів біосинтезу нуклеїнових кислот і білків-ферментів для збільшення концентрації первинних метаболітів, з яких за наявності відповідних ферментів утворюються антибіотики.
5. Збільшення продуктивності продуцентів шляхом використання специфічних ферментів, які визначають перехід мікробної культури із стадії трофофази до ідіофази, а також пригнічують процеси ретроінгібування.
6. Мутаційний біосинтез (мутасинтез). За допомогою мутацій мікроорганізмів одержують штами-мутанти, у яких блоковано утворення окремих фрагментів молекули антибіотика. При мутасинтезі відповідні мутантні штами використовують для завершення синтезу антибіотичної молекули. В результаті отримують модифіковані або так звані гібридні антибіотики.
7. Нова технологія, за якої використовуються штами-суперпродуценти антибіотиків, у яких передбачено вдосконалення захисту продуцента від синтезованого ним антибіотика.
8. Використання при виробництві антибіотиків іммобілізованих ферментів, що каталізують як реакції гідролізу, так і синтезу на деяких стадіях виробництва нових пеніцилінів і цефалоспоринової групи. Перспективним є використання іммобілізованих на полімерному носії цілих клітин-продуцентів, що дає змогу здійснити повний синтез антибіотичних препаратів.

9. Багатообіцяючим підходом є інкапсулювання антибіотиків і, зокрема, їх включення в ліпосоми, що дає можливість забезпечити цільову доставку препарату в органи-мішені (хворі органи) і знижує їх побічну дію.
10. Замість антибіотика в організм може вводиться його продуцент, який є антагоністом збудника захворювання. Цей підхід бере початок з робіт І.І. Мечникова про пригнічення гнильної мікрофлори в товстому кишечнику людини за допомогою молочнокислих бактерій.

Так, виникненню карієсу зубів сприяє дикий патогенний штам бактерії *Streptococcus mutans*, який знаходиться в ротовій порожнині. Він виділяє кислоти, які руйнують зубну емаль і дентин. Одержаний мутантний штам цього виду бактерії, який при введенні в ротову порожнину не утворює корозивних кислот, витісняє дикий патогенний штам і виділяє летальний для нього білковий продукт (Єгоров Н.С. і ін., 1987).



Контрольні питання

1. Що таке антибіотики, коли і ким вони були відкриті?
2. Які антибіотики й антибіотичні речовини сьогодні відомі і скільки їх виробляється для реалізації?
3. Які мікроорганізми є продуцентами антибіотиків?
4. Які антибіотики належать до β -лактамних?
5. Біотехнологія одержання пеніцилінів.
6. Який промисловий штам використовується для крупнотоннажного виробництва пеніциліну G і його продуктивність?
7. Біотехнологія отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду?
8. Який продуцент використовують для виробництва цефалоспоринових антибіотиків?
9. З якою метою проводиться модифікація β -лактамних антибіотиків?
10. Яким шляхом одержують 6-АПК?

11. Чи використовується 6-АПК як самостійний лікувальний препарат?
12. Якими методами і на яких носіях проводиться іммобілізація пеніцилінамідази у різних країнах?
13. Які антибіотики можна отримати в результаті модифікації ядра 6-АПК?
14. Що є вихідними продуктами для отримання 7-АЦК і як застосовується 7-АЦК?
15. Які напрями створення нової біотехнології виробництва і застосування антибіотиків?

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ГОРМОНІВ

12.1. ШЛЯХИ ОТРИМАННЯ ГОРМОНІВ

Біотехнологія сприяє розвитку нових шляхів у медицині щодо одержання таких цінних біологічно активних речовин, як гормональні препарати. В організмі людини і тварини виробляються десятки різних сполук, які беруть участь в гормональній регуляції росту, розвитку й обміну речовин. Неабиякі зрушення відбулися в напрямі синтезу пептидних гормонів, побудованих із порівняно невеликої кількості ланок – від кількох амінокислотних залишків до декількох десятків. До них належать гіпоталамічні фактори, деякі гіпофізарні гормони, гормони щитовидної залози, гормони підшлункової залози і кишечника, нейропептиди. В ендокринних клітинах гормони даної групи утворюються зі значно більших попередників шляхом специфічного ферментативного розщеплення чітко визначених пептидних зв'язків.

