

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

Конспект лекцій

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня доктора філософії
за освітньою програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Електронне мережеве навчальне видання

Київ
КПІ ім. ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО
2025

УДК 577+602
Г34

Укладачі: *Клечак Інна Рішардівна*, канд. техн. наук, доцент
Зубик Павло Романович
Хабленко Анна Дмитрівна
Ліновицька Віта Михайлівна, канд. біол. наук

Рецензент *Толстопалова Н. М.*, канд. техн. наук, доцент,
доцент кафедри технології неорганічних речовин, водоочищення та
загальної хімічної технології, ХТФ, КПІ ім. Ігоря Сікорського

Відповідальний
редактор *Поліщук В. Ю.*, канд. техн. наук

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 6 від 10.04.2025 року)
за поданням вченої ради факультету біотехнології і біотехніки
(протокол № 8 від 24.03.2025 року)*

Г34 **Генетичні дослідження в біотехнології.** Конспект лекцій [Електронний ресурс] : навч. посіб. для здобувачів ступеня доктора філософії за освіт. програмою «Біотехнології» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: І. Р. Клечак та ін. – Електрон. текст. дані (1 файл). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025. – 66 с.

В навчальному посібнику розглядаються прикладні аспекти генно-інженерних досліджень в різних галузях. Конспект лекцій призначений для здобувачів ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія». Буде також корисним для фахівців, які проводять генетичні дослідження в біотехнології.

УДК 577+602

Реєстр. № НП 24/25-469. Обсяг 2,4 авт. арк.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
проспект Берестейський, 37, м. Київ, 03056
<https://kpi.ua>

Свідectво про внесення до Державного реєстру видавців, виготовлювачів
і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5354 від 25.05.2017 р.

© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ЛЕКЦІЇ 1-2.....	5
ЛЕКЦІЇ 3-4.....	20
ЛЕКЦІЯ 5.....	32
ЛЕКЦІЯ 6 -7.....	41
ЛЕКЦІЯ 8.....	52
ЛЕКЦІЯ 9.....	58
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	63
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	65

ВСТУП

Дисципліна «Генетичні дослідження в біотехнології» викладається для здобувачів третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнологія і біоінженерії». Її необхідність визначається потребою ефективної підготовки здобувачів до самостійної, творчої дослідницької діяльності в умовах впровадження ефективних біотехнологій. Майбутній науковець-біотехнолог повинен розв'язувати комплексні проблеми в сфері біотехнологій та біоінженерії, виконувати оригінальні дослідження, розробляти нові та вдосконалювати існуючі біотехнології. Дана дисципліна повинна ознайомити студента з сучасними методами аналізу геному та сучасними підходами до отримання цільового продукту, сприяти формуванню наукового світогляду.

Для успішного вивчення дисципліни, отримання необхідних знань і формування умінь здобувачам необхідні знання, одержані при вивченні дисциплін: біологія клітини, загальна та молекулярна генетика, основи генетичної та клітинної інженерії, проблемні питання сучасної біотехнології, системний аналіз біотехнологічних об'єктів, клітинні біотехнології, імунобіотехнологія та знання іноземної мови не нижче рівня А2 і інформаційних технологій на рівні користувача.

Дисципліна «Генетичні дослідження в біотехнології» має безпосередній зв'язок практично зі всіма дисциплінами, що вивчаються протягом всього часу оволодіння здобувачами освітньо-наукової програми зі спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія та з їх науковою діяльністю, тому окрім вивчення матеріалу на лекціях і практичних, передбачається поглиблене вивчення матеріалу самостійно з проведенням консультацій та дискусій на лекційних заняттях.

ЛЕКЦІЇ 1-2
БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ
(4 ГОДИНИ)

1. Генетична інженерія як галузь біотехнології: досягнення у промисловості, сільському господарстві, медицині, екології. Застосування генно-модифікованих організмів
2. Об'єкти генетичної інженерії
3. Особливості експресії еукаріотичних генів в прокаріотичних клітинах
4. Суперпродукція і проблеми стабільності штамів

Генетична інженерія – це сукупність методів і технологій, спрямованих на зміну або маніпулювання генетичним матеріалом організмів з метою отримання нових властивостей у організмів або клітин. Вона є важливою складовою біотехнології та молекулярної біології і використовується в багатьох сферах, таких як медична, агрономічна та екологічна науки та в промисловості. Генетична інженерія дозволяє вирішувати задачі, які неможливо вирішити традиційними методами селекції або хімічної технології. Основні напрямки генетичної інженерії включають створення генетично модифікованих організмів (ГМО), синтез нових молекул (наприклад, лікарських препаратів), а також дослідження функціонування генів і білків. Ідея маніпулювання генетичним матеріалом стала популярною після відкриття у 1953 році Д. Уотсоном і Ф. Кріком структури ДНК. Вже в 1970-ті роки науковці почали використовувати технології для ізоляції окремих генів та їх перенесення до інших організмів, що стало основою для розвитку генетичної інженерії. У 1973 році С. Коен та Г. Бойєр успішно реалізували перше клонування гена, що стало поворотним моментом у розвитку цієї науки.

1. Генетична інженерія як галузь біотехнології: досягнення у промисловості, сільському господарстві, медицині, екології. Застосування генно-модифікованих організмів

Генетична інженерія є ключовою галуззю сучасної біотехнології, що охоплює цілеспрямовані зміни генетичного матеріалу організмів для надання їм нових властивостей. Завдяки використанню рекомбінантних ДНК-технологій, генетична інженерія забезпечує значний прогрес у різних сферах (рис. 1), включаючи промисловість, сільське господарство, медицину та екологію.



Рисунок 1 – Галузі застосування генетичної інженерії [24]

Генетично модифіковані організми (ГМО) мають величезний потенціал у *сільському господарстві*. Завдяки генетичній інженерії стало можливим створення рослин, які мають поліпшені властивості, що дозволяє збільшити врожайність, з підвищеною стійкістю до хвороб, шкідників, несприятливих або стресових умов навколишнього середовища, таких як посухи. Наприклад:

1) Культури, стійкі до гербіцидів (такі як соя та кукурудза), дозволяють значно підвищити врожайність, оскільки фермери можуть застосовувати гербіциди без шкоди для самих рослин. Один з найвідоміших прикладів таких рослин це – Roundup Ready соя, яка була розроблена компанією Monsanto. Ця культура стійка до гербіциду гліфосату, що дозволяє сільським господарствам обробляти поля гербіцидом, знищуючи бур'яни, але не пошкоджуючи самі рослини. Завдяки такому підходу фермери можуть збільшити урожайність і знизити витрати на боротьбу з бур'янами.

2) Створення рослин з підвищеним вмістом поживних речовин («золотий рис», збагачений вітаміном А). Цей вид рису був створений з метою боротьби з дефіцитом вітаміну А в країнах, що розвиваються. Золотий рис містить підвищену кількість бета-каротину — прекурсора вітаміну А, що допомагає запобігати сліпоті через авітаміноз.

3) Поліпшення резистентності до вірусних інфекцій, наприклад, модифікація тютюну для боротьби з вірусами.

Генетична інженерія внесла значний внесок в *медицину*, особливо у виготовлення біопрепаратів та розвиток *методів генотерапії*. Медична біотехнологія активно використовує генетичну інженерію для розробки ліків і терапевтичних методів. Один з основних напрямків — це використання рекомбінантних білків для лікування різноманітних хвороб. Наприклад, гормони, такі як інсулін, можна виробляти в бактеріальних клітинах, що забезпечує масове виробництво необхідних ліків. Наприклад:

1) Рекомбінантний інсулін є одним із перших великих досягнень у генетичній інженерії. Його почали виробляти в 1980-ті роки в бактерії *E. coli*. Це значно знизило витрати на виробництво інсуліну і зробило його доступним для мільйонів людей, хворих на цукровий діабет.

2) Ще одним важливим напрямом є генна терапія, яка передбачає введення генів для лікування спадкових хвороб. За допомогою генної терапії можливе усунення дефектних генів, заміна їх на нормальні або корекція генів для виправлення мутацій, що призводять до хвороб. Генотерапія передбачає

внесення нормальних генів в організм пацієнта, щоб виправити мутації, що призводять до захворювань. Одним із таких прикладів є використання генотерапії для лікування муковісцидозу – важкої спадкової хвороби, яка викликає порушення в дихальних шляхах і травному тракті. Генна терапія на основі використання вірусів-векторів дозволяє доставляти функціональні копії дефектних генів у клітини пацієнта.

