

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ЩОДО ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ  
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ  
**«БІОІНЖЕНЕРІЯ»**  
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ  
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401 – «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо практичних занять з навчальної дисципліни «Біоінженерія» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладач к. т. н., ст. викл. О. А. Сакун

Рецензент к. т. н., доц. А.В. Пасенко

Кафедра біотехнології і здоров'я людини

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол №\_\_ від\_\_\_\_\_ 2017 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік практичних занять.....	6
Практичне заняття № 1 Метод культури клітин та тканин.....	6
Практичне заняття № 2 Культура клітинних суспензій.....	10
Практичне заняття № 3 Генетичні вектори.....	13
Практичне заняття № 4 Біосинтез інсуліну людини у клітинах кишкової палички .....	23
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	30
Список літератури.....	32

## ВСТУП

**Предметом вивчення навчальної дисципліни «Біоінженерія» є біоагенти, біопроцеси, біологічний інструментарій та інші складові біоінженерних технологій, які застосовують у різних галузях господарства, медицині та у виробництві практично цінних продуктів.**

**1.1. Метою викладання навчальної дисципліни «Біоінженерія» є ознайомлення студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» з принципами та методологією біоінженерних технологій, що використовують для вирішення прикладних завдань у біотехнологічних виробництвах, медицині та інших галузях господарства.**

### **1.2. Основними завданнями вивчення дисципліни «Біоінженерія» є:**

- отримання знань щодо основних сучасних біоінженерних технологій;
- ознайомлення зі складовими біоінженерних технологій: біоагентами, біооб'єктами, біопроцесами, біологічним інструментарієм, субстратами, продуктами, процесами й обладнанням;
- формування базових знань з методології отримання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, будови векторів на основі прокариот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт та ін.;
- ознайомлення студентів з біоінженерними рішеннями у біологічних технологіях, що застосовуються у виробництві продукції рослинницької і тваринницької галузей, у фармакології, медицині, харчовій промисловості, екології та ін.;
- формування у студентів теоретичної бази професійної підготовки щодо вільного орієнтування у вирішенні практичних задач в біотехнології із застосуванням біоінженерних методів;
- формування у студентів наукового практичного світогляду, аналітичного мислення, які сприятимуть вирішенню глобальних проблем сьогодення: екологічних, енергетичних, продовольчих і охорони здоров'я людини шляхом впровадження новітніх біоінженерних процесів.

**1.3. Згідно з вимогами освітньо-професійної програми студенти повинні:**

**знати:** теоретичні основи біоінженерних технологій; прикладні аспекти біоінженерії: білкової, генної, геномної, клітинної, тканинної; основні принципи, способи та засоби культивування *in vitro* в біоінженерних технологіях; методологічні основи селекції, мутагенезу та добору у рослинництві й тваринництві, отримання іммобілізованих препаратів, їх використання у сучасній біоінженерії; методологію одержання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, побудови векторів на основі прокариот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт, отримання генетично модифікованих організмів, трансгенних рослин і тварин; основні напрями та перспективи сучасної біоінженерії.

**вміти:** використовувати теоретичні знання при реалізації біоінженерних технологій; застосовувати методологічну базу генетики, органічної та біологічної хімії, мікробіології при вирішенні прикладних завдань з біоінженерії; застосовувати технологічні прийоми культивування клітин різних організмів, складання живильних середовищ, отримання іммобілізованих препаратів, одержання рекомбінантних ДНК, клонування фрагментів ДНК, побудови векторів на основі прокариот та еукаріот, створення бібліотек геномів, рестрикційних карт, отримання генетично модифікованих організмів, трансгенних рослин і тварин та ін.; обирати оптимальні умови для отримання біоінженерного продукту в результаті рекомбінації ДНК та трансформації генетичного матеріалу; проводити аналіз і прогнозувати біоінженерні процеси, наслідки їх реалізації у біологічних технологіях різних галузей господарства; моделювати та впроваджувати біоінженерні рішення у різних галузях господарства.

# 1 ПЕРЕЛІК ПРАКТИЧНИХ ЗАНЯТЬ

## Практичне заняття № 1

**Тема. Метод культури клітин та тканин.**

**Мета:** ознайомитися з особливостями методу культури клітин та тканин.

**Навчальні елементи:** тотипотентність, процес калюсоутворення, стимулятори росту, клітинні суспензії, тканини-няньки, метод культури меристем, метод електрозлиття ізольованих протопластів, методи мутагенезу, методи скринінгу біохімічних мутантів.

### Короткі теоретичні відомості

Ідея про можливість культивування клітин поза організмом – *in vitro* – була висловлена стосовно клітин рослин. Однак вперше в культуру було введено клітини тварин. Дослідникам довго не вдавалося культивувати рослинні клітини на штучних живильних середовищах. Перших успіхів у цій області досягли у 30-х роках ХХ століття, а бурхливого розвитку новий напрямок досліджень набув у 60 – 70-х роках того ж століття. В історії розвитку цього методу можна виділити декілька періодів.

Період з 1892 по 1902 – перші роботи в області розвитку методу культури ізольованих тканин рослин. Цей період пов'язаний з іменами трьох видатних німецьких вчених: Х. Фьохтінга, К. Рехінгера та Г. Габерландта.

Х. Фьохтінг, вивчаючи явище полярності у рослин, пробував вирощувати *in vitro* невеличкі шматочки рослинних тканин. К. Рехінгер поміщав сегменти стебла тополі, шматочки кореня буряка і кульбаби на вологу поверхню фільтра і спостерігав процес калюсоутворення. Г. Габерландт вперше висловив ідею про можливість культивування *in vitro* ізольованих клітин рослин та запропонував гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої рослинної клітини. Однак його власні спроби культивувати на штучному живильному середовищі групи клітин палісадної паренхіми листка, епідерму традесканції були невдалими. Розрахунок Г. Габерландта на те, що хлорофілоносні клітини паренхіми забезпечать себе органічними речовинами за рахунок фотосинтезу

був помилковим. Повністю диференційовані тканини, клітини яких втратили ембріональну активність, не росли і не давали новоутворень *in vitro*, а способу їх дедиференціації Г. Габерландт не знайшов.

Період з 1902 по 1922 роки характеризується багаточисельними спробами підібрати оптимальне живильне середовище і умови сприятливі для культивування *in vitro* ізольованих органів, тканин і клітин рослин. У цей період були отримані перші результати по культивуванню тканин тварин на живильних середовищах з додаванням сивороток. Однак спроби виростити ізольовані тканини рослин на середовищах з додаванням екстрактів рослинних тканин були невдалими. В. Робінса і Котте у 1922 році одночасно і незалежно один від одного показали можливість культивування на штучному живильному середовищі меристеми кінчика кореня томатів та кукурудзи. Ці досліді можна вважати початком застосування методу культури ізольованих органів рослин.

Період з 1932 по 1939 роки починається з робіт американського дослідника Ф.Уайта та французького Р.Готре, які повторили дослід В.Роббінса і Котте і показали, що ізольовані корені можуть рости у культурі необмежено довго, якщо їх кінчики періодично пересаджувати на свіже живильне середовище. Здатність до необмеженого росту при субкультивуванні була продемонстрована пізніше цими ж авторами для калюсної тканини камбіального та паренхімного походження, а також для тканин рослинних пухлин.

У період з 1940 по 1960 рр. збільшилась кількість видів рослин до 142 видів, тканини яких вирощували *in vitro*. Виявлена потреба культур у вітамінах і стимуляторах росту. Оцінено значення натуральних екстрактів типу ендосперму кокосового горіха, каштана, кукурудзи та інших рослин для підтримання неорганізованого клітинного росту і стимуляції процесів органогенезу і соматичного ембріогенезу у культурі калюсних тканин і клітинних суспензій. У 1955 році відкрито новий клас фітогормонів – цитокініни і показано їх значення для поділу клітин *in vitro* та індукції стеблового морфогенезу. Розроблено метод отримання і вирощування великих

мас клітинних суспензій та метод культивування окремої, виділеної із суспензії клітини, поділ якої індукується за допомогою тканини-няньки.