Гормони росту і пролактин побудовані з більшої кількості амінокислотних залишків (приблизно 190–195) і утворюються в результаті відщеплення від їх попередників – прегормонів N-кінцевого пептиду, який називають «сигнальним», розміром близько 25 амінокислотних залишків.

Донедавна пептидні гормони, необхідні для медицини, виділяли в основному з органів і тканин тварини та людини (крові донорів, видалених при операціях органів, трупного матеріалу, органів після забою тварин тощо). Із органів тварин одержували гормони для застосування у випадках, коли гормон не має вираженої видової специфічності. Єдиним джерелом одержання гормонів з надто вираженою видовою специфічністю, наприклад соматотропіну людини (гормону росту), був трупний матеріал. Для одержання невеликої кількості гормонального препарату необхідно багато матеріалу (сировини).

Перші успіхи генетичної інженерії вселили надію на те, що з часом можна буде використовувати клітини мікроорганізмів для виробництва будь-яких продуктів білкової природи шляхом введення в їх геном генів, які кодують ці білки, і створення умов для їх експресії. Розробляючи нові технології виробництва гормонів з використанням плазмід, головною метою було створити (сконструювати) рекомбінантні молекули ДНК, які містять нуклеотидні послідовності, що програмують синтез певних гормонів, ввести їх у бактерію і змусити продукувати ці гормони.

Технологія одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК включає такі етапи: 1) одержання генетичного матеріалу (генів); 2) введення генетичного матеріалу в генетичний апарат бактеріальної клітини і створення умов для його експресії.

Одержання генів. Необхідний генетичний матеріал (ген або групу генів) для їх подальшого примноження методами генетичної інженерії з метою синтезу біологічно активних білків, що кодуються цими генами, можна досягнути трьома різними методами: 1) виділенням його з ДНК; 2) хіміко-ферментативним синтезом; 3) ферментативним або матричним синтезом на основі виділеної з клітини матричної РНК (мРНК).

Перший метод полягає в тому, що з природного генетичного матеріалу – ДНК – за допомогою відповідних ферментів (рестрикційних ендонуклеаз) «вирізають» потрібний ген. Цей підхід має суттєві недоліки. По-перше, важко підібрати дію ферментів таким чином, щоб вирізати з ДНК необхідний ген. Як правило, разом з геном залишаються «по боках» зайві нуклеотидні послідовності, що заважає наступному використанню одержаного гена, або, навпаки, ферменти відрізають частину гена, що робить його функціонально неповноцінним. По-друге, гени еукаріотичних організмів мають складну «мозаїчну» (екзонінтронну) будову, що в подальшому при розмноженні в мікроорганізмах може перешкоджати їх нормальному функціонуванню, тому що в бактеріях не відбувається видалення зайвих частин (інтронів). Тому цей прийом виділення генів краще спрацьовує стосовно вірусів і бактерій, але не еукаріот. По-третьє, якщо ген становить незначну частку від цієї ДНК, з якої його виділяють, то можуть виникнути серйозні труднощі щодо його ізоляції та ідентифікації.

Другий метод полягає у хіміко-ферментативному синтезі гена, якщо відома первинна структура того білка або поліпептида, який кодується синтезованим геном. Він є важливою альтернативою «вирізанню» генів за допомогою рестриктаз із нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8–16 нуклеотидних) одноланцюгових фрагментів ДНК за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігازی з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів.

Хіміко-ферментативний синтез дає змогу точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів і уникнути проблем, пов'язаних з елімінуванням зайвих нуклеотидних послідовностей у фрагментах ДНК, в т. ч. інтронів. Метод трудомісткий і дорогий. Методом хіміко-ферментативного синтезу одержані гени соматостатину, А- і В-ланцюгів інсуліну, проінсуліну, lac-оператор *E.coli* тощо.