Генетична інженерія має великий потенціал для боротьби з *екологічними проблемами*, такими як забруднення навколишнього середовища, зокрема очищення забруднених вод або ґрунтів. Так звані бактерії для біоремедіації, які модифіковані за здатністю розкласти токсичні речовини, стали важливим інструментом в боротьбі з екологічними катастрофами.

Інші приклади застосування включають:

- Створення рослин, що можуть поглинати важкі метали з ґрунтів, що дозволяє очищати забруднені території.
- Розробка організмів для усунення нафтових плям або зниження рівня забруднення води.

Використання генетично модифікованих бактерій для *очищення нафтових плям* є яскравим прикладом біоремедіації. Бактерії, модифіковані для розкладання нафту або її компонентів, були використані під час великої нафтової катастрофи в Мексиканській затоці в 2010 році, де вони допомогли знизити рівень забруднення в океані.

2. Об'єкти генетичної інженерії

У генетичній інженерії основними об'єктами є живі організми, у яких проводяться зміни генетичної інформації. Об'єктами генетичної інженерії є як мікроорганізми, так і еукаріотичні клітини та організми. Основні об'єкти включають:

- Прокаріоти (бактерії, археї) – часто використовуються як система для експресії генів завдяки простоті в обробці та швидкому розмноженню.

- Еукаріоти (рослини, тварини, дріжджі) – для більш складних і спеціалізованих застосувань, наприклад, виробництва фармацевтичних білків.
- Віруси – використовуються як вектори для переносу генетичного матеріалу до клітин.

Прокаріоти є одними з найбільш популярних об'єктів для генетичних маніпуляцій через їх простоту, швидкий ріст та відносно низькі вимоги до умов культивування. Одним з найбільш використовуваних організмів є *E. coli* – модельний організм для молекулярної біології. Бактерії здатні швидко реплікувати ДНК, що дозволяє легко отримувати велику кількість рекомбінантних молекул.

Важливими перевагами прокаріотів є:

- Легкість трансформації.
- Швидкий ріст.
- Можливість використання недорогих середовищ для їх культивування.
- Висока ефективність в експресії білків.

Еукаріоти мають складніший механізм регуляції генетичної інформації, що робить їх більш відповідними для певних типів досліджень, зокрема для експресії складних білків, які потребують посттрансляційних модифікацій, таких як глікозилювання. До еукаріотичних організмів, що використовуються у генетичній інженерії, відносяться дріжджі, клітини ссавців, рослини та інші.

Дріжджі є корисними для створення трансгенних організмів завдяки їх здатності до посттрансляційних модифікацій, а клітини ссавців використовуються в основному для виробництва терапевтичних білків, таких як антитіла.

Віруси можуть бути використані як вектори для введення чужих генів у клітини. Вони здатні доставляти генетичний матеріал безпосередньо в клітини-хазяї, що робить їх дуже ефективними для створення трансгенних організмів, а також для генотерапії та створення вакцин. Відомими

прикладом є використання аденовірусів та лентівірусів для транспортування генетичного матеріалу.

Вибір об'єкту для генетичної інженерії. Вибір об'єкту для проведення генетичних модифікацій залежить від *конкретної мети дослідження*, тобто від того, для чого саме буде використано генетично модифікований організм. Для виробництва білків або інших молекул використовуються прокаріоти або дріжджі, оскільки вони мають просту генетичну структуру, здатні швидко рости та експресувати рекомбінантні гени. Для отримання нових сортів рослин часто використовуються рослини, здатні до трансформації *Agrobacterium tumefaciens*. Для генотерапії зазвичай використовуються клітини ссавців, оскільки вони мають складніший механізм регуляції і здатні виконувати всі необхідні посттрансляційні модифікації.

Другий критерій при виборі об'єкту - *молекулярна сумісність*, тобто здатність організмів для клонування рекомбінантної ДНК, зокрема можливість ефективної трансформації або трансфекції.

Звичайно, необхідно також враховувати такі критерії, як *простота культивування* та *економічна доцільність*. Таким чином, необхідно вибирати організм, який легко вирощувати і контролювати в лабораторних та промислових умовах, а також провести оцінку вартості і вигоди від застосування конкретного організму.

Дослідження в генетичній інженерії проходять *кілька ключових етапів*:

- а) Підготовчий етап: огляд наукової літератури, вибір об'єкта і визначення завдань дослідження. Це може включати клінічні, агрономічні чи біотехнологічні напрямки.
- б) Молекулярно-біологічні маніпуляції: отримання та введення генів з використанням методів клонування та інші молекулярно-біологічні методи (наприклад, ПЛР, рестрикційні ферменти, трансфекція, трансформація).

- c) Етап експресії: перевірка функціональності введеного гену та синтез білка (використання кількісних та якісних методів для перевірки експресії генів)
- d) Етап оптимізації: оцінка стабільності і ефективності нових властивостей чи продуктів, отриманих після генетичних змін.

Кожен етап є критичним для досягнення бажаних результатів.

На *підготовчому етапі* проводять вибір об'єкта та мети дослідження. У цей період проводиться аналіз наукової літератури, вивчення існуючих методів і підходів. Формулюється наукова гіпотеза і розробляється експериментальний план.

На *наступному етапі* використовують хімічний метод синтезу гену або його частини, або вирізання необхідного гену за допомогою спеціалізованих ферментів – ендонуклеаз рестрикції, або отримання гену за допомогою синтезу на мРНК з використанням зворотної транскрипції. Потім ген поєднують з вектором, за допомогою якого переносять його в цільову клітину в складі рекомбінантної конструкції. Наприклад, для отримання рекомбінантного інсуліну з людського гену використовують ферменти для вирізання потрібного фрагменту ДНК і вставки його в плазмідний вектор.

Після створення конструкції необхідно ввести її в клітину-реципієнт. Це може бути зроблено за допомогою трансформації (для прокаріотичних клітин), трансфекції (для еукаріотичних клітин) або з використанням вірусних векторів.

Для підвищення ефективності природної трансформації можна застосовувати:

- Хімічну трансформацію: клітини обробляють хімічними сполуками (наприклад, кальцієвими солями), щоб активувати пори в клітинній мембрані.
- Електропорацію: ДНК вводиться в клітини за допомогою електричного поля.

Застосування фагових систем є складнішим і вимагає додаткових ресурсів для оптимізації умов експресії.

Після трансформації клітин необхідно вибрати ті, що успішно інтегрували чужорідний ген. Для цього часто використовують селекційні маркери (наприклад, стійкість до антибіотиків).

На наступному етапі необхідно оцінити ефективність процесів переносу. Отримані результати аналізуються для визначення найбільш ефективних умов експресії гена, а також для виявлення потенційних проблем, таких як нестабільність штаму чи утворення включень. Для цього використовуються методи ПЛР, вестерн блотінг, імуноферментні методи та інші методики.

Експресія еукаріотичних білків у прокаріотичних клітинах є важливою проблемою генетичної інженерії. Прокаріоти, як бактерії, не здатні до виконання всіх посттрансляційних модифікацій, які властиві еукаріотам (наприклад, глікозилювання). Однак, вони можуть бути дуже корисними для швидкої та економічної експресії білків.

У прокаріотах та еукаріотах процеси транскрипції і трансляції суттєво відрізняються. У прокаріотичних клітинах процеси відбуваються одночасно в цитоплазмі, оскільки відсутня ядерна мембрана. У еукаріотичних клітинах транскрипція відбувається в ядрі, а трансляція – в цитоплазмі. Ці відмінності можуть бути важливими при спробах експресії еукаріотичних генів у прокаріотах.

3. Особливості експресії еукаріотичних генів в прокаріотичних клітинах

Експресія еукаріотичних білків у прокаріотичних клітинах супроводжується цілою низкою проблем, основними з яких є:

Нездатність прокаріотів до посттрансляційних модифікацій.

Багато еукаріотичних білків потребують специфічних хімічних змін після

синтезу, таких як фосфорилування або глікозилування, які прокаріоти не здатні виконувати.

Неправильне складання білка. Оскільки у прокаріотах відсутні складні молекулярні комплекси для правильного складання білків, це може призвести до утворення агрегацій або інклюдій, що є важкою проблемою для подальшої роботи з білком.

Нестабільність рекомбінантних білків. Прокаріоти можуть не витримувати високу концентрацію екзогенних білків, що може призвести до їх денатурації або токсичності для клітини.

Одним з найбільш відомих прикладів експресії еукаріотичного білка в прокаріотах є виробництво *людського інсуліну* за допомогою бактерії *E. coli*. Для цього була сконструйована рекомбінантна молекула ДНК, що містила ген інсуліну. Бактерії, отримавши цю конструкцію, почали синтезувати інсулін, який потім очищався та використовувався для лікування пацієнтів з діабетом. Однак в процесі отримання інсуліну виникали проблеми зі складенням білка та утворенням інклюдій. Для вирішення цієї проблеми розробили спеціальні штами *E. coli*, що мали полегшений шлях до правильного складання білків.