Період з 1960 по 1975 рр. –розробка Е.К. Кокінгом методу отримання ізольованих протопластів із тканини кореня і плодів томатів шляхом обробки їх сумішшю пектолітичних та целюлітичних ферментів. Пізніше І.Такебе із співробітниками підібрали умови культивування ізольованих протопластів, за яких вони утворюють нову клітинну стінку, діляться і дають початок клітинним лініям, здатним у ряді випадків до морфогенезу. Вперше отримано і вивчено рослини-регенеранти тютюну, які були соматональними варіантами вихідної форми. Одночасно ізольовані протопласти які ще не утворили клітинну стінку, були використані для розробки методів гібридизації соматичних клітин шляхом злиття протопластів з допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) і введення в них вірусної РНК, клітинних органел, клітин бактерій.

Французьким вченим Ж. Морелем розроблено метод культури меристем, який дозволяє отримувати безвірусні рослини. За допомогою цього методу оздоровлені рослини розмножуються з високим коефіцієнтом.

Період з 1976 року і до сьогодні – розроблено метод електрозлиття ізольованих протопластів (U.Zimmerman, 1983) і методи селекції гібридних клітин. З використанням ізольованих протопластів і векторів, створених на основі Ti- та Ri-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* і *A.rhizogenes* розроблено ефективний спосіб перенесення генів для дводольних рослин.

Методи мутагенезу і клітинної селекції, отримання соматональних варіантів застосовують для створення нових форм і сортів сільськогосподарських рослин.

Методи скринінгу біохімічних мутантів привели до появи більш продуктивних і пристосованих до умов культивування клітинних штамів, які використовуються у промисловості.

В Україні експериментальні роботи по культивуванню тканин рослин започатковані 1949 рок в Інституті фізіології рослин АН УРСР. Тут у керованим професором Ф.Л.Калініним відділі росту і розвитку проведено



роботи по вивченню фізико-хімічних і біохімічних механізмів пухлинної трансформації рослинних клітин, мікроклональному розмноженню та ін.

Активний розвиток різних напрямків біотехнології рослин припадає на 70-80 роки. У цей період в Інституті ботаніки імені М.Г.Холодного під керівництвом академіка К.М.Ситника проводяться оригінальні роботи з гібридизації протопластів та клітинної селекції.

У даний час відомо приблизно 210 синтезованих рослинами речовин, що використовуються людиною, і їхня кількість постійно збільшується. Мак снотворний (род. *Papaver*) є джерелом кодеїну; з хінного дерева одержують антималярійний засіб «хінідін». Великий інтерес викликало відкриття пиретринів, виділених з квіток *Chrysanthemum cinerariaefolium*, могутніх інсектицидів. Пиретрини не викликають звикання в комах, а також не виявляють кумулятивного токсичного ефекту.

Вирощування культури тканини відбувається значно швидшими темпами у порівнянні з ростом цілої рослини. Наприклад, корінь женьшеню масою 50 г у природних умовах виростає при значних затратах праці за 6 років, а в колбі тканину такої ж маси отримують за 7-8 тижнів.

Кожній тканині притаманний певний рівень мітотичної активності, зміна якого нерідко має чітко виражений ритмічний характер. В експерименті необхідно враховувати час доби. У багатьох рослин максимум мітозів відзначається вночі, а мінімум вдень. У моменти інтенсивного поділу клітин відбувається активне накопичення алкалоїдів у тканинах, яке поступово знижується по мірі зменшення мітотичної активності і досягає мінімуму під час інтенсивного розтягнення клітин. Залежно від сезону приріст біомаси (дурман індійський та скополія гімалайська) мало змінюється, але значно коливається кількісний вміст діючих речовин.

### **Завдання до теми**

*Завдання 1.* Схематично зобразити основні історичні етапи методу культури тканин і клітин.

## Контрольні питання

1. У чому полягає суть методу культури клітин, тканин та органів рослин?
2. Які основні етапи розвитку методу культури клітин, тканин та органів рослин?

**Література:** [1, с. 164–169; 2, с. 84–89; 3, с. 60–80; 4, с. 82–90; 5, с. 373–388; 6, с. 24–155; 7, с. 100–380; 10, с. 100–130; 11, с. 110–140; 14; 16; 18, с. 120–220; 21, с. 70–140].

## Практичне заняття № 2

### Тема. Культура клітинних суспензій

**Мета:** ознайомитися з методом культури клітинних суспензій

**Навчальні елементи:** суспензійна культура, калюс, експлантат, первинна суспензія, високо диспергована суспензійна культура, глибинне культивування.

### Короткі теоретичні відомості

Культура клітинних суспензій або суспензійна культура – вирощування окремих або невеликих агрегатів у завислому (суспендованому) стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію і перемішування.

Суспензійна культура використовується для вивчення фізіологічних закономірностей росту, диференціації, метаболізму соматичних клітин вищих рослин. Особливе значення має використання біосинтетичного потенціалу рослинних клітин для промислового отримання при великомасштабному культивуванні ряду економічно цінних речовин – алкалоїдів, стероїдних сполук, глікозидів, ефірних олій, ферментів тощо.

Клітинну суспензію отримують з шматочка калюсу в рідкому середовищі, яке перемішується. Для ініціації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої калюсної маси на 60-100 мл рідкого живильного середовища. Первинну

суспензію отримують на коловому шейкері зі швидкістю перемішування 100-120 об/хв.

Суспензійну культуру можна отримати також із фрагмента органа рослини (листок, стебло, корінь). Спочатку на поверхні експлантата утворюється первинний калюс, а потім від нього відділяються клітини і клітинні агрегати, які дають початок клітинній суспензії.

Для отримання високо диспергованої суспензійної культури велике значення має тип вихідної калюсної тканини. Оптимальною є калюсна тканина пухкого типу, яка легко розсипається при внесенні в рідке середовище, що перемішується. Для цього калюс вирощують на середовищі з високою концентрацією ауксинів і зменшеною концентрацією або без цитокінінів і без іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Додавання в середовище фермента пектинази, який руйнує пектат кальцію, що склеює окремі клітини, полегшує отримання суспензії.

Необхідною умовою культивування клітинних суспензій є постійне перемішування середовища. Якщо клітинна суспензія перебуває в нерухомому стані, то ділення суспензійних клітин призводить до утворення калюсної тканини.

Первинну суспензійну культуру перед субкультивуванням фільтрують через 1-2 шари марлі, нейлонові або металічні сита, щоб позбутися від великих і щільних шматків калюсної тканини і крупних агрегатів.

Для глибинного культивування рослинних клітин користуються способами вирощування, які розроблені в мікробіології. Використовують закриті або відкриті системи в періодичному або протоковому режимах.

У закритій системі при періодичному режимі вирощування клітинна маса поміщається в певний об'єм середовища. До закінчення вирощування система залишається закритою за всіма параметрами окрім газів.

У закритій безперервній культурі у систему періодично подається свіже живильне середовище, а старе видаляється у тому ж об'ємі. Клітини залишаються в системі протягом всього періоду вирощування.

У відкриті протокові культури періодично поступає свіже середовище, однак відбирається не лише старе середовище, а й частина клітинної маси. Регуляція цього процесу може здійснюватися за принципом турбідостата або хемостата. У турбідостаті подача свіжого середовища і відбір суспензії відбуваються після досягнення клітинною суспензією певної заданої густини. Сигнал на включення поступає від реле, яке зв'язане з оптичною системою, що визначає густину суспензії. В хемостаті швидкість потоку задається експериментатором і від неї залежить швидкість росту клітинної маси. Режим хемостата дозволяє за допомогою фіксованої швидкості розбавлення підтримувати постійну швидкість поділу і густину клітин у популяції. Найпоширенішим режимом культивування клітинних суспензій є закрита періодична система. У цьому випадку для аерації і перемішування суспензії використовують різну апаратуру: ролери, шейкери (як правило колові), ферментери з механічними і магнітними змішувачами або ферментери барботажного типу, в яких аерація і перемішування здійснюється повітряним потоком.