Третій метод одержання генів **матричним синтезом** найбільш розповсюджений і є основним джерелом генів, які потім розмножуються у формі рекомбінантних ДНК в одноклітинних організмах, а інколи і в багатоклітинних. Суть методу полягає в одержанні генів шляхом їх ферментативного синтезу і коротко зводиться до наступного. Спочатку із клітин виділяють матричні (інформаційні) РНК (мРНК), серед яких присутня мРНК, що кодується геном, який потрібно виділити. Потім у спеціальних умовах здійснюють РНК-направляючий синтез ДНК (одноланцюгової), який каталізується ферментом зворотною транскриптазою (ревертазою). Після завершення реакції синтезовану одноланцюгову ДНК (яку називають комплементарною ДНК, кДНК) очищують і використовують як матрицю для другої реакції – ДНК залежного синтезу другої нитки ДНК. Це можливо завдяки відкриттю у 1970 році (США) ферменту зворотної транскриптази головною властивістю якої є здатність здійснювати синтез, зворотний тому, який проходить при транскрипції – синтез мРНК на матриці ДНК. Це стало науковою сенсацією і спростувало «центральну догму» молекулярної біології, яка стверджувала, що передача генетичної інформації триває тільки в одному напрямі: ДНК → РНК → білок.

Ступінь копіювання мРНК в ДНК, тобто повнота синтезу однієї з ниток гена, що синтезується, залежить від відсутності у препаратах мРНК і ферменту домішок, які могли б руйнувати мРНК або ДНК – продукт синтезу. Тому успішне проведення реакції синтезу залежить від ідеального очищення усіх компонентів.

Введення гена в бактеріальну клітину. В подальшому клонування генів відбувається за наступною схемою. Кільцеподібну молекулу вектора (частіше плазмиду *E. coli*) розрізають ферментами рестриктазами у специфічній ділянці в обох ланцюгах ДНК, перетворюючи його із кільцевої на лінійну форму. До лінійної ДНК за допомогою ферменту ДНК-лігази (ligation – зшивання) «пришивають» ген (або гени) і потім знову замикають її у кільце за допомогою тієї ж ДНК-лігази. Одержану рекомбінантну ДНК вводять у клітину *E. coli*, котра розмножується, утворює клон, усі клітини якого містять рекомбінантну ДНК (плазмиду), а тому і чужорідний ген. Останній, тепер клонований у клітинах кишкової палички, індукує в них біосинтез відповідного білка (продукту).

12.2. ОТРИМАННЯ ІНСУЛІНУ

Інсулін – гормон острівків лангерганса підшлункової залози, який регулює процеси вуглеводного обміну і підтримки нормального рівня цукру в крові. Недостатня кількість цього гормону в організмі зумовлює виникнення одного з найважчих захворювань – цукрового діабету. Згідно зі статистичними даними у 1985 р. у світі понад 80 млн. чоловік страждало на цей недуг, який знаходиться на третьому місці після серцево-судинних та онкологічних захворювань.

Інсулін – це невеликий глобулярний білок, що містить 51 амінокислотний залишок, послідовність яких була встановлена Сенгером у 1955 р. Він складається з двох поліпептидних ланцюгів А і В (відповідно 21 і 30 амінокислот), зв'язаних між собою двома дисульфідними містками. Синтезується інсулін на рибосомах в β -клітинах острівків лангерганса підшлункової залози у вигляді одноланцюгового попередника – **препроінсуліну**

довжиною в 109 амінокислот. Перші 23 амінокислоти є сигналом для проходження молекули інсуліну крізь мембрану клітини. Вони відщеплюються, в результаті чого утворюється **проінсулін** довжиною 86 амінокислотних залишків. Молекула проінсуліну обертається таким чином, що початковий і кінцевий її сегменти зближуються, а центральна частина молекули відділяється під дією ферментів. Роль останньої полягає у правильному взаємному розміщенні двох ланцюгів інсуліну.