Інший приклад – експресія людських антитіл, таких як *моноклональні антитіла*, в *E. coli*. Для цього використовуються спеціалізовані штами, що містять систему шаперонів, яка допомагає в правильному складанні антитіл. Одним із найбільших досягнень у цьому напрямку є розробка лікувальних моноклональних антитіл, таких як трастузумаб, які використовуються для лікування раку молочної залози.

Часто еукаріотичні білки в бактеріальних клітинах утворюють агрегації або включення. Це означає, що білок складається неправильно або денатурується. Це може бути через низьку температуру або специфічні умови культивування, за яких білок може не складатися належним чином або через надмірну кількість рекомбінантного білка, що призводить до перевантаження клітини.

Існують кілька підходів для покращення експресії еукаріотичних білків у прокаріотичних клітинах.

Регулювання експресії білка за допомогою сильних промоторів.

Прокаріотичні клітини використовують промотори для запуску транскрипції генів. Промотори можуть бути природного походження (наприклад, *lac-промотором*, який індукується за допомогою ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиду, IPTG) або синтетичними (дозволяють чітко контролювати рівень експресії).

У разі використання *lac-промотора* бактерії можна тримати в неактивному стані до додавання індуктора (IPTG). Це дозволяє контролювати експресію білка, щоб уникнути надмірної токсичності для клітини. Після того, як ген потрапив до клітини, він стає доступним для транскрипції бактеріальними РНК-полімеразами. Оскільки прокаріоти не мають ядра, цей процес відбувається в цитоплазмі одночасно з трансляцією.

Трансляція може бути проблемною для еукаріотичних білків, оскільки вони часто потребують специфічних посттрансляційних модифікацій, яких прокаріоти не здатні здійснювати. Прокаріоти також можуть мати труднощі з правильним складанням складних білків.

Для того щоб мінімізувати утворення агрегатів, часто використовуються шаперони, які допомагають правильному складанню білка. Наприклад, *GroEL/GroES* – це комплекс шаперонів у бактерій, який допомагає складати білки в правильну конформацію.

Використання спеціалізованих штамів бактерій. Для покращення експресії також використовують спеціалізовані штами бактерій, які здатні коригувати неправильно складені білки. Вони мають модифікації для кращої експресії еукаріотичних білків або використовуються клітини еукаріотів (дріжджі, ссавці) для синтезу складних молекул.

Спеціалізовані штами бактерій, такі як BL21(DE3), були розроблені для покращення експресії білків. Ці штами мають дефекти в певних метаболічних

шляхах, що дозволяє зменшити токсичність рекомбінантних білків і підвищити вихід кінцевого продукту.

Виведення білків у периплазматичний простір. Іншим методом є направлення білків у периплазматичний простір, що дозволяє зменшити їх токсичність для клітини. Такий підхід застосовують для білків, які можуть бути токсичними в цитоплазмі, але є стабільними в міжклітинному просторі.

Використання шокової термотерапії. Використання шокової термотерапії допомагає зменшити утворення включень і є одним із способів підвищення ефективності експресії. Вона передбачає зменшення температури під час культивування бактерій, що допомагає уникнути агрегації білків і збільшує їх вихід.

Загалом, кожен з етапів експресії еукаріотичних білків у прокаріотичних клітинах є критичним і потребує детальної оптимізації. Розв'язання таких проблем, як агрегація білків або суперпродукція, вимагає використання спеціалізованих методів і вдосконалених технологій для забезпечення стабільної експресії білка та його ефективного очищення.

4. Суперпродукція і проблеми стабільності штамів

Суперпродукція білків – це процес, при якому клітина виробляє надмірну кількість білка, вона є важливою задачею в генетичній інженерії, особливо при масовому виробництві лікарських препаратів чи ферментів. Проте цей процес супроводжується рядом проблем:

- Навантаження на клітинні механізми: велика кількість білка може заважати нормальному функціонуванню клітин, викликаючи стрес.
- Накопичення інклюзій – агрегацій білка, які є нерозчинними і не можуть бути використані для подальших досліджень або терапевтичних цілей
- Нестабільність рекомбінантного гена. Проблема полягає в тому, що в результаті високої експресії гену може виникати мутація або втрата гена в наступних поколіннях клітин.

- Проблеми з очищенням білків. Високий рівень білка в клітині може ускладнити подальше очищення білка, особливо якщо він накопичується у вигляді включень.

Відомий приклад суперпродукції – це модифіковані для виробництва рекомбінантної β -галактозидази бактерії *E. coli*. При високому рівні експресії цього білка в клітинах утворювались великі включення, що знижувало життєздатність клітин і ускладнювало подальшу очистку білка.

Для вирішення цих проблем часто використовують такий підхід, як зміна температури або середовище для зменшення стресу в клітинах, або застосування нових технологій очищення білків. Крім того, хороший результат також забезпечують такі підходи:

1. *Використання слабших промоторів:* для контролю над рівнем експресії використовують слабші промотори або додаткові системи, що піддаються індукції. Це дає можливість уникнути токсичності для клітини.

2. *Розділення виробництва білка:* один із способів знизити навантаження на клітину – це виробництво білка на кількох етапах. Наприклад, використовують штами з двома різними векторами, один з яких експресує білок, а інший – шаперони для стабільного складання білка.

3. *Температурний контроль:* зменшення температури культивування може допомогти знизити рівень експресії, що дозволяє уникнути агрегацій білків.

Після того, як рекомбінантний білок був експресований в бактерії, необхідно провести процес *виділення та очищення*. Це може включати лізис клітин для виділення білка з використанням таких методів, як ультразвукове або хімічне руйнування мембрани. Потім білок очищається за допомогою хроматографії. Зазвичай використовують хроматографічні методи:

- Афінна хроматографія – дозволяє очищати білки, використовуючи зв'язування з лігандами, такими як антитіла або інші специфічні молекули.

- Іонно-обмінна хроматографія – використовує заряд білка для його очищення.
- Гель-фільтрація – метод, що базується на розмірі молекули білка, що дозволяє розділяти білки різної молекулярної маси.

Однією з основних проблем є *стабільність рекомбінантних білків*. Прокаріотичні клітини можуть не мати всіх необхідних молекул для стабільної експресії еукаріотичних білків, це може призводити до утворення агрегацій або включень, що важко розчиняються.

Суперпродукція білків може призводити до перевантаження метаболічних шляхів клітини. Клітини можуть не справлятися з такою великою кількістю білків, і це призводить до накопичення токсичних продуктів і зниження життєздатності клітин. Одним з рішень є використання індукованих промоторів, що дозволяють контролювати рівень експресії і уникати перевантаження. Наприклад, використання індукованих промоторів, таких як *lac-промотор*, що дає змогу регулювати рівень експресії гена через індукцію певною молекулою (наприклад, ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозидом, або IPTG).

Застосування різних методів для контролю рівня експресії дозволяє уникнути токсичних наслідків для клітин. Одним із таких методів є використання периплазматичних шляхів експресії, коли білки виводяться до міжклітинного простору, де вони менш шкідливі для клітини.

Штами, які містять рекомбінантні гени, можуть бути *нестабільними*. Це означає, що протягом кількох поколінь в процесі культивування може відбутися втрата гена або зміна його експресії через мутації або розщеплення ДНК. Для запобігання цьому використовують стабільні векторні системи та регулярні перевірки культури клітин. Для підвищення стабільності використовується кілька підходів:

Використання спеціальних векторів, що мають стійкість до антибіотиків або інші елементи, які підтримують стабільність генетичного конструкта та створення штамів з додатковими механізмами контролю генетичних змін.

Часто штами бактерій, які використовуються для виробництва рекомбінантних білків, можуть втрачати вектор або генетичну конструкцію через мутації, особливо якщо вектор має низьку стабільність. Для збереження стабільності використовують позитивну селекцію (використання антибіотиків або інших селективних агентів, що допомагають підтримувати наявність потрібного гена в бактеріях) або векторні системи з автоселективними елементами (це такі векторні системи, що мають спеціалізовані елементи, які забезпечують стабільність вектора у клітині без додаткового введення антибіотиків).

Наприклад, при експресії людського інсуліну в *E. coli* використовується вектор з *lac*-промотором, що дозволяє контролювати рівень експресії інсуліну за допомогою IPTG. Вектор має додаткові елементи для стабільності, а штам *E. coli* BL21(DE3) містить ген для шаперона GroEL/GroES, що допомагає правильно скласти білок.