Для роботи з суспензіями необхідно знати їхні характеристики: життєздатність, щільність клітин в суспензійній культурі, ступінь агрегованості, швидкість росту.

Життєздатність клітин визначають за їхнім забарвленням барвником (метиленова синь або синь Еванса). Живі клітини не фарбуються барвником так, як клітинні мембрани непроникні для нього. У мертві клітини фарба легко проникає, і вони забарвлюються у синій колір.

Одним із основних показників, які характеризують стан клітинної суспензії, є щільність клітинної популяції. Кількість клітин визначають в лічильній камері Фукс-Розенталя під мікроскопом після мацерації хромовою кислотою (10-20 %).

Звичайно пасаж культивування клітинної суспензії становить 14-16 днів. За цей час щільність зростає від  $5 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^6$  кл/мл.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегованості її клітин. Агрегати не повинні містити більше 10-12 клітин. Для видалення крупних агрегатів суспензії фільтрують через марлеві, нейлонові або металеві фільтри. Водночас це дозволяє позбутися від залишків експлантата або щільних шматків калюсної тканини.

Для характеристики росту культур *in vitro* в першу чергу визначають збільшення сирової маси ( $W_t - W_0$ ). Результати можуть бути виражені відносно

вихідної маси  $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}$ . Величину приросту маси можна виразити у

відсотках  $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%$ . Якщо тривалість росту неоднакова, необхідно

ввести у формулу фактор часу  $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot \frac{1}{t}$ .

### Завдання до теми

Завдання 1. Заповнити таблицю:

Суспензійна культура	Необхідні умови культивування

### Контрольні питання

1. Що таке клітинна суспензія та яке її практичне значення?
2. Калюсній тканині якого типу надається перевага для отримання клітинної суспензії?
3. Назвіть методи культивування одиночних клітин.
4. Які показники визначають для оцінки росту суспензійної культури?

**Література:** [2, с. 119–124; 4, с. 200–210; 8, с. 70–90; 9; 13, с. 200–240; 15, с. 150–200; 19, с. 140–190; 20, с. 197–225; 24, с. 209–391; 32].

### Практичне заняття № 3

#### Тема. Генетичні вектори

**Мета:** ознайомитися з особливостями введення генетичної інформації в геном.

**Навчальні елементи:** К-фактори, фактори генетичного переносу, інсекція, коліциногенний фактор, фагові вектори, трансдукція, косміди і ниткоподібні фаги.

### **Короткі теоретичні відомості**

Вектори – це молекули ДНК, які використовуються для введення чужої генетичної інтеграції і забезпечують там її ампліфікацію або інтеграцію в геном. Для виконання біологічних та генетичних функцій вектори повинні володіти відповідними властивостями:

а) здатністю до автономії (позахромосомної) реплікації і мати ділянки клонування для введення в реципієнтну клітину чужорідної ДНК, щоби стабільно підтримувати в клітині господаря чужу генетичну інформацію. Вектор повинен мати лиш один сайт рестрикції та бути репліконом:

б) мати відповідні маркери (наприклад, стійкість до антибіотиків), які дозволяють легко виявити трансформовані клітини;

в) введення чужої ДНК не повинно перевищувати суттєвих функцій вектора.

На відміну від багатьох біологічних молекул, які характеризуються широким генетичним поліформізмом, вектор, як правило, відрізняється вузькою спеціалізацією, що дозволяє використовувати його для вирішення спеціалізованих завдань. У генетичній інженерії застосовують в якості векторів плазміди, бактеріофаг  $\lambda$ , ниткоподібні бактеріофаги та косміди.

**Плазміди.** Всередині бактеріальної клітини є ядерна зона (ДНК) і цитоплазма (рибосоми). Хромосоми бактерії, які не відділені оболонкою від цитоплазми, представлені двонитковими, рідше - одноститковими молекулами нуклеїнових кислот, а в окремих випадках - тільки молекулами РНК. Генетичний апарат утворений єдиною кільцевою хромосомою без основних білків - гістонів. Типова бактерія містить біля 10-мг ДНК, що відповідає  $2 \cdot 10^9$  нуклеотидів.

Довгий час вважалося, що статевий процес у бактерій відсутній. Однак, генетичні дослідження (перш за все Д.Ледерберга) показали, що у роді

бактерій, наприклад, *E. coli*, існує примітивна форма статевого розмноження. Ледерберг виявив екстрахромосомну генетичну структуру бактерій, яка була названа фактором фертильності, кон'югації, генетичного переносу і позначена літерою P. Суть полягає в односторонньому переносі генетичного матеріалу – епісоми із однієї клітини в другу при їх кон'югації. У популяції *E. coli* виділені чоловічі бактерії  $F^+$  і жіночі  $F^-$ . Під час статевого процесу бактеріальна клітина  $F^+$  кон'югує з клітиною  $F^-$  і передає їй свій генетичний матеріал.

Статевий фактор, який містить тільки чоловічі клітини, являє собою маленьку додаткову хромосому, яка складається із ДНК. За пропозицією Д.Ледерберга статевий фактор  $F^+$  отримав назву плазміди.

Фактор P є саморепродукуючим генетичним елементом. Однак він може знаходитися в бактеріальній клітині у двох станах: автономному й інтегрованому. В автономному стані  $F^+$  – фактор не є частиною бактеріальної хромосоми і тому реплікується незалежно, хоча й синхронно з нею. При реплікації чоловічої клітини утворюються тільки чоловічі клітини. При кон'югації цитоплазматичною трубкою  $F^+$  переходить у жіночу  $F^-$  – клітину, внаслідок чого вона перетворюється в чоловічу.

Ф. Жакобу експериментально встановив, що за своєю плазмідною природою статевий фактор P, будучи саморепродукуючим генетичним елементом, лише додається до генома бактеріальної клітини і, мабуть, його присутність у клітині необов'язкова. Надалі, крім статевого фактора F, були відкриті інші малі додаткові хромосоми, існування яких також не зв'язане з функціями клітини. Це плазміди T, FP, P та інші. Ці фактори разом з F склали поняття епісоми. Такі епісоми не тільки володіють здатністю автономної реплікації, а й деякі з них, наприклад P-фактор, можуть вбудовуватися в бактеріальну хромосому.

З'ясовано, що плазмідами бактерій є молекули ДНК від 2250 до 400 тисяч пар нуклеотидів. Якщо порівнювати довжину плазміди та бактеріальної хромосоми, то виявляється, що у крупних плазмід її довжина складає біля 1 %, тоді як у дрібних – всього 0,05 % довжини хромосоми бактерій. За формою бактеріальна хромосома і плазміда не відрізняються. Як і основна хромосома

бактерій, плазмідна являє собою голу кільцеву молекулу ДНК, розташовану в цитоплазмі клітин. Об'єм інформації, сконцентрованої в малих плазмідах, дозволяє їм кодувати молекули двох і більше білків; у крупних плазмідах кодуєчі можливості достатні для 200 та більше білків.

Крім бактерій, малі кільцеві молекули ДНК (1,1–2,0 мкм діаметром) зустрічаються в цитоплазмі клітин еукаріот (у культурах клітин мишей, мавп, людини). Їх фізико-хімічні властивості вивчені добре, але біологічна роль повністю не з'ясована.