12.2.1. Традиційні шляхи отримання інсуліну

Вперше в 1921 р. Бантінг і Бест у Торонто виділили з підшлункової залози собаки гормон, який мав антидіабетичний ефект, а вже в 1922 р. інсулін, виділений з тварин, був введений людині (дев'ятирічному хлопчику, хворому на діабет) і мав надзвичайний ефект. Вже через рік американська компанія «Елі Ліллі» випустила перший препарат тваринного інсуліну.

В 1935 р. датський дослідник Хагедорн досягнув оптимізації дії інсуліну в організмі, розробивши препарат інсуліну пролонгованої дії. Його поглинання було сповільнено додаванням протаміну, а потім і цинку. В 1946 р. датські дослідники одержали нейтральний інсулін (НРІ), який почали широко використовувати в інсулінотерапії. Перші кристали інсуліну були одержані в 1952 р., а розвиток методів очищення гормону (імуноелектрофорезу і рідинної хроматографії) від інших гормональних речовин та різних продуктів деградації інсуліну дозволив одержати гомогенний інсулін, який називають однокомпонентним.

Гормон не має чіткої видової специфічності, і тому тваринний інсулін може використовуватися для лікування людей. Сировиною для одержання тваринного інсуліну є підшлункова залоза великої рогатої худоби і свиней, яка не використовується в м'ясній і консервній промисловості і постачається м'ясокомбінатами. Підшлункова залоза корови має масу 200–250 г, а для одержання 100 г кристалічного інсуліну потрібно 800–1000 кг вихідної сировини. Враховуючи те, що кількість інсулінозалежних людей постійно збільшується, інсуліну, одержаного від вищезазначених тварин, буде недостатньо. Крім цього, тваринний інсулін відрізняється від людського на 1–3 амінокислотних за-

лишки і може викликати різні алергічні реакції, а при тривалому використанні викликає порушення роботи нирок і розлади зору. Найбільш прийнятним до людського є інсулін свині. Широкомасштабне терапевтичне використання інсуліну стримувалось його високою вартістю, обмеженістю ресурсів і різноманітними ускладненнями. Тому й виникла необхідність у виробництві бактеріально продукованого людського інсуліну.

12.2.2. Нові технології одержання інсуліну

Невелику молекулу інсуліну можна синтезувати штучно, приєднуючи одну амінокислоту за іншою. Але це дуже дорогий і складний синтез, з майже 170 хімічними реакціями. Він був проведений у 1963 і 1965 роках у США, Китаї і ФРН.

Простіше одержувати інсулін людини шляхом модифікації інсуліну свині, хімічно замінивши в ньому 30-у амінокислоту (ланцюга В) аланін на треонін. Цей метод був розроблено у Данії компанією «Ново індастрі» у 1980 р. В результаті був отриманий однокомпонентний інсулін людини 99 % чистоти. Порівняльне дослідження обох інсулінів (людського і свиного) показали, що вони не відрізнялися між собою за активністю і тривалістю дії. І в 1982 р. цей інсулін промислово виробляли в основному дві компанії: «Елі Ліллі» (збут у США) і «Ново індастрі» (збут у Європі).

Роботи щодо генно-інженерного методу одержання інсуліну розпочалися нещодавно і розвивалися швидкими темпами. В 1978 р. у США з'явилося повідомлення про одержання штама *E. coli*, який продукує щурячий інсулін. В тому ж таки 1978 р. компанія «Генентек» (США) одержала інсулін людини у спеціально сконструйованому штамі кишкової палички. Виробництво інсуліну в бактеріальних клітинах не залежить від постачання сировини, а одержаний інсулін при тривалому використанні не викликає негативних наслідків (порушення роботи нирок, розладів зору та алергічних реакцій).

Було випробувано декілька методів генетичної інженерії для одержання інсуліну. В деяких країнах (США) пішли шляхом синтезу ДНК (гена) на матриці іРНК інсуліну, тобто одержання копії ДНК (кДНК). В інших (Канада, СРСР) – шляхом

хімічного синтезу двох коротких ДНК (генів), які кодують обидва ланцюги (А і В) готового інсуліну, з подальшим синтезом кишковою паличкою (*E. coli*) його А- і В-ланцюгів.