Ще один приклад стосується виробництва моноклональних антитіл: для експресії антитіл використовуються спеціальні штами *E. coli* із додатковими генами шаперонів. Для кожного антитіла підбирається індивідуальний промотор для регулювання рівня експресії. Після виробництва антитіла очищають за допомогою афінної хроматографії, де використовують зв'язування з антигенами, до яких прив'язано антитіло.

Таким чином, генетична інженерія є важливою частиною сучасної біотехнології та науки. Вона має широкий спектр застосувань, від медицини до агрономії. Для успішного проведення досліджень та отримання стабільних результатів необхідно добре знати об'єкти генетичних змін, етапи досліджень, а також вирішувати численні технічні проблеми, пов'язані з експресією білків, суперпродукцією та стабільністю штамів.

Ця галузь постійно розвивається, і тому знання про методи та нові технології, що виникають у генетичній інженерії, є важливими для науковців, які займаються біотехнологією і молекулярною біологією.

Контрольні питання:

- 1) Як обирають модельний об'єкт для генетичних досліджень?
- 2) Які особливості мають еукаріотичні гени при експресії в прокаріотичних клітинах?
- 3) Які основні етапи проведення наукових досліджень у генетичній інженерії?
- 4) Як можна забезпечити стабільність штамів суперпродуцентів?
- 5) Чим відрізняється експресія гена в прокаріотах і еукаріотах?
- 6) Які фактори впливають на продуктивність генетично модифікованих клітин?
- 7) Як забезпечується контроль за експресією трансгенів?
- 8) Які основні методи створення генетично модифікованих мікроорганізмів?
- 9) Які фактори впливають на ефективність експресії чужорідних білків у бактеріях?
- 10) Як здійснюється очищення рекомбінантних білків?
- 11) Чим відрізняються процеси отримання внутрішньоклітинних і позаклітинних білків?

ЛЕКЦІЇ 3-4
ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ІНТЕНСИВНИХ
ТЕХНОЛОГІЙ У РОСЛИННИЦТВІ
(4 ГОДИНИ)

1. Трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Ti – плазміда
2. Застосування репортерних генів при трансформації рослинних клітин
3. Трансгенні рослини. Основні цілі створення трансгенних рослин
4. Методи прямої трансформації рослинної клітини. Культивування клітин рослин
5. Створення рослин, стійких до комах-шкідників, вірусів, фітопатогенних грибів та бактерій
6. Рослини, стійкі до несприятливих факторів навколишнього середовища

Застосування генної інженерії в рослинництві є важливим напрямом розвитку сільського господарства, оскільки дозволяє підвищити врожайність, стійкість до шкідників та хвороб, покращити адаптацію рослин до змін клімату, зменшити залежність від хімічних пестицидів і добрив. Генно-інженерні методи створення трансгенних рослин дозволяють вирішувати ці завдання значно ефективніше і швидше, ніж традиційні селекційні методи. У цій лекції ми розглянемо основні методи трансформації рослин за допомогою *A. tumefaciens*, застосування репортерних генів при трансформації, а також інші важливі підходи до створення трансгенних рослин.

Генетична інженерія в рослинництві відкриває нові можливості для розв'язання глобальних проблем, таких як покращення врожайності, стійкість до хвороб і шкідників, адаптація до несприятливих умов, зменшення витрат на агрохімікати та зниження екологічного впливу. Сучасні генно-інженерні технології дозволяють створювати рослини з бажаними характеристиками шляхом прямого маніпулювання їх генетичним матеріалом.

1. Трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Ті – плазміда

Одним із основних методів генної трансформації рослин є використання бактерії *A. tumefaciens*, яка природним шляхом здатна переносити частину свого генетичного матеріалу в рослинні клітини. Ця бактерія є найбільш ефективним природним вектором для трансформації рослин, вона здатна інфікувати рослинні клітини, передаючи в них частину свого генетичного матеріалу, що міститься на так званій Ті-плазміді. Цей процес є основою для створення трансгенних рослин.

Загальна схема процесу представлена на рис. 2.

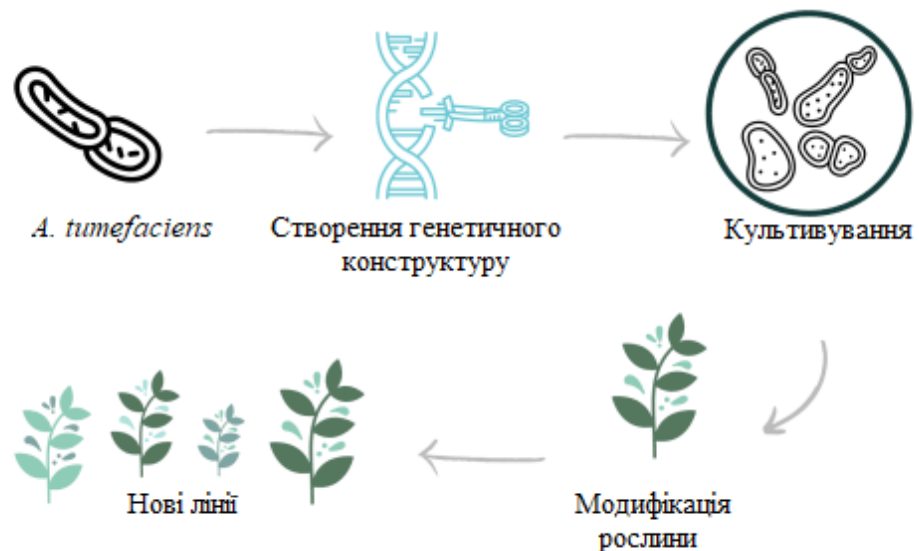


Рисунок 2 – Принципова схема отримання модифікованих рослин [24]

Принцип роботи *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* викликає у рослин інфекційне захворювання – туріомавтоз або утворення пухлин (так званих галів). Це відбувається завдяки здатності бактерії переносити частину своєї ДНК з Ті-плазміді в клітини рослини.

Ті-плазміда (Tumor Inducing plasmid) є однією з перших і найбільш широко вивчених молекул, що використовується в генній інженерії рослин, це основний вектор, який використовується для передачі генетичного матеріалу в рослинні клітини. Ключова особливість Ті- плазміді полягає в тому, що

після інфекції рослини, T-DNA (Transfer DNA) з цієї плазміди вбудовується в геном рослинної клітини, де й починає функціонувати.

Таким чином, Ti-плазміда містить два основні компоненти:

- T-DNA – це частина плазміди, яка інтегрується в геном рослинної клітини і відповідає за інфікування рослинної клітини. Вона містить інформацію для синтезу певних ферментів, які призводять до утворення пухлин у рослини.
- Опорні гени, що забезпечують регуляцію передачі T-ДНК від бактерії до рослини.

Трансплантовані гени можуть бути корисні для отримання трансгенних рослин з поліпшеними властивостями, такими як стійкість до хвороб або підвищення врожайності.

Процес трансформації за допомогою *Agrobacterium* включає кілька етапів:

- Перший етап: інфекція рослинної тканини. *Agrobacterium* вводиться в рослинну тканину, зазвичай у стебла або коріння, спостерігається передача T-DNA до клітин рослини.
- Другий етап: інтеграція в геном рослини.
 - T-DNA інтегрується в хромосоми рослини, і нові гени можуть почати функціонувати.
 - бактерія взаємодіє з клітинами рослини.
 - транспортує T-ДНК до рослинної клітини через спеціальні канали (пілуси).
 - T-ДНК інтегрується в хромосоми рослини, що дозволяє вставити чужорідний ген в геном рослини.
- Третій етап: селекція трансформованих клітин. Для вибору трансформованих клітин використовуються селекційні маркери (наприклад, антибіотикорезистентність або флуоресценція).

Метод трансформації за допомогою *Agrobacterium* широко використовується для створення трансгенних рослин. Він дозволяє вбудовувати генетичний матеріал, що визначає певні властивості рослини, у її геном.

За допомогою цього методу були створені трансгенні рослин тютюну, які стійкі до певних хвороб або стресових умов, таких як посуха чи високі температури, а також створені рослини, які мають поліпшені властивості.

Для створення трансгенних рослин кукурудзи, які стійкі до комах, в T-DNA вбудовується ген від бактерії *Bacillus thuringiensis*, який кодує білок токсичний для шкідників, таких як кукурудзяна совка.

Сучасні дослідники часто модифікують Ti-плазмиду для розробки нових трансгенних рослин. Використовуючи генетичний інжиніринг, додаються нові гени до T-DNA, що дозволяє створювати рослини з бажаними характеристиками.