**Фактори генетичного переносу** – це не що інше, як статевий фактор Р, що зумовлює при кон'югації перенос генів. Такі плазмідні здатні до безкінечно довгого відтворення в автономному або екстрахромосомному стані. Бактерії, що містять ці плазмідні, служать генетичними донорами. Вони здатні схрещуватися з клітинами, які позбавлені плазмід.

**Фактори стійкості до лікарських речовин**, або К-фактори, контролюють синтез ферментів, які надають бактеріям стійкість до антибіотиків, сульфамідних препаратів та інших ліків, шляхом їх гідролізу або модифікації (ацетилюванням, аденілюванням, фосфорилуванням). Крім генів, що детермінують стійкість бактерій до ліків, ці плазмідні мають фактори генетичного переносу, який здійснюється шляхом утворення кон'югуючого мостика. Такі плазмідні можуть проникати в бактеріальні клітини не тільки свого, але й іншого виду, а також покидати клітину. Стабільне збереження плазмідні у клітині можливе, якщо вона містить фактори стійкості до конкретного виду ліків, наприклад, до якогось антибіотика. У цьому випадку в колонії чи клоні зберігаються тільки бактеріальні клітини, що містять дану плазмідну. Інтенсивність селекції плазмід на стійкість залежить від концентрації ліків.

Плазмідні становлять 1-3% генома бактеріальної клітини. Вони містять інформацію, необхідну для кон'югації бактеріальної клітини, ними обумовлений ряд захворювань рослин і тварин. Вони зумовлюють використання клітинами багатьох складних сполук як джерела живлення і



забезпечують стійкість до багатьох токсичних агентів, особливо до антибіотиків. Плазмиди стафілококів несуть гени стійкості до пеніциліну, сполук ртуті, ряду солей важких металів, які викликають летальний ефект (солі сурми, вісмуту, кадмію, свинцю, арсенітні й арсенатні йони). Гени стійкості до важких металів виявлені також у складі К-плазмиди *E.coli*. Наявністю плазмід обумовлені захворювання з вираженою діареєю, стафілококовим імпетіго, скисання молока і перетворення його в сир молочними бактеріями, а також різноманітні біохімічні реакції, характерні для бактерій роду *Pseudomonas*. Плазмиди можуть управляти синтезом інсектициду в клітинах *Bacillus Thuringiensis*.

Використання плазмід як векторів для введення чужорідних генів у бактеріальні клітини розпочато з 1975 року послужило поштовхом для інтенсивних досліджень їх структури і характеру реплікації.

Кількість плазмід в клітині коливається від 1 до 1000; в цілому, чим крупніші плазмиди, тим менша кількість їх копій у клітині. Звичайно реплікація плазмиди регулюється незалежно від реплікації хромосоми. Оскільки плазмиди можуть різнитися за кількістю копій в одній і тій же клітині, кількість копій повинна визначатися регуляторною системою.

Подібні регуляторні системи знайдено у плазмид стафілококів. Кількість копій плазмиди R1, скоріш за все залежить від білків, що пригнічують реплікацію. Сегмент ДНК довжиною не більше 2000 пар нуклеотидів управляє реплікацією плазмиди, яка більш ніж у 50 разів крупніша від нього.

Гени, що обумовлюють лікарську стійкість, можуть бути в плазмідних факторах К. Тоді формується ознака множинної лікарської стійкості. Інтенсивна хіміотерапія проти бактеріальної дизентерії призводить до того, що один зі штамів збудника цієї хвороби *Shigella dysenteriae* набув стійкості одночасно для всіх чотирьох використовуваних у лікарських цілях препаратів хлорамфенколу, стрептоміцину, тетрацикліну і сульфаніламідів. Явище множинної стійкості до ліків тепер широко розповсюджене у патогенних і непатогенних бактеріях (*Salmonella*, *E.coli*). Японці встановили, що до 65 %

штаму *Shigella* і 50 % штамів всіх інших кишкових бактерій, одержаних від хворих дизентерією, виявилися стійкими до стрептоміцину, тетрацикліну і хлорамфеніколу. В плазмідах поряд з декількома генами резистентності, міститься фактор переносу цієї стійкості RTF. Міграційні генетичні елементи прокариот, які кодуєть стійкість до відповідних хімічних сполук, були названі *транспозонами*.

Транспозуючі елементи відіграють активну роль в еволюції деяких бактеріальних плазмід. Транспозони здатні реплікуватися і впроваджуватися (інсекція) у вигляді однієї із копій у новому місці генома (ДНК ядра). У бактерій переважаюча частина транспозонів кодує фермент *транспоназу*, який каталізує реакцію вбудови транспозона в ДНК. При аналізі послідовності нуклеотидів у ДНК-господарі до і після вбудови транспозона виявилося, що декілька нуклеотидів (найчастіше 5) цієї ДНК огортає транспозон своїми інвертованими повторами з "липкими" кінцями.

Механізм транспозиції полягає у подвоєнні рухливих елементів з наступною вбудовою однієї з копій транспозона у певному місці генома, а друга копія залишається. Однією з важливих реакцій за участю транспозона є злиття репліконів з утворенням коінтегральної структури. Реплікон, що містить транспозон, може злитися з репліконом без транспозона. Утворений коінтеграт має дві копії транспозона (рис.3.1) по одній у кожній точці сполучення між вихідними репліконами, орієнтованими у вигляді прямих повторів.

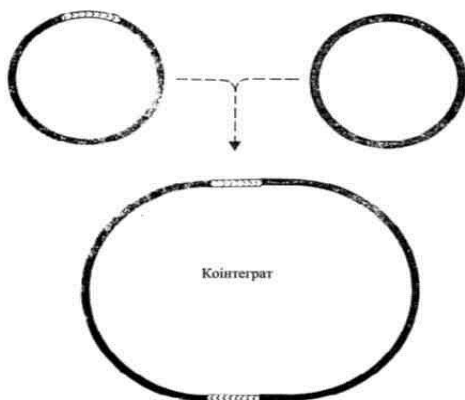


Рис.3.1.— Транспозиція може призводити до зливання донорського і реципієнтного репліконів з утворенням коінтеграту

Компоненти плазмід можуть об'єднуватися за допомогою реакцій, які включають пізнавання нуклеотидних послідовностей транспозона.

Геноми клітин чи фагів часом використовують транспозон у власних цілях. У такому випадку елемент стає статичним і відіграє роль у регуляції, беручи участь у специфічних подіях, подібних до транспозиції. І все ж, в цілому значення транспозонів у природній селекції ще повністю не вивчене. Існує припущення, що принаймні деякі транспозуючі елементи не дають ні переваг, ні шкоди клітині, а представляють собою “егоїстичну ДНК”, зайняту тільки власним розмноженням.

Згідно з цією теорією, взаємозв'язок транспозона з геномом нагадує відношення між паразитом і господарем. Однак встановлено, що довільна транспозиційна подія забезпечує селективну перевагу, наприклад, генетичні перебудови здійснюються краще геномом, який несе активний транспозон.

Як вже було відзначено, міграція транспозонів забезпечується наявністю на їх кінцях інвертованих повторів. Характерною особливістю цих послідовностей є те, що вони не містять жодних кодуєчих властивостей, тобто їм притаманна генетична інертність. У даний час добре вивчені п'ять послідовностей (181, 182, 183, 184, і 185). їх часто ототожнюють з інтронами. Так, хромосома *E.coli* містить вісім 181 та п'ять 182 -елементів, які різняться від вірусів і плазмід тим, що автономно реплікуватися не можуть. Але їх назвати повним інертним генетичним матеріалом неможливо, оскільки вони, представляючи новий вид послідовності, впливають на експресію сусідніх генів, можуть виконувати функцію нових промоторів, блокують транскрипцію дістальних генів транскрипційної одиниці, можуть індукувати делеції та інверсії, які призводять до хромосомних перебудов, володіють здатністю вбудовуватися і включатися в бактеріальний геном у різних місцях незалежно від гена *res A*.