У 1980 р. в США з людських тканин була виділена мРНК інсуліну, з якої шляхом зворотної транскрипції була синтезована її ДНК – копія (кДНК) і в клітинах *E. coli* був клонований ген людського проінсуліну. Поряд з цим у Канаді здійснено повний хіміко-ферментативний синтез гена проінсуліну.

У 1979 р. Креа, Крашевські, Хіроуз і Ітакура з Національного медичного центру «Хоуп» (Каліфорнія) і Геддель зі співробітниками компанії «Генентек» здійснили синтез генів, які кодують А- і В-ланцюги інсуліну. Кожен ген був зібраний відповідно із 18 і 11 олігонуклеотидів. Однак виявилось, що коли короткі ланцюжки чужорідного білка синтезуються в бактерії *E. coli*, а отже, вони руйнуються її протеолітичними ферментами. Щоб уникнути цього, ДНК (ген), який кодує кожний ланцюг інсуліну, пришивали за допомогою лігази до гена бактеріального ферменту галактозидази, розділивши їх кодоном, який кодує метіонін. В результаті в бактерії синтезувався великий білок, який складався із бактеріального ферменту і гормону. Їх розділяли один від одного хімічно, розрізаючи білок по метіоніну, відщеплювали від ферменту, проводили очищення, а ланцюги з'єднували *in vitro* для одержання повної молекули інсуліну.

У Радянському Союзі в Інституті біоорганічної хімії ген проінсуліну був одержаний методом тотального хіміко-ферментативного синтезу (рис. 12.1). Цей підхід має певні переваги: **по-перше**, можна безпосередньо одержати необхідну послідовність ДНК; **по-друге**, хімічний синтез виключає найважчу частину роботи при одержанні гена із природного джерела – виділення відповідної мРНК або геномної ДНК; **по-третє**, він спрощує модифікацію гена і одержаного з нього білка. Цей метод одержання гена проінсуліну проходить у два етапи. На першому етапі відбувається хімічний синтез понад 40 олігонуклеотидів – сегментів, з яких складається весь ген. На другому етапі проходить збір хімічно синтезованих сегментів за допомогою ДНК-лігази. Потім ген вводиться у плазмідну кишкової палички, яка продукує проінсулін, що конверсується в активний інсулін.

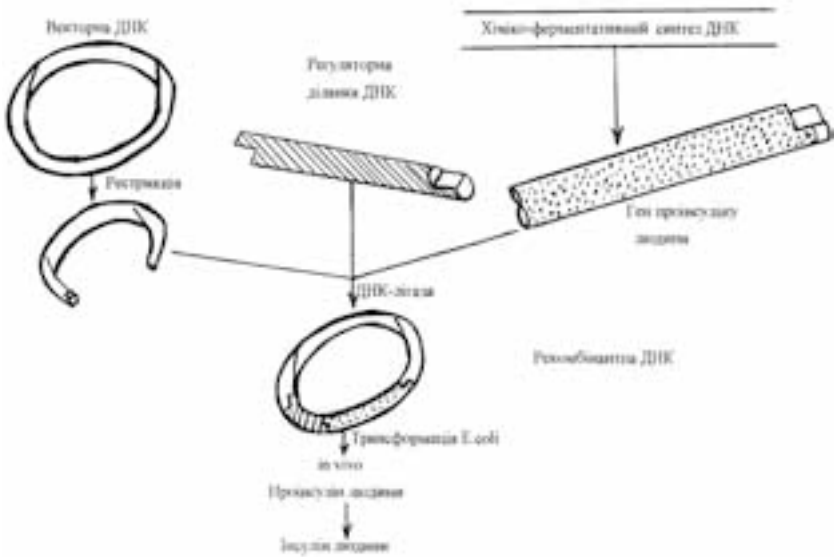


Рис. 12.1. Схема отримання інсуліну людини мікробіологічним шляхом
(за Єфімовим В.А., Чахмачовою О.Г., 1984)

Вихід інсуліну можна збільшити шляхом введення в одну бактеріальну клітину декількох копій рекомбінантної плазмиди. В Англії у Центрі прикладної мікробіології був одержаний таким чином високий вихід інсуліну — до 200 г з 1000 л культурального середовища. Ця кількість еквівалентна кількості інсуліну, виділеного приблизно з 1600 кг підшлункової залози свині або корови (Сассон А., 1987).