Так за допомогою вбудовування гена, який кодує інсектицидний білок від бактерії *B. thuringiensis* були створені трансгенні помідори, які мають підвищену стійкість до шкідників. Для створення трансгенних картопляних сортів, що стійкі до вірусів, у T-DNA Ti-плазмиди вбудовується ген від вірусу, що викликає резистентність до цього самого вірусу.

2. Застосування репортерних генів при трансформації рослинних клітин

Репортерні гени використовуються для ідентифікації та моніторингу трансформованих клітин. Це генетичні елементи, які можуть бути ідентифіковані через прості методи, такі як флуоресценція або люмінесценція.

Репортерні гени використовуються для спостереження за трансформацією клітин та для вибору успішно трансформованих клітин. Ці гени забезпечують візуальні маркери, за якими можна виявити наявність бажаних змін у рослинному геномі.

Приклади репортерних генів:

- GUS-ген (β -глюкуронідаза): цей ген дозволяє забарвлювати клітини в синій колір при взаємодії з субстратом. Використовують для візуалізації трансформованих клітин, які забарвлюються у синій колір, якщо в клітину був внесений відповідний ген.
- GFP-ген (зелений флуоресцентний білок): ген, що кодує білок, який флуоресцює в зеленому спектрі при ультрафіолетовому освітленні, дозволяючи візуалізувати трансгенні рослини за допомогою спеціальних мікроскопів.
- LUC-ген (люцифераза) – ген, який генерує світло в темряві при взаємодії з субстратом, що дозволяє виявити наявність гена за допомогою люмінесцентних пристроїв.

Репортерні гени використовуються на ранніх етапах трансформації для швидкої ідентифікації трансформованих клітин та для відбору тих рослин, що успішно інтегрували чужорідний ген. Вони дозволяють прискорити процес відбору і зробити його більш ефективним.

Так, для виявлення трансформованих клітин тютюну використовується GUS-ген, що забарвлює клітини у синій колір, коли трансформовані клітини з'являються після введення гена, який забезпечує стійкість до антибіотиків.

3. Трансгенні рослини. Основні цілі створення трансгенних рослин

Трансгенні рослини – це рослини, в яких вбудовані чужорідні гени, що надають їм нові властивості. Вони створюються шляхом внесення одного чи кількох генів у геном рослини за допомогою різних методів трансформації. Для цього можуть використовуватись різні методи генетичної інженерії, зокрема і трансформація *A. tumefaciens*.

Основні завдання, які ставляться перед науковцями, що працюють в цій галузі:

1. Розширення генетичних ресурсів рослин для покращення їх агрономічних властивостей.
2. Використання методів трансформації для підвищення стійкості до екстремальних умов.
3. Розвиток нових видів і сортів рослин, що забезпечують стійкість до захворювань, шкідників і зміни клімату.

Отримання трансгенних рослин відбувалось за декількома основними напрямками. В результаті були отримані такі типи трансгенних рослин:

- Рослини, стійкі до шкідників та хвороб: це рослини, що містять гени від бактерій або грибів, що виробляють інсектициди або токсини, наприклад, *B. thuringiensis*.
- Рослини, стійкі до гербіцидів: рослини, які здатні виживати при обробці гербіцидами, що знищують інші бур'яни, зберігаючи при цьому стійкість.
- Рослини з покращеними харчовими властивостями: наприклад, генетично модифіковані помідори або картопля з підвищеним вмістом вітамінів або антиоксидантів.

Успіхи генетичної інженерії в цьому напрямку дослідження є безсумнівними. Наразі існує достатній перелік рослин з покращеними властивостями, зокрема

- Генно-модифікована соя, що стійка до гербіцидів, завдяки введеному гену, що кодує білок, який розщеплює гербіцид.
- Рослини, стійкі до посухи, наприклад, генно-модифікована пшениця з додатковими генами, які сприяють кращій утилізації води та підвищеній стійкості до низьких температур.

- Кукурудза Bt, яка містить ген від бактерії *B. thuringiensis*, що кодує білок, токсичний для шкідників. Ця рослина зменшує потребу в хімічних пестицидах.
- Соя Roundup Ready стійка до гербіциду Раундап, що дозволяє ефективно знищувати бур'яни, не пошкоджуючи культуру.
- Стійкі до хвороб сорти пшениці, які містять гени від інших видів рослин або бактерій, що забезпечують захист від грибкових інфекцій або вірусів.

4. Методи прямої трансформації рослинної клітини. Культивування клітин рослин

Для отримання трансгенних рослин, окрім використання *A. tumefaciens*, використовують також методи прямої трансформації, які полягають в безпосередньому введенні генетичного матеріалу в клітини рослини. Ці методи часто застосовуються для рослин, які не піддаються трансформації через *Agrobacterium*, або в разі, коли необхідно швидко отримати трансгенні рослини. Це можуть бути фізичні або хімічні методи.

Біолістика або метод «золотих дробинок» полягає в тому, що мікроскопічні металеві частки, покриті ДНК (зазвичай золото чи вольфрам) «стріляються» в рослинні клітини за допомогою спеціального пристрою – генетичної гармати. Цей метод дозволяє проникати через клітинні стінки і доставляти генетичний матеріал у клітини рослини. ДНК, що потрапляє в клітини, може бути інтегрована в їхній геном.

Метод біолістики використовується для трансформації важких для трансформування рослин, таких як кукурудза та ріпак. Це дозволяє впроваджувати генетичні зміни без використання *Agrobacterium*.

Метод *електропорації* полягає в тому, що клітини піддаються дії короткочасного електричного імпульсу, який тимчасово збільшує проникність клітинних мембран, дозволяючи ДНК проникати в клітину.

Метод *хімічної трансформації* полягає в використанні спеціальних хімічних агентів, таких як солі кальцію, які підвищують проникність мембран клітин для ДНК.

Культивування клітин і тканин рослин. Культивування клітин і тканин є основою для багатьох біотехнологічних процесів. Культура клітин рослин – це метод вирощування рослинних клітин, тканин або органів в штучних умовах на живильних середовищах. Ця технологія є основою для створення трансгенних рослин, масового розмноження цінних сортів, отримання біологічно активних речовин та дослідження механізмів росту і розвитку рослин.

Рослинні клітини мають унікальну здатність до тотипотентності, тобто можуть диференціюватися в повноцінний організм. Це робить культуру клітин важливим інструментом біотехнології для клонального розмноження, отримання біологічно активних сполук, генетичної трансформації та створення стійких до хвороб і стресових факторів рослин.

Основні принципи культивування клітин рослин. Щоб успішно вирощувати рослинні клітини в лабораторних умовах, необхідно забезпечити низку ключових факторів:

- Живильне середовище. Для росту рослинних клітин використовується середовище, що містить макро- та мікроелементи, вуглеводи (зазвичай сахарозу), вітаміни, амінокислоти та регулятори росту (ауксини, цитокініни).
- Стерильність умов. Рослинні клітини легко піддаються зараженню мікроорганізмами, тому процес культивування проводиться в стерильних умовах з використанням стерильних середовищ, стерильного посуду та стерильного посівного матеріалу.
- Оптимальні фізичні умови: температура: зазвичай 22-26°C, освітлення: 16 годин світла / 8 годин темряви для фотосинтезуючих клітин, рН середовища: 5,5-6,0.

- Тотипотентність клітин. Клітини можуть утворювати нові тканини та органи, що дозволяє отримати повноцінні рослини із окремих клітин.

Виділяють декілька типів культур клітин і тканин рослин, які мають свої сфери застосування:

1. Калюсна культура. Калюс – це маса недиференційованих клітин, яка утворюється при культивуванні тканин рослин на твердому середовищі. Для його утворення необхідне поєднання ауксинів і цитокінінів у середовищі. Наприклад, калюсна культура використовується для генетичних модифікацій за допомогою *A. tumefaciens*.

2. Суспензійна культура. Суспензійна культура складається з окремих клітин, що ростуть у рідкому середовищі. Вона застосовується для отримання вторинних метаболітів, таких як алкалоїди або фенольні сполуки. Наприклад, отримання вінбластину та вінкристину з культури клітин *Catharanthus roseus* (барвінку рожевого).

3. Культура ізольованих протопластів. Протопласти – це клітини, позбавлені клітинної стінки. Вони можуть використовуватися для генетичних маніпуляцій та гібридизації. Наприклад, гібридизація картоплі та томата (*Solanum tuberosum* × *S. lycopersicum*).