Цікавим фактором є те, що Т псорія із дрозофіли веде себе і як транспозор, і як ретровірус (до них відноситься також вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) - СНІД). У таких вірусах інтеграція ДНК здійснюється подібно до транспозиції.

Тому небезпідставною стала гіпотеза про те, що віруси – це транспозони, які набули додаткових функцій або навпаки, транспозони – це вироджені віруси.

**Коліциногенний фактор.** Цей фактор містить гени, які викликають синтез особливих білкових речовин – коліцинів. У більшості випадків бактерії містять тільки одну таку плазмиду. Дія коліцинів характеризується різними механізмами. Плазміда *EcoRI* відноситься до групи коліциногенних факторів і забезпечує в *E.coli* синтез антибіотика коліцину. *EcoE1* являє собою кільцеподібну молекулу ДНК. У присутності антибіотика хлорамфеніколу проявляє здатність до ампліфікації (число копій на клітину досягає 3 тисячі).

Плазміда pSC101 містить ген стійкості до тетрацикліну. На відміну від плазмиди *EcoE1*, при її розщепленні рестриктазою *EcoRI* гени стійкості до антибіотика не зачіпаються. За цим селективним маркером можна віднайти клони з цією плазмідною.

**Фагові вектори.** Віруси бактерій називають бактеріофагами, або скорочено фагами. Форми фагів різноманітні, але завжди вони мають головку та хвіст. Об'єм частинок фага складає біля 0,001 % об'єму клітини *E.coli*.

Фаги зручні для вивчення генетичних комбінацій. Це обумовлено тим, що геном містить лише одну невелику за розміром хромосому, а життєвий цикл їх короткий. Встановлено, що при проникненні фага в бактерію в клітині проходить реплікація фагової ДНК, в результаті чого утворюється фонд хромосом фагів. Н.Вісконті та Д.Дельбрук у 1953 р. сформулювали теорію генетичних рекомбінацій у фагів. Згідно з цією теорією геном фагів складає внутріклітинний схрещувальний фонд. Після створення фонду проходить синтез білкових компонентів, які об'єднуються з молекулами ДНК фага, і на цій основі утворюється нове покоління фагових частин.

Відомо, що фагова хромосома у бактеріальній клітині в окремих випадках не реплікується автономно, а інтегрується в хромосому бактерії і стає ніби частиною її генетичної програми. Такі фаги одержали назву *помірних*. При введенні в хромосому бактеріальної клітини вони перетворюються у *профаги*.

Бактерія, що несе профаг, називається *лізогенною*. Вона, набуваючи

властивості фага, володіє здатністю до розмноження і створення клонів протягом ряду поколінь. За допомогою профага бактерія може набути імунітету до зараження цим видом помірною фага. При відповідних умовах у лізогенних бактеріях профаг вивільняється із хромосоми бактерії і в якості самостійної молекули ДНК реплікується та розмножується в клітині. Цикл літичного розвитку можна розділити на дві основні частини, що приведені на рис.3.2.

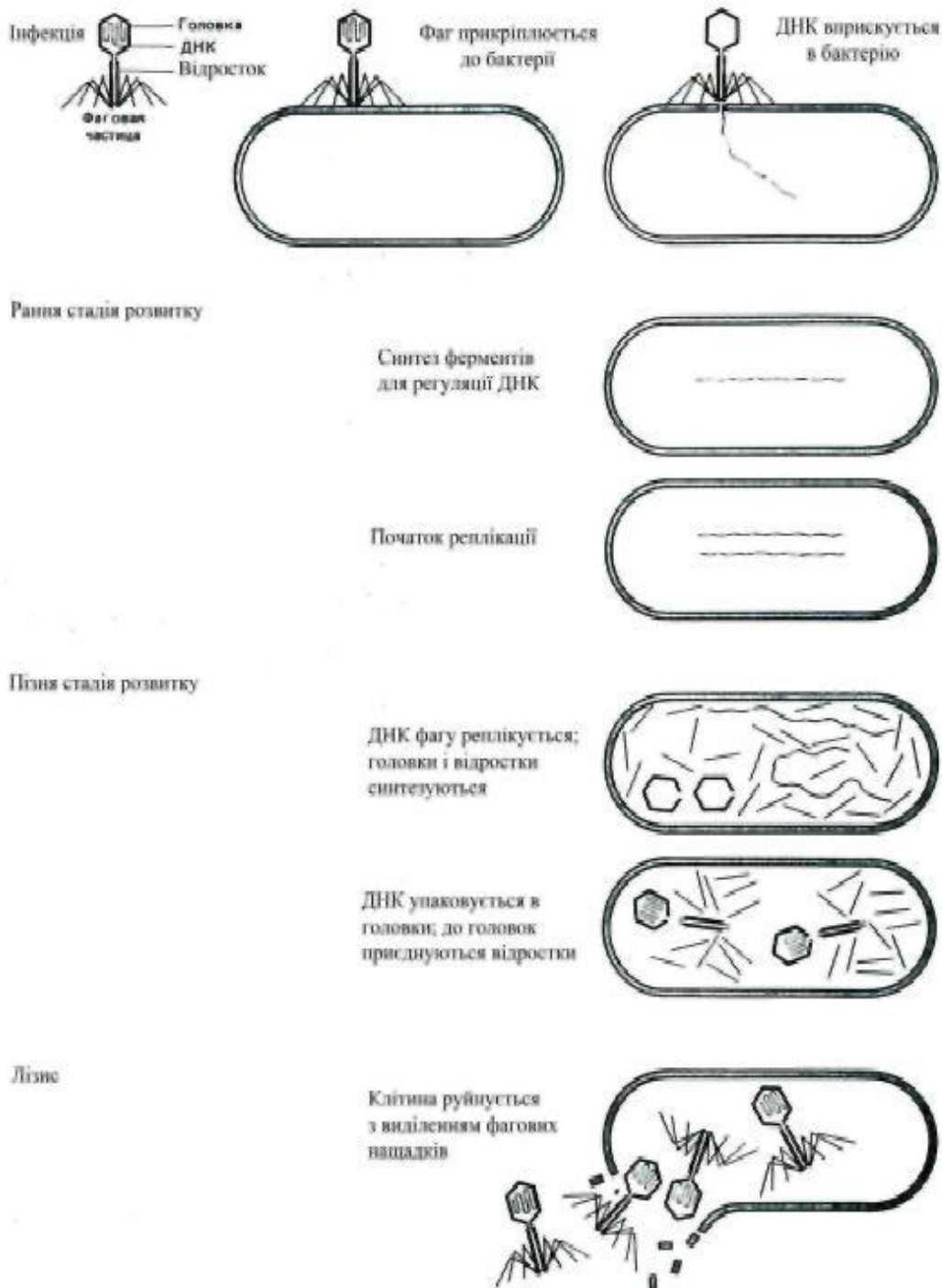


Рис.3.2. – Літичний розвиток

**Рання інфекція** включає період від проникнення ДНК в клітину до початку її реплікації. **Пізня інфекція** включає період від початку її реплікації до кінцевої стадії лізису бактеріальної клітини і виходу нащадків фагових частин. За звичайних умов рання фаза пов'язана з утворенням ферментів, які беруть участь у реплікації ДНК. Це ферменти, що здійснюють синтез ДНК, реплікацію і, часом, модифікацію. Внаслідок дії цих ферментних систем у клітині нагромаджується пул фагових геномів.