12.3. ОТРИМАННЯ СОМАТОТРОПІНУ

Соматотропін. Гормон росту людини (ГРЛ) або соматотропін — це поліпептидний гормон, який секретується передньою долею гіпофізу і складається із 191 амінокислотного залишку. Однак синтезується він більшого розміру разом з «сигнальною послідовністю», яка вилучається у процесі секреції гормону із клітини.

Вперше соматотропін був виділений і очищений у 1963 р. з гіпофізу, одержаного із трупного матеріалу. Недостатня кількість цього гормону в організмі людини призводить до гіпофізарної карликовості. Частота цього захворювання становить від 7 до 10 випадків на 1 млн чоловік (серед дітей країн Заходу вона складає 1 випадок на 5000 чоловік). Гормон має видову специфічність, тому для лікування не можуть використовуватись аналоги, одержані від тварин. Для одержання лікувального ефекту введення гормону необхідно продовжувати від 4–5-річного віку дитини і до статевої зрілості і навіть довше. А з одного трупа можна одержати тільки 4–6 мг соматотропіну. Натомість для лікування однієї дитини, яка страждає на гіпофізарну карликовість, необхідно 7 мг соматотропіну на тиждень. Наприклад, у США в 1981 р. з трупів вилучали до 60 тис. гіпофізів на рік і їх вистачало на лікування 1500 дітей — тільки на третину хворих дітей. Дефіцит соматотропіну збільшується, якщо врахувати й інші випадки використання цього гормону — при незаживаючих переломах (удавані суглоби), опіки, язви і порушення гемопоезу, а поряд з кальцитоніном (гормоном щитовидної залози) регулює обмін Ca^+ в кістковій тканині. Отже, доступна кількість соматотропіну, одержаного традиційним шляхом, була обмежена і не задовольняла попит. Хімічний же синтез гормону дуже складний через великий розмір його молекули.

Перспективним є генно-інженерний метод одержання соматотропіну. Вперше біотехнологічний гормон одержали в 1980 р. у лабораторії, а в 1985-му — у промисловому масштабі. В США фірмою «Генентек» був отриманий «квазісинтетичний» ген соматотропіну, побудований з двох частин, синтезованих різними методами. На першому етапі ензиматичним методом синтезували **фрагмент кДНК** (комплементарна ДНК — ензиматично синтезована двониткова ДНК — копія інформаційної або матричної РНК). Цей фрагмент гена кодує усю амінокислотну послідовність N-кінцевої частини соматотропіну, за винятком перших 23 амінокислот. Цю частину гена синтезували хімічним шляхом. Потім обидва фрагменти гена зшивали, вмонтували у плазмиду *E. coli* і переносили у клітину бактерії для клонування. Кінцевий вихід соматотропіну становив 2,4 мкг на 1 мл культуральної рідини.

Синтезований у бактеріях гормон має необхідну молекулярну масу і не зв'язаний з будь-яким бактеріальним білком, від якого необхідно було б його відщеплювати. Єдиною структурною відмінністю гормону росту бактеріального походження від аутентичного соматотропіну є наявність залишку метіоніну на N-кінці поліпептидного ланцюга, отриманого в умовах мікробіологічного синтезу. Хоча синтез будь-якого поліпептидного ланцюга і в клітинах бактерій, і в клітинах еукаріот починається з метіоніну (або формілметіоніну), але в результаті процесингу білка є можливість виділити його N-кінцеву частину, що веде до елімінації термінального метіоніну. Це явище проходить при формуванні зрілого соматотропіну шляхом елімінації його сигнальної послідовності в клітинах тварин, тоді як соматотропін бактеріального походження відразу синтезується у формі зрілого білка, де метіонін знаходиться в N-кінцевому положенні. Свого часу висловлювались припущення, що цей зайвий метіонін може впливати на фізіологічну активність препаратів бактеріального походження або підвищувати їх імуногенність. Однак в подальшому було встановлено, що гормональні активності соматотропіну мікробного та природного походження ідентичні. Крім того, в препаратах генно-інженерного соматотропіну міститься менша кількість неактивного димерізованого гормону та продуктів його деградації, що підвищує питому активність препарату. Підвищена активність метіонільованого соматотропіну обумовлена не присутністю N-кінцевої метіонінової групи, а невеликими домішками бактеріального білка, який відіграє роль своєрідного ад'юванту та підвищує імуногенність препарату (Ніколайчук В.І., Горбатенко І.В., 1999).