4. Культура меристем. Верхівкові меристеми рослин використовуються для клонального мікророзмноження та отримання безвірусного матеріалу. Наприклад, відновлення безвірусних сортів картоплі.

Одна з найважливіших властивостей культур клітин, тканин і органів рослин – здатність до регенерації рослин в культурі.

Регенерація може відбуватися декількома основними шляхами. Один з них - за допомогою *органогенезу*. Це процес формування органів (пагонів або коренів) із калюсних або суспензійних культур. Цей процес залежить від співвідношення ауксинів і цитокінінів у живильному середовищі: якщо високий рівень цитокінінів, то зазвичай стимулюється утворення пагонів. Якщо в середовищі наявний високий рівень ауксинів, то здебільшого

спостерігається утворення коренів. Таким чином отримують трансгенні рослини тютюну шляхом.

Інший шлях регенерації - *соматичний ембріогенез*. Окремі клітини можуть формувати ембріодні структури, які розвиваються у повноцінні рослини. Це більш ефективний метод регенерації, оскільки отримані рослини є генетично ідентичними до вихідної клітини. Соматичний ембріогенез використовується для масового розмноження какао, кави, моркви, ялини.

Культура рослинних клітин, тканин та органів знайшла широке застосування у біотехнології:

- Генетична інженерія - введення чужорідних генів в клітини рослин для отримання трансгенних рослин. Використовується два основних методи: *Agrobacterium*-опосередкована трансформація та біолістика. Наприклад, створення трансгенних сортів тютюну, помідорів, картоплі, рису, кукурудзи, що мають стійкість до шкідників або стресових факторів проведено за допомогою вищезгаданих методів.

- Отримання лікарських препаратів. Як правило використовуються суспензійні культури клітин для виробництва лікарських речовин, ефірних олій, вторинних метаболітів (алкалоїди, флавоноїди). Наприклад, отримання вінбластину та вінкристину з культури клітин *C. roseus* (барвінку рожевого), отримання артемізиніну (анти-малярійного препарату) з *Artemisia annua*.

- Клональне мікророзмноження використовується для швидкого отримання ідентичних рослин з високими показниками продуктивності. За його допомогою розмножують декоративні та сільськогосподарські культури. Наприклад, широкого застосування набуло клональне розмноження бананів, орхідей, картоплі, декоративних квітів.

- Отримання безвірусного матеріалу здійснюють з використанням культури меристем. Це дозволяє отримати оздоровлені рослини, вільні від вірусних інфекцій. Наприклад, безвірусне розмноження картоплі, винограду, фруктових дерев.

Досягнуті результати дозволяють окреслити завдання на найближчу перспективу. Успіх перш за все буде визначатись розвитком нових методів досліджень та розробкою обладнання для промислового культивування. Серед найбільш перспективних можна виділити наступні напрямки:

1. Використання новітніх технологій, таких як CRISPR/Cas для точкової модифікації геному.
2. Масове впровадження біореакторів для отримання лікарських речовин.
3. Використання нанотехнологій у культурі клітин для покращення ефективності генетичних маніпуляцій.
4. Покращення методів трансформації для збільшення ефективності отримання трансгенних рослин.

Незважаючи на перспективи і великі можливості в біотехнології метод культури рослинних клітин, тканин і органів має певні проблеми, що значно ускладнюють створення технологій на їх основі. Серед них можна виділити наступні: деякі рослини мають низьку здатність до регенерації, високі вимоги до стерильності та спеціалізованого обладнання, втрата генетичної стабільності та епігенетичні зміни при тривалому культивуванні. Розробка шляхів подолання цих проблем значно підвищить ефективність використання методу культури клітин, тканини та органів в біотехнології.

Отже, генетичні технології в рослинництві дозволяють створювати рослини з покращеними властивостями. Методи трансформації, зокрема використання *A. tumefaciens*, використання репортерних генів та прямі методи трансформації, такі як біолістика, електропорація значно спрощують і прискорюють процес створення трансгенних рослин. Вони забезпечують можливість отримання рослин з підвищеною стійкістю до хвороб і шкідників та екстремальних умов, що є важливим кроком до розвитку інтенсивних технологій у сільському господарстві.

Контрольні питання:

- 1) Які методи трансформації рослин використовують у генетичній інженерії?
- 2) Яку роль відіграє *A. tumefaciens* у трансформації рослин?
- 3) Які функції виконує Ti-плазміда?
- 4) Які методи використовують для прямої трансформації рослинних клітин?
- 5) Які переваги та недоліки біолістики?
- 6) Які репортерні гени використовують у рослинній біотехнології?
- 7) Які ризики пов'язані з культивуванням трансгенних рослин?
- 8) Як відбувається відбір та регенерація трансгенних рослин?

ЛЕКЦІЯ 5

ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ІНТЕНСИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ У ТВАРИННИЦТВІ

(2 ГОДИНИ)

1. Технологія трансплантації ембріонів. Запліднення та культивування *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин
2. Гібридизація клітин тварин. Гібридоми
3. Трансгенна велика рогата худоба, вівці, кози, свині, птахи, риби.
4. Технології використання стовбурових клітин
5. Етичні та соціальні аспекти застосування генетичної інженерії в медицині

Генетична інженерія надає нові можливості в тваринництві для значного підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва, поліпшення продуктивних і адаптивних властивостей тварин (рис. 3).

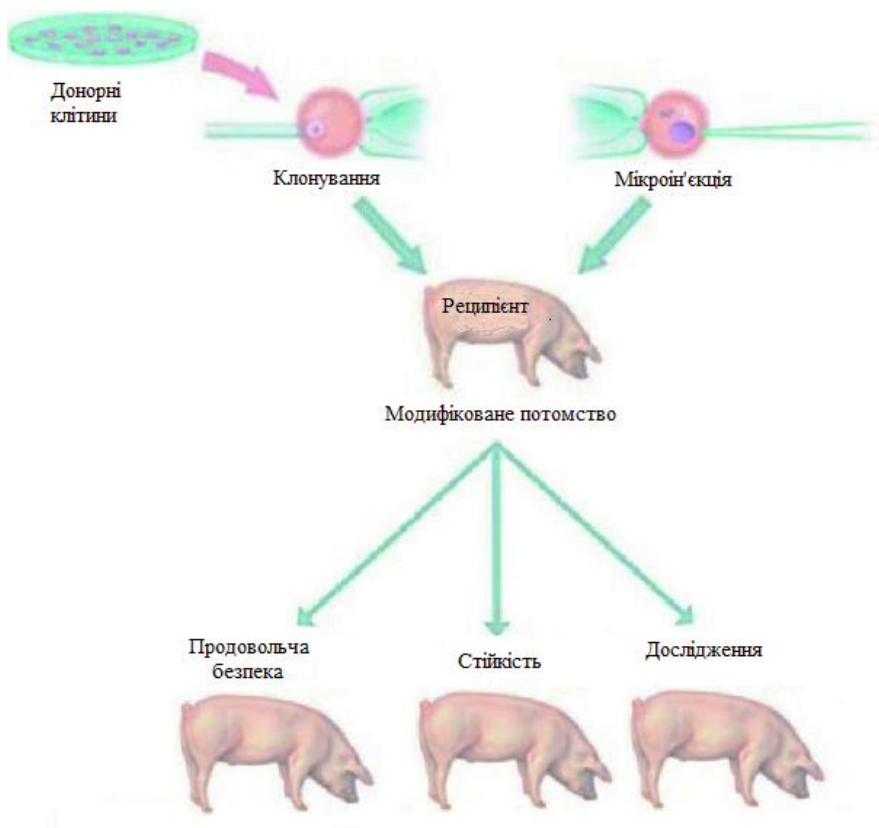


Рисунок 3 – Принципова схема створення модифікованих тварин та їх використання [26]

Використання генно-інженерних технологій у тваринництві дозволяє не лише збільшити продуктивність, але й покращити якість продукції, підвищити стійкість тварин до хвороб, а також створювати тварин з бажаними генетичними характеристиками. У цьому контексті особливо важливими є технології трансплантації ембріонів, запліднення *in vitro*, гібридизація клітин тварин та створення трансгенних тварин. У лекції ми детально розглянемо ці підходи, їх застосування та можливі ризики.

1. Технологія трансплантації ембріонів. Запліднення та культивування *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин

Запліднення *in vitro* (IVF) та культивування ембріонів *in vitro* є основними методами для отримання генетично цінних тварин та створення нових поколінь із бажаними властивостями. Метод широко використовується в тваринництві для підвищення продуктивності та поліпшення генетичних якостей тварин.