У цьому пулі геноми безперервно реплікуються і рекомбінуються таким чином, що події, які проходять навіть у процесі одного літичного циклу мають відношення до цілої популяції фагових геномів. У пізній фазі синтезуються білкові компоненти фагових частин. Для утворення головки і різних структур відростка необхідна значна кількість білків. Тому велика частина фагового генома кодує пізні функції. Поряд із цим існують так звані білки монтажу, присутність яких необхідна для конструювання частинки. Самі по собі ці білки не входять до складу фагової частинки. На той час, коли білкові компоненти монтуються в головки і відростки, реплікація досягає максимальної швидкості. Опісля, геном упроваджується у пусті білкові головки, до них приєднуються відростки і клітина підпадає лізисові. Частинки поміркованого фага виходять у зовнішнє середовище і заражають нові клітини бактерій. Таке явище називається **індукцією** і може відбуватися спонтанно та викликатися штучно. У бактерій відомі інші способи перекомбінації батьківських генів. До них відносять **трансдукцію** – явище переносу фрагменту хромосоми однієї бактерії в іншу при допомозі фага.

Фагові вектори мають ряд переваг. Їх ємність обмежена, і це дозволяє селекціонувати рекомбінантні молекули ДНК безпосередньо за молекулярною масою. Упаковують ці молекули *in vitro* в білкові капсиди, які неважко видаляти у великих кількостях.

**Косміди і ниткоподібні фаги.** Для клонування великих фрагментів ДНК і конструювання геномних бібліотек в якості векторів використовують косміди. Це плазміди, які містять вбудовану *cos*-ділянку фага *X*, внаслідок чого

плазмідна ДНК може бути упакована *in vitro* в оболонку фага. Косміди суміщають позитивні властивості плазмід і фагів, володіючи здатністю, як і плазмідни, довгий час автономно реплікуватися в клітині й упаковувати власну ДНК у головки фагів, якщо їх розмір не перевищує 93 тисяч нуклеотидних пар. Основними компонентами космідного вектора є:

- 1) плазмідний реплікон;
- 2) маркер резистентності до антибіотика;
- 3) фрагмент ДНК фага X, який містить *cos*-ділянку.

Для того, щоби мати можливість клонування фрагменти ДНК розміром до 45 тисяч пар основ, реплікон, маркер антибіотикорезистентності і *cos*-ділянка повинні розташовуватися на мінімальному фрагменті ДНК.

Головна перевага космідного вектора при конструюванні бібліотек - велика довжина фрагментів, що клонуються, та відсутність великих ділянок генома фага X, які можуть створювати труднощі при картуванні X-рекомбінантів за допомогою рестриктаз.

Недоліком космідної системи є низький вихід рекомбінантних молекул, і скринінг методом гібридизації ДНК менш ефективний, ніж для фагів. Але є відомості про використання як альтернативи для гібридизованого скринінгу, селекції космідних клонів за гомологічною рекомбінацією з плазмідною, яка кодує стійкість до додаткового антибіотика.

Одержано вектори на основі одониткових бактеріофагів. Їх перевага в тому, що ДНК, виділена із рекомбінантних фагових частинок, одониткова і може використовуватися як матриця при секвенуванні ДНК методом Сенгера. Наприклад, циклічна ДНК фага M13 має біля 6500 п.н., із яких 507 є не суттєвими для реплікації вірусу. Тому вставка в цю зону чужої ДНК практично не впливає на життєздатність фага.

Звичайно, для успішного вирішення завдань, які постають перед генетичною інженерією, необхідно володіти адекватним арсеналом методичних засобів. Очевидно для кожного організму вимагається конструювання своїх векторних систем. При цьому необхідно дотримуватися таких умов:

- а) стабільна реплікація в клітині вектора і його рекомбінантних похідних;
- б) функціональна активність генів, які вводяться в клітину;
- в) клітини, що містять вектор або його похідні, повинні легко ідентифікуватися, на відміну від вихідних, за допомогою тест-систем, заснованих на фенотиповому прояві ДНК, що вводиться в клітину;
- г) векторна ДНК та її рекомбінантні похідні в процесі ділення клітин зберігають свою структуру.

Підсумовуючи основні уявлення про структуру і функції геномів акаріотичних, прокаріотичних та еукаріотичних видів, необхідно підкреслити:

а) геном акаріот, прокаріот та мітохондрій еукаріот є компактною сукупністю генів з мінімальним вмістом структурних поворотів, що характеризує його економічність. Наприклад, вся генетична інформація помірної фаги Х розміщується у кільцевій молекулі ДНК довжиною у 50 кв, де є біля 40 генів; плазміда ДНК із 95-97 кв включає до 100 генів, кільцева ДНК *E.coli* із 400 кв може містити до 3000 генів (приблизно 1500 п.н. складає один ген);

б) генетичний апарат у клітинах еукаріот сформований декількома лінійними хромосомами, ДНК яких міцно зв'язана з білками-гістонами, які забезпечують упаковку й упорядкування нуклеїнової кислоти у вигляді структурних одиниць – нуклеосомів (враховуючи при цьому "код упаковки хроматину" та екстраполюючи його на клітини більшості еукаріот);

в) гени еукаріот у хромосомній ДНК утворюють мультигенні родини, які складаються з невиявленого числа споріднених послідовностей. Наприклад, гени, кодуєчі рРНК, у ссавців виявляються в геномі сотнями своїх копій, згрупованих у зони, а це свідчить про надлишковість генетичних програм у вищих організмах (створення "підвищеної міцності");

г) мікробні, рослинні та тваринні організми мають у складі генетичного потенціалу одні й ті ж будівельні блоки, тобто їх "кодовий словник" в основному однотипний, або універсальний, і функціонує за центральним постулатом молекулярної генетики Ф.Кріка: генетична інформація



переноситься за схемою ДНК —► РНК —► Білок (у вірусів може бути дещо змінена), але ніколи – від білка до РНК;

д) кожний ген проявляє себе (експресується) шляхом біосинтезу мРНК (транскрипція гена) з наступним переводом (трансляція) інформації у специфічний поліпептидний ланцюг, який є фактично продуктом гена. Ген і його продукт колінеарні, тобто послідовність кодонів (триплетів) у гені точно відповідає послідовності амінокислот у білку;

є) ген кодує будову білкової молекули і реалізує її синтез.

Знаючи будову й функції генів, а також володіючи методами їх виділення та переносу у різні клітини, можна впевнено реалізувати ті чи інші генноінженерні завдання біотехнології.

### Завдання до теми

Завдання 1. Заповнити таблицю:

Вид вектору	Суть методу	Позитивні сторони	Негативні сторони
Плазмідні вектори			
Фагові вектори			
косміди і ниткоподібні фаги			

### Контрольні питання

1. Якими властивостями повинні володіти вектори для виконання біологічних та генетичних функцій ?

2. Можливості використання різних типів бактеріальних векторів у генетичній інженерії.

**Література:** [1, с. 132–150; 2, с. 127–168; 5, с. 50–79; 7, с. 188–240; 12, с. 230–240; 17, с. 100–120; 22, с. 150–189; 25; 28, с. 207–263; 31].

### Практичне заняття № 4

**Тема.** Біосинтез інсуліну людини у клітинах кишкової палички

**Мета:** ознайомитись з способами одержання ферментів та гормонів.

**Навчальні елементи:** препроінсулін, екзони, інтрони, інсулін, конститутивний шлях, інкретиновий ефект.

### **Короткі теоретичні відомості**

Інсулін синтезується у  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Ген попередника інсуліну – препроінсуліну – у людини локалізується в короткому плечі 11 хромосоми. Він містить 3 екзони та 2 інтрони. В інших тварин, наприклад мишей, пацюків та трьох видів риб, наявні два гени інсуліну.

Препроінсулін людини складається із 110 амінокислот: 24 з них становлять гідрофобну N-кінцеву лідерну послідовність (сигнальний пептид), за нею розташований B-ланцюг, далі – послідовність Арг-Арг, з'єднувальний C-пептид (від англ. *connecting peptide* – з'єднувальний пептид), послідовність Ліз-Арг, та A-ланцюг на C-кінці. Лідерна послідовність необхідна для котрансляційного транспорту препроінсуліну в порожнину шорсткого ендоплазматичного ретикулуму. Після проходження через мембрану лідерна послідовність відщеплюється спеціальною сигнальною пептидазою і швидко деградує. Утворений після цього проінсулін складається із 86 амінокислотних залишків і не має гормональної активності. У ендоплазматичному ретикулумі відбувається його згортання та формування всередині молекули трьох дисульфідних зв'язків.