В Інституті молекулярної біології АН СРСР був одержаний ген соматотропіну без «сигнальної послідовності» пептиду прегормону. Таким шляхом одержали з 1 л суспензії рекомбінантних клітин *E. coli* за 7 год стільки гормону, скільки міститься в 60 гіпофізах людини. Клінічні випробування біотехнологічного соматотропіну на хворих дітях показали збільшення росту дітей на 8–18 см за рік.

Недоліком традиційно отриманого соматотропіну є недостатня його кількість, яка не задовольняє попит. Є й інші проблеми, пов'язані з гетерогенністю гормону, який виділяється з

трупного матеріалу. Це суміш з декількох форм, тому викликає у 30 % пацієнтів алергічні реакції. Існує також небезпека, що гіпофізарний матеріал заражений вірусами, що повільно розвиваються, внаслідок чого діти, які отримували препарат, потребували тривалого медичного спостереження.

Соматотропін, одержаний біотехнологічним методом за допомогою технологій рекомбінантних ДНК, має переваги над традиційно отриманим гормоном: він доступний у великих кількостях; його препарати є біохімічно чистими і вільними від вірусних забруднень. Використання біотехнологічного соматотропіну значно знижує вартість лікування хворих дітей. Згідно з статистичними даними у 1990 р. вартість 1 міжнародної одиниці гормону знизилася від 15 до 5 доларів США.

12.3.1. Використання генно-інженерного соматотропіну у тваринництві

Після виділення гена соматотропіну людини були одержані κДНК-копії цього гена багатьох сільськогосподарських тварин (великої рогатої худоби, овець, свиней, курей) та здійснено їх клонування й експресія в клітинах *E.coli* та інших мікроорганізмів. Для деяких соматотропних гормонів сконструйовані штами-суперпродуценти (*Ніколайчук В.І., Горбатенко І.В., 1999*).

Сьогодні соматотропін використовується у тваринництві для підвищення ефективності молочної і м'ясної продуктивності сільськогосподарських тварин. Як показали дослідження, соматотропін великої рогатої худоби бактеріального походження стимулює лактацію у молочних корів так само, як і природний гормон, виділений з гіпофізу. За даними різних авторів як короткострокова ін'єкція соматотропіну (протягом 14 діб), так і його довгострокове введення тваринам (188 діб) викликали стійке збільшення молочної продуктивності (за умови щоденних ін'єкцій). При добових дозах соматотропіну від 13,5 до 40,5 мг на тварину вихід молока збільшувався від 10 до 50 % залежно від дози препарату та умов утримання. На думку експертів, при масштабному впровадженні цієї біотехнології в молочному тваринництві можливо розраховувати на збільшення надоїв в середньому від 23 до 31 %.

Дослідження показали, що якість молока у корів, які тривалий час отримували соматотропін, практично не відрізняється від контрольних зразків і не містить помітної кількості введеного гормону росту. Введення соматотропіну протягом півроку негативно не впливає на інші фізіологічні, соматичні та етологічні характеристики піддослідних тварин.