Принцип технології трансплантації ембріонів. Процес трансплантації ембріонів полягає в тому, що ембріони, отримані від однієї тварини (донору), пересаджуються в організм іншої тварини (реципієнта), яка не була запліднена природнім шляхом. Цей метод дає можливість передавати бажані генетичні ознаки іншим тваринам, а також швидко розповсюджувати ці ознаки серед великої кількості нащадків. До переваг методу можна також віднести підвищення генетичної різноманітності в стадах та покращення якості продукції (молоко, м'ясо, шкіра).

Технологія запліднення та культивування *in vitro* включає наступні етапи:

1. Отримання яйцеклітин Яйцеклітини отримують шляхом пункції яєчників тварини.
2. Запліднення донору. Сперма високопродуктивного бика (або іншої тварини) використовуються для запліднення яйцеклітин у лабораторії.

3. Культивування ембріонів. Ембріони вирощуються до певної стадії розвитку (як правило, до стадії бластоцисти)

4. Пересадка ембріонів. Ембріони переносять у матку реципієнта.

У молочному скотарстві трансплантація ембріонів використовується для збільшення кількості потомства від високопродуктивних корів, що дозволяє значно підвищити виробництво молока та поліпшити якість молочних продуктів. Вівці, запліднені *in vitro*, використовуються для покращення показників якості і кількості вовни або м'яса. Таким чином, метод дає можливість використання генетично цінних тварин як батьків для багатьох потомків та створення тварин, що мають хороші генетичні характеристики.

2. Гібридизація клітин тварин. Гібридоми

Гібридизація клітин тварин та використання гібридом є потужними інструментами генної інженерії, що дозволяють створювати нові клітини та організми з комбінованими властивостями.

Гібридизація клітин передбачає злиття двох різних клітин: однієї, що містить необхідні гени, і іншої, що має властивості, які потрібні для отримання бажаних результатів. Клітини зливаються за допомогою спеціальних методів, таких як електричне або хімічне злиття.

Гібридоми – це штучно створені клітини, що утворюються в результаті *злиття (гібридизації)* двох різних типів клітин:

- Пухлинних клітин, які мають здатність до необмеженого поділу.
- Нормальних клітин, що виробляють специфічні біологічно активні молекули, зокрема антитіла.

Злиття цих клітин дозволяє отримати безсмертні клітинні лінії, що зберігають здатність до синтезу потрібних білків або антитіл.

Створення гібридом є ключовим методом у виробництві моноклональних антитіл (MAb, monoclonal antibodies), які мають величезне значення в медицині, ветеринарії та сільському господарстві.

Процес отримання гібридом включає кілька етапів:

1. Імунізація тварини (зазвичай миші) – тварині вводять антиген, щоб стимулювати її імунну систему до утворення антитіл.
2. Вилучення В-лімфоцитів із селезінки імунізованої тварини.
3. Злиття В-лімфоцитів з пухлинними клітинами (мієломами) за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) або електрофузії.
4. Скринінг гібридних клітин на здатність до виробництва специфічних антитіл.
5. Розмноження гібридом та отримання чистої культури клітин, що продукують моноклональні антитіла.

Гібридами знайшли широке застосування у багатьох галузях.

У медицині:

- Діагностика захворювань (інфекційних та онкологічних).
- Таргетна терапія раку (наприклад, антитіла проти HER2 при лікуванні раку молочної залози).
- Створення тест-систем для виявлення вірусів, бактерій та інших патогенів (наприклад, тест-системи на COVID-19).

У ветеринарії:

- Виявлення патогенів у тварин, що допомагає швидше діагностувати хвороби.
- Моніторинг якості вакцин.
- Розробка ветеринарних тестів для виявлення специфічних захворювань у великої рогатої худоби, свиней, птахів.

У тваринництві моноклональні антитіла, отримані з гібридом, використовують для діагностики таких хвороб, як ящур, сальмонельоз та пташиний грип, що дозволяє швидко ідентифікувати хвороби у тварин, полегшуючи діагностику та лікування.

У сільському господарстві

- Створення тестів для виявлення вірусів, що заражають сільськогосподарські культури (наприклад, вірусу мозаїки тютюну).
- Контроль якості продуктів харчування (виявлення пестицидів, мікотоксинів, бактерій у молоці, м'ясі, овочах).
- Гібридами використовуються для створення тест-систем, що визначають наявність токсинів *Aspergillus flavus* у зернових культурах.

Переваги та недоліки гібридної технології. Як і будь-який метод гібридна технологія має свої переваги, недоліки і сфери застосування. До *переваг* можна віднести стабільність гібридом, які можуть продукувати антитіла безперервно; високу специфічність (отримані антитіла взаємодіють тільки з певним антигеном) і можливість виробляти моноклональні антитіла у великих кількостях. Але виробництво є дорогим і складним. Крім того, можлива імуногенність при застосуванні у людей (антитіла миші можуть викликати імунну відповідь), також не всі антигени викликають сильну імунну відповідь, що ускладнює отримання специфічних антитіл.

Сучасні методи, такі як рекомбінантні антитіла, фаговий дисплей та CRISPR-редагування, дають змогу вдосконалити гібридну технологію. Впровадження антитіл, створених на основі людських імуноглобулінів, дозволяє мінімізувати імунну відповідь та розширює можливості лікування автоімунних захворювань і раку.

3. Трансгенна велика рогата худоба, вівці, кози, свині, птахи, риби.

Трансгенні тварини — це тварини, в яких були введені чужорідні гени для надання нових властивостей. Цей підхід дозволяє створювати тварин, що мають підвищену продуктивність, стійкість до хвороб або покращену якість продукції.

Приклади трансгенних тварин:

- Велика рогата худоба: створення трансгенних корів з підвищеним вмістом молочного білка або з покращеною стійкістю до хвороб.
- Вівці: трансгенні вівці, що містять ген, який забезпечує високу якість вовни.
- Свині: свині, що містять гени, які покращують швидкість росту та знижують витрати корму.
- Птахи: створення трансгенних курей, які мають підвищену стійкість до вірусних інфекцій.
- Риби: трансгенні риби, які можуть швидше рости та мати підвищену стійкість до хвороб.

Для створення трансгенних тварин застосовують такі методи як *мікроін'єкція* – введення генетичного матеріалу безпосередньо в ядро яйцеклітини, *використання вірусів* як векторів для доставки генів в клітини тварин та *генетична терапія* – використання методів, що дозволяють змінювати генетичну інформацію в живих організмах.

4. Технології використання стовбурових клітин

Стовбурові клітини – це унікальні клітини, які мають здатність до самовідновлення та диференціації у різні типи спеціалізованих клітин. Завдяки цим властивостям вони є перспективним інструментом у регенеративній медицині, біотехнологіях та генній інженерії.

Типи стовбурових клітин. Стовбурові клітини поділяються на кілька основних типів залежно від їхнього походження та потенціалу до диференціації.

1) Ембріональні стовбурові клітини (ESCs, embryonic stem cells). Їх отримують із бластоцисти (ранньої стадії розвитку ембріона) і вони можуть перетворюватися на будь-який тип клітин (плюріпотентні), тому такі клітини застосовують для створення тканин і органів для трансплантації, моделювання

генетичних захворювань, відновлення нервових тканин після інсультів або нейродегенеративних хвороб (наприклад, хвороби Паркінсона).

2) Стовбурові клітини дорослих організмів (Adult Stem Cells, ASC) містяться у дорослих тканинах (кістковий мозок, пуповинна кров, шкіра, печінка), можуть утворювати лише обмежену кількість типів клітин (мультипотентність). Їх використовують для відновлення тканин після травм або хвороб, пересадки кісткового мозку для лікування лейкемії, регенерація хрящової та м'язової тканини.

3) Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC, induced pluripotent stem cells) отримують шляхом програмування спеціалізованих клітин назад у стовбурові. Клітини подібні до ембріональних стовбурових клітин, можуть перетворюватися на будь-які клітини організму і застосовуються в такому напрямку як персоналізована медицина (створення клітин пацієнта для лікування без відторгнення імунною системою), генна терапія, їх також використовують як клітинні моделі для випробування ліків.

Напрямки використання стовбурових клітин:

1) Регенеративна медицина

Стовбурові клітини можуть замінювати пошкоджені або втрачені клітини організму, що дає можливість лікувати опіки та рани (створення штучної шкіри), захворювання серця (відновлення кардіоміоцитів після інфаркту), дегенеративні захворювання нервової системи (розсіяний склероз, хвороба Альцгеймера, Паркінсона).