Після утворення правильної просторової структури проінсулін у транспортних везикулах переноситься до *цис*-сторони комплексу Гольджі. У ході руху прогормону від *цис*- до *транс*-Гольджі відбувається його відсортовування в компартмент секреторних гранул. Тут, у незрілих гранулах, проінсулін підлягає подальшій модифікації, а саме обмеженому протеолізу, що починається із дії двох прогормонконвертаз (PC2 і PC3). Ці ферменти діють специфічно на карбоксикінцевій стороні послідовності з двох позитивно заряджених амінокислот. У молекулі проінсуліну є два таких сайти: Арг31-Арг32 (місце дії PC2) та між Ліз64-Арг65 (місце дії PC3), де і відбувається розрив пептидних зв'язків. Відразу ж після прогормонконвертаз ферментативну активність проявляє карбоксипептидаза-N, яка відщеплює основні

амінокислоти від утворених кінців. Кінцевими продуктами протеолізу є молекула інсуліну та С-пептид довжиною 31 амінокислота. Порівняно із А- та В-ланцюгами інсуліну С-пептид є значно більш варіабельним у хребетних тварин, його довжина коливається від 28 (у корів) до 38 у представників родини Вудильникові.

Зрілі секреторні везикули  $\beta$ -клітин містять кристалічний інсулін у формі гексамерів з атомами цинку та еквімолярну кількість С-пептиду. Вони становлять пул гормону, готовий до екзоцитозу у відповідь на стимул. Час півжиття  $\beta$ -гранул становить кілька днів, і якщо вони не секретують свій вміст, то підлягають деградації шляхом злиття із лізосомами. При підвищеній потребі організму в інсуліні деградація відбувається повільніше.

Регуляція синтезу інсуліну відбувається на кількох рівнях, зокрема на рівні транскрипції, сплайсингу пре-мРНК, деградації мРНК, трансляції та посттрансляційної модифікації. Найсильнішим стимулятором цих процесів є глюкоза, проте біосинтез проінсуліну може активуватись також іншими цукрами, амінокислотами, зокрема лейцином, проміжними продуктами гліколізу, кетоновими тілами, гормоном росту, глюкагоном та деякими іншими факторами.

Секреція інсуліну. Бета-клітини підшлункової залози, як типові ендокринні клітини, секретують більшість (95%) свого основного продукту – інсуліну – регульованим шляхом. Найважливішим активатором цього шляху є глюкоза. У мембранах бета-клітин постійно наявні переносники глюкози GLUT2, через які вона може вільно дифундувати. Завдяки цьому збільшення концентрації глюкози в крові призводить до аналогічного підвищення її рівня і в бета-клітинах. Тут вона відразу ж стає субстратом гексокіназної реакції, продуктом якої є глюкозо-6-фосфат. В інсулін-синтезуючих клітинах підшлункової залози експресується один із ізоферментів гексокінази – гексокіназа IV або глюкокіназа, для неї характерна низька спорідненість до субстрату: константа Міхаеліса становить 10 мМ, що перевищує нормальний вміст глюкози в крові

(4-5 мМ). Завдяки цьому глюкокіназа може працювати «глюкозним сенсором», активуючись тільки в умовах гіперглікемії.

Глюкозо-6-фосфат вступає в реакції гліколізу, продукти якого далі окиснюються у мітохондріях, внаслідок чого в клітині утворюється велика кількість АТФ. Підвищення концентрації АТФ призводить до закриття АТФ-керованих калієвих каналів (англ. *ATP-gated K<sup>+</sup> channels, KATP*) у плазмалемі. Внаслідок зменшення відтоку калію із клітини мембрана деполяризується, а це веде до відкриття потенціал-керованих кальцієвих каналів і притоку кальцію в клітину. Початкове збільшення концентрації іонів Ca<sup>2+</sup> у цитозолі веде до подальшого їх вивільнення із ендоплазматичного ретикулу. Кальцій викликає злиття клатрин-облямованих бета-гранул із плазмалею і вивільнення їх вмісту в міжклітинний простір, звідки інсулін потрапляє в кров через фенестровані стінки капілярів.

На активність АТФ-керованих калієвих каналів окрім власне АТФ можуть впливати також інші речовини. Ці трансмембранні білки складаються із восьми субодиниць: чотирьох ідентичних Kir6.2 та чотирьох ідентичних SUR1. Перші формують гідрофільний тунель і відповідають за чутливість до АТФ, а другі є рецепторами до сульфанілсечовин (англ. *sulphonylurea receptor*) і можуть інактивувати канал після зв'язування зі своїм лігандом. Таким чином сульфанілсечовини активують синтез інсуліну, завдяки чому використовуються як пероральні цукрознижувальні препарати при цукровому діабеті.

Окрім регульованого існує так званий «конститутивний шлях» секреції інсуліну бета-клітинами, він працює за певних розладів, таких як інсулінома та цукровий діабет другого типу. У цьому випадку велика кількість незрілого гормону (проінсуліну або проміжних «розщеплених» форм) виділяється прямо із везикул, що утворюються в ендоплазматичному ретикулумі.

Регуляція секреції інсуліну. Острівці Лангерганса густо іннервовані автономними та пептидергічними нервовими волокнами. Холінергічні закінчення блукаючого нерва, що є частиною парасимпатичної нервової системи стимулюють секрецію інсуліну, у той час як адренергічні закінчення

симпатичної нервової системи пригнічують цей процес. Інші нерви виділяють вазоактивний інтестинальний пептид, що стимулює секрецію всіх гормонів підшлункової залози, та нейропептид Y, що блокує виділення інсуліну.

Власні гормони підшлункової залози також мають вплив на секрецію інсуліну: глюкагон стимулює її, а соматостатин – пригнічує. Окрім того інсулін діє аутокринно активуючи транскрипцію власного гену і гену глюкокінази.

Під час прийому їжі секреція інсуліну збільшується під впливом глюкози або вуглеводів, амінокислот, особливо лейцину і аргініну, деяких гормонів травної системи системи: холецистокініну, глюкозозалежного інсулінотропного пептиду, а також таких гормонів, як глюкагон, адренкортикотропний гормон, естроген та інші. Також секрецію інсуліну підсилює підвищення рівня калію або кальцію, вільних жирних кислот у плазмі крові.

Інкретинний ефект – це феномен, що полягає у виділенні значно більшої кількості інсуліну, у відповідь на пероральне вживання глюкози у порівнянні із її внутрішньовенним введенням. За це явище відповідають гормони травного тракту, що секретуються під час вживання їжі і посилюють глюкозо-стимульоване вивільнення інсуліну. До інкретинних гормонів належать зокрема глюкагоноподібний пептид-1 та шлунковий інгібуючий поліпептид, перший із них секретуються L-, а другий – K-клітинами верхньої частини порожньої кишки.

### **Завдання до теми**

Завдання 1. Підготувати повідомлення про синтез гормонів та ферментів.

Завдання 2. Створити хронологічну схему досліджень одержання інсуліну.

### **Контрольні питання**

1. Охарактеризувати одержання генно-інженерного інсуліну людини.

2. Дати поняття інкретинного ефекту.

**Література:** [1, с. 38–44; 2, с. 313–317; 4, с. 112–190; 5, с. 205–206; 23, с. 300–480; 27, с. 94–300; 29, с. 103–187; 30, с. 67–108].

## **2 КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ**

### **A 5 (відмінно) 90–100**

Студент має глибокі, міцні і системні знання з усього теоретичного курсу, може чітко сформулювати та використовує у своїх відповідях спеціальну термінологію, володіє латинськими назвами, володіє понятійним апаратом; уміє застосувати здобуті теоретичні знання під час розв'язання практичних завдань, що стосується нових технологій дослідження структури клітини; самостійно може підготувати змістовний реферат і захистити основні його положення.