Позитивні результати одержані також при використанні препаратів соматотропіну бактеріального походження в м'ясно-му тваринництві. Щоденні ін'єкції гормональних препаратів молодняку великої рогатої худоби помітно стимулювали ріст та формування м'язових тканин. Добові прирости живої маси залежно від виду тварин, умов утримання та дози гормону змінювалися в межах 20–30 %, що сприяло скороченню часу нагулу молодняка. Крім того, виявлено певне скорочення витрат кормів на одиницю приросту. У молодняка свиней та жуйних прискорення росту та розвитку під впливом генно-інженерного соматотропіну супроводжувалося також збільшенням вмісту білка і зменшенням вмісту жиру в тканинах, що помітно підвищувало якість та товарну цінність м'ясопродуктів. Однак зміни в метаболізмі, які відбуваються під дією екзогенного соматотропіну, у різних видів тварин неоднакові. Так, деякі автори зазначають позитивний ефект ін'єкцій соматотропіну на динаміку приростів у м'ясних овець, але при цьому жирові відкладення не зменшуються. Інтенсивне введення соматотропіну тваринам не супроводжується акумуляцією препарату в продуктах харчування, що вигідно відрізняє соматотропін від стероїдних гормонів та антибіотиків, які використовувалися з аналогічною метою.

Необхідність щоденних ін'єкцій перешкоджає широкому застосуванню соматотропіну в тваринництві, оскільки це призводить до ускладнення та подорожчання виробництва. Але останнім часом успішно проводяться дослідження з розробки і одержання таких форм гормональних препаратів, які в організмі утворюють депо тривалої дії, що дозволяє уникнути щоденних ін'єкцій.



Контрольні питання

1. Якими шляхами отримують гормони?
2. На чому базуються нові технології виробництва гормонів і їх переваги над традиційними технологіями?
3. Які етапи включає технологія одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК?
4. Яким шляхом отримуються гени гормонів?
5. Як відбувається клонування генів?
6. Біосинтез інсуліну, його будова і біологічна роль.
7. Отримання інсуліну традиційним методом, його недоліки.
8. Які існують нові технології одержання інсуліну?
9. Якими методами одержуть ген інсуліну?
10. Отримання рекомбінантного соматотропіну і його біологічна роль.
11. Які є методи отримання соматотропіну?
12. Які переваги генно-інженерного методу отримання соматотропіну?
13. Сфери застосування соматотропіну.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ІНТЕРФЕРОНІВ

Вперше інтерферон був отриманий у 1957 р. Айзексом і Лінденманном у Національному інституті медичних досліджень в Англії. Дослідники виявили, що клітини тварин, які піддалися впливу вірусу, виділяють у середовище фактор, який здатний надавати свіжим, необробленим вірусом клітинам стійкість до вірусної інфекції. Фактор перешкоджав (інтерферував) розмноженню вірусів у клітині і отримав назву інтерферон. Це відкриття сприяло успішній боротьбі з вірусними інфекціями.

Інтерферони — це білки, до складу поліпептидного ланцюга яких входить 146–166 амінокислотних залишків. Вони синтезуються клітинами хребетних у відповідь на вірусну інфекцію і забезпечують неспецифічний противірусний імунітет. Біосинтез інтерферону як відповідь на проникнення вірусної інфекції є однією з реакцій організму, яка найшвидше реалізується і значно випереджає реакції імунної відповіді. Фактично інтерферони є першою лінією оборони проти вірусної атаки. За даними медичної статистики, серед інфекційних захворювань майже 95 % становить вірусна патологія. Ветеринарна практика підтверджує цю закономірність. Значний інтерес до препаратів інтерферонів викликаний тим, що практичні медицина і ветеринарія не мають достатньої кількості ефективних етіотропних засобів профілактики і лікування вірусних інфекцій. Крім антивірусної дії і посилюючого впливу на імунітет, інтерферони гальмують розмноження аномальних клітин, і тому використовуються як протипухлинний засіб для лікування ракових хвороб. Вони є імуномодуляторами і, виступаючи при цьому регуляторами імунологічних реакцій, проявляють антимікробну властивість і радіозахисну дію. Визначено стимулюючий вплив інтерферону на фагоцитоз і неспецифічну резистентність клітин. Загальна імунологічна реактивність організму, як правило, відповідає рівню утворення інтерферонів. Під впливом інтерфе-