### **B 4,5 (добре) 85–89**

Студент має глибокі, міцні та системні знання з усього теоретичного курсу, може чітко сформулювати та використовує у своїх відповідях спеціальну термінологію, володіє понятійним апаратом, латинськими назвами, але у своїх відповідях може допустити неточності, зустрічаються незначні помилки під час виконання завдань; самостійно може підготувати змістовний реферат і захистити основні його положення.

### **C 4 (добре) 75–84**

Студент знає програмний матеріал у повному обсязі, має практичні вміння, але не вміє самостійно логічно мислити, зокрема, підготувати реферат і захищати його положення. Відповідь його повна, змістовна, але з певними неточностями.

### **D 3,5 (задовільно) 65–74**

Студент відтворює значну частину теоретичного матеріалу, виявляє знання і розуміння основних положень, за допомогою викладача може аналізувати матеріал, виправляти помилки, серед яких є значна кількість суттєвих. За допомогою викладача може підготувати реферативну роботу.

### **E 3 (задовільно) 60–64**

Студент має початковий рівень знань, володіє необхідними вміннями та

навичками для вирішення стандартних завдань; виявляє розуміння основних положень навчального матеріалу на репродуктивному (відтворюючому) рівні; здатний з помилками дати визначення понять та термінів, що вивчаються; може самостійно оволодівати частиною навчального матеріалу, але висновки робить нелогічні, непослідовні.

### **FX 2 (незадовільно) 35–59**

Студент мало усвідомлює мету навчально-пізнавальної діяльності; слабо орієнтується в поняттях, визначеннях; самостійне опрацювання навчального матеріалу викликає значні труднощі; робить спробу розповісти суть заданого, але відповідає лише за допомогою викладача на рівні «так» чи «ні»; однак може самостійно знайти в підручнику відповідь.

### **X 1 (незадовільно) 1–34**

Студент зовсім не володіє необхідними знаннями, уміннями, навичками та науковими термінами з дисципліни, що вивчається, зовсім не здатний до самостійного вивчення дисципліни.

Підсумковий контроль з дисципліни здійснюється у вигляді заліку, що проводиться після закінчення семестру (закінчення курсу). Отримана кількість балів переводиться в національну шкалу відповідно до таблиці, наведеної нижче, та виставляється в екзаменаційну відомість.

Відповідність рейтингових балів і національної шкали оцінювання:

Оцінка за 100-бальною шкалою	Оцінка за національною шкалою
60–100	«зараховано»
1–34	«не зараховано»

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

### Основна

1. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : [пер. с англ.] ; под ред., с предисл. и дополн. В. Г. Дебабова. – М.: Мир, 1987. – 422 с.
2. Герасименко В. Г. Биотехнология : учеб. пособие / В. Г. Герасименко. – К.: Вища школа, 1989. – 343 с.
3. Бекер М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
4. Клунова С. М. Биотехнология / С. М. Клунова и др. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 488 с.
6. Пинаев Г.П. Клеточная биотехнология / Г. П. Пинаев, М. И. Блинова, Н. С. Николаенко, Г. Г. Полянская, Т. Н. Ефремова, Н. С. Шарлаимова, Н. А. Шубин. – СПб: Изд-во Политех-го ун-та, 2011. – 224 с.
7. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии : учебник / В. Н. Рыбчин; 2-е изд., перераб. и доп. – СПб: СПбГТУ, 2002. – 522 с.
8. Руденко С. С. Генетична інженерія: навч. посібник / С. С. Руденко. – Чернівці: Рута, 1997. – 182 с.
9. Ніколайчук С. І. Генетична інженерія / С. І. Ніколайчук, І. Ю. Горбатенко. – Ужгород, 1999. – 101 с.
10. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений / Н. В. Кучук. – Киев: Наук. думка, 1997. – 152 с.
11. Валиханова Г. Ж. Биотехнология растений / Г. Ж. Валиханова. – Алматы: Конжик, 1996. – 154 с.
12. Мельничук М. Д. Основи біотехнології рослин: підручник / [М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, Б. О. Левенко]. – К.: Вища шк., 2000. – 248 с.



13. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – Киев: Наук. Думка, 1990. – 280 с.
14. Глеба Ю. Ю. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю. Ю. Глеба, К. М. Ситник. – Киев: Наук. думка, 1982. – 102 с.
15. Калинин Ф. Л. Культура клеток и тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, Л. П. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1989. – 332 с.
16. Левенко Б. А. Трансгенные растения. Современное состояние. Проблемы. Перспективы / Б. А. Левенко. – Киев, 2000. – 305 с.
17. Лутова Л. А. Генетика развития растений / Л. А. Лутова, Н. А. Проворов, О. Н. Тиходеев и др. – СПб: Наука, 2000. – 359 с.
18. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений / Л. А. Лутова. – СПб: Изд-во С.-Петербур.ун-та, 2003. – 228 с.
19. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин / С. Д. Рудишин. – Вінниця, 1998. – 224 с.
20. Вечернина Н. А. Биотехнология растений / Н. А. Вечернина. – Барнаул: АлтГУ, 2009. – 224 с.
21. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р. А. Диксон. – М.: ВО Агропромиздат, 1989. – 280 с.
22. Вечернина Н. А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений / Н. А. Вечернина. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2004. – 205 с.
23. Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования / Под ред. В. И. Негрука ; пер. с англ. Г. И. Эйснер. – М.: Агропромиздат, 1991. – 534 с.
24. Генная инженерия растений: лабораторное руководство; пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера и др. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
25. Пузік В. К. Культура ізольованих органів, тканин і клітин в біотехнології рослин: навч. посіб. / В. К. Пузік. – Х.: ХДАУ, 1997. – 98 с.

26. Черепенко Е. И. Проблема репликации ДНК и генетические манипуляции с растениями / Е. И. Черепенко, А. П. Галкин. – К.: Наук. думка, 1987. – 160 с.

27. Албертс Брюс Молекулярная биология клетки : в 3. т. / Албертс Брюс, Брей Деннис, Льюис Джулиан, Рэфф Мартин, Робертс Кейт, Уотсон Джеймс Д. : пер. Т. Н. Власик. – 2. изд., перераб. и доп.; Т. 1. – М. : Мир, 1994. – 517 с.

28. Стрельчук С. І. Генетика з основами селекції: підручник / С. І. Стрельчук, С. В. Демідов, Г. Д. Бердишев, Д. М. Голда. – К.: Фітосоціоцентр, 2000. – 291 с.

29. Варфоломеев С. Д. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М.: Высш. шк., 1990. – 296 с.

30. Бужієвська Т. І. Основи медичної генетики: навч. посіб / Т. І. Бужієвська. – К.: Здоров'я, 2001. – 136 с.

### **Додаткова**

31. Глазко В. И. Словарь терминов по прикладной генетике и ДНК технологиям / В. И. Глазко. – К.: КВЦ, 1999. – 342 с.

32. Глазко В. И. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике / В. И. Глазко, Г. В. Глазко. – К.: Нора-принт, 2000. – 464 с.

Методичні вказівки щодо практичних занять з навчальної дисципліни «Біоінженерія» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладач : к. т. н., ст. викл. О. А. Саун

Відповідальний за випуск доц. кафедри біотехнології та здоров'я людини:  
А. В. Пасенко

Підп. до др. \_\_\_\_\_ 2017 р. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.

Ум. друк. арк. \_\_\_\_\_. Наклад \_\_\_\_\_ прим. Зам. № \_\_\_\_\_. Безкоштовно.

Видавничий відділ  
Кременчуцького національного університету  
імені Михайла Остроградського  
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600