2) Генетична модифікація організмів

За допомогою стовбурових клітин можна проводити генетичні модифікації, які покращують властивості організмів зокрема стійкість до хвороб тварин (наприклад, стійких до вірусів сільськогосподарських тварин), можна створювати культури рослин із високою врожайністю та стійкістю до шкідників. Великі перспективи цей метод відкриває і редагування геному за допомогою CRISPR для усунення генетичних дефектів.

3) Клонування та репродуктивні технології

Стовбурові клітини відіграють важливу роль у створенні клонованих організмів, наприклад ссавців (Доллі – перша клонована вівця). Велике значення має технологія культивування стовбурових клітин у трансплантології, зокрема для вирощування необхідних органів для трансплантації у лабораторних умовах. Навіть у такій важливій справі, як відновлення вимираючих видів, стовбурові клітини є незамінними (наприклад, експерименти з клонуванням шерстистого мамонта).

5. Етичні та соціальні аспекти застосування генетичної інженерії в медицині

Незважаючи на величезний потенціал, стовбурові клітини мають певні ризики та обмеження. Це перш за все *етичні* питання:

- Використання ембріональних стовбурових клітин пов'язане з моральними та релігійними суперечками, оскільки для їх отримання руйнується ембріон.
- Дебати щодо клонування людей та його етичних наслідків.

Використання стовбурових клітин може значно підвищувати *ризики розвитку ракових пухлин*. Це пов'язано по-перше, з неправильною регуляцією росту клітин, що може спричинити утворення пухлин, по-друге з тим, що індуковані плюрипотентні стовбурові клітини можуть вести до мутацій та непередбачуваних змін у ДНК.

Не до кінця вивчено питання щодо *можливості відторгнення трансплантатів*: дуже часто при трансплантації донорських стовбурових клітин можливий імунний конфлікт. Використання iPSC може частково вирішити цю проблему, оскільки клітини походять від самого пацієнта. Але загалом можемо стверджувати, що метод ще *недостатньо вивчений*, тому що багато методик все ще знаходяться на стадії досліджень та й довгострокові наслідки терапії стовбуровими клітинами не завжди передбачувані.

Але неможливо не відзначити великі перспективи розвитку технологій стовбурових клітин: це і створення біоінженерних органів (вирощування нирок, серця, печінки у лабораторних умовах), і редагування геному стовбурових клітин для лікування генетичних захворювань без ризику мутацій, і тестування ліків на органоїдах – створення міні-органів для перевірки ефективності нових препаратів.

Підводячи підсумки всьому вищевикладеному можемо констатувати, що генетичні технології в тваринництві мають великий потенціал для підвищення ефективності виробництва, поліпшення якості продукції і створення тварин з новими, бажаними властивостями. Технології трансплантації ембріонів, запліднення *in vitro*, гібридизації клітин і створення трансгенних тварин відкривають нові горизонти в галузі сільського господарства, хоча також потребують ретельного контролю та вирішення етичних і екологічних питань.

Контрольні питання:

- 1) Які існують методи отримання трансгенних тварин?
- 2) Що таке технологія трансплантації ембріонів і для чого її використовують?
- 3) Як здійснюється запліднення *in vitro* у сільськогосподарських тварин?
- 4) Які особливості має трансплантація ембріонів?
- 5) Як створюють трансгенних тварин, і які є приклади їхнього застосування?
- 6) Які можливості відкривають стовбурові клітини в біотехнології? Які потенційні ризики пов'язані з використанням стовбурових клітин?
- 7) Які є етичні обмеження щодо використання генно-інженерних технологій у тваринництві?

ЛЕКЦІЇ 6-7
ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ У МЕДИЦИНІ
(4 ГОДИНИ)

1. Генна діагностика та терапія людини
2. Молекулярно-генетичні методи у генній діагностиці
3. Генно-інженерні методи створення вакцин
4. Лікувальні засоби на основі олігонуклеотидів

Генетична інженерія в медицині – це область, яка стрімко розвивається та має величезний потенціал для діагностики та лікування захворювань (рис. 4). Сучасні досягнення у молекулярній біології дозволяють впроваджувати новітні підходи, такі як генна терапія, молекулярно-генетична діагностика, створення ДНК-вакцин та лікувальних засобів на основі олігонуклеотидів.

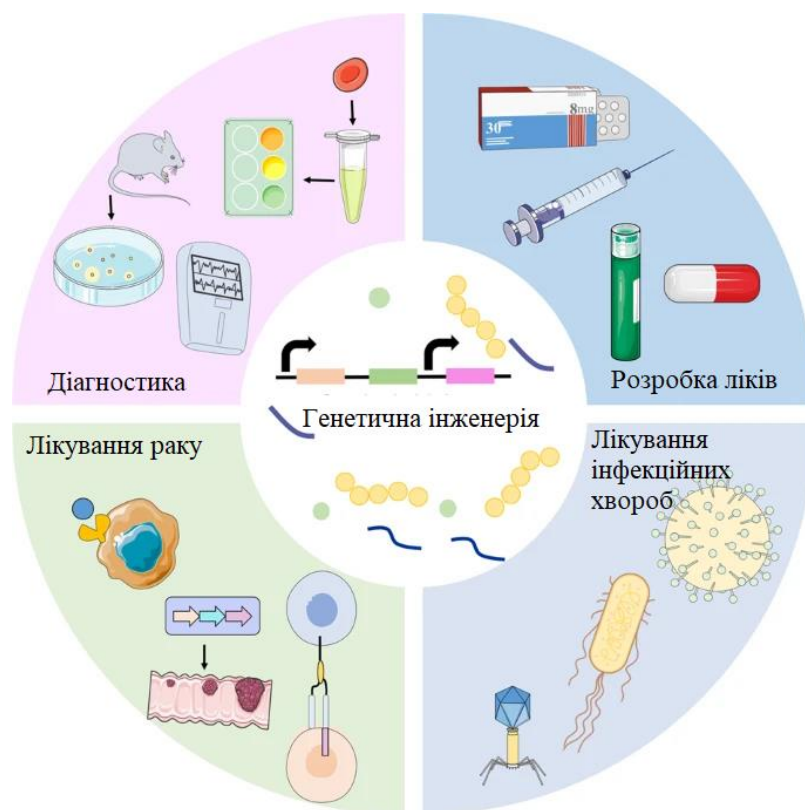


Рисунок 4 – Приклади використання генетичної інженерії в медицині [27]

Основні етапи розвитку:

1953 рік: відкриття структури ДНК Уотсоном і Кріком.

1970-ті роки: розробка методів рекомбінантної ДНК.

1980-ті роки: створення перших генетично модифікованих організмів.

1990-ті роки: впровадження генетичної терапії у клінічні випробування.

2012 рік: відкриття технології CRISPR/Cas9.

Внесок у медицину:

- Створення інсуліну за допомогою генної інженерії.
- Генотерапевтичні втручання для лікування рідкісних спадкових хвороб.
- Вакцинація на основі РНК під час пандемії COVID-19.

1. Генна діагностика та терапія людини

Генна діагностика та терапія є важливими складовими сучасної медицини та генетики. Вони відіграють ключову роль у виявленні та лікуванні спадкових захворювань, а також відкривають перспективи персоналізованої медицини. Генетичні тести допомагають виявити схильність до певних захворювань, що дозволяє здійснювати профілактичні заходи та розробляти індивідуальні стратегії лікування.

Генна діагностика — це процес виявлення мутацій у ДНК з метою встановлення або уточнення діагнозу генетичних захворювань. Вона включає кілька методів:

- Класичне каріотипування — аналіз хромосомного набору людини для виявлення аномалій. Наприклад, синдром Дауна (трисомія 21).
- Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): метод ампліфікації ДНК для виявлення специфічних мутацій. Реальна ПЛР (qPCR) використовується для кількісного визначення ДНК/РНК. Наприклад, діагностика мутацій у гені BRCA1/BRCA2 для оцінки ризику раку молочної залози.

- Секвенування нового покоління (NGS): сучасний метод, що дозволяє аналізувати великі обсяги генетичної інформації та ідентифікувати рідкісні мутації. Наприклад, дослідження генетичних варіацій при хворобі Альцгеймера, дослідження рідкісних мутацій у пацієнтів із генетичними хворобами, такими як синдром Марфана.
- Флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH): метод виявлення специфічних ДНК-послідовностей у клітинних ядрах. Наприклад, діагностика онкогенних мутацій (транслокацій при лейкемії).
- Метод CRISPR-dCas9: використовується для визначення специфічних мутацій у реальному часі.
- Мікрочіпи для аналізу ДНК: використовуються для одночасного виявлення тисяч мутацій.
- Метод RNA-seq: аналізує експресію генів на рівні РНК.
- Метилування ДНК: використовується для виявлення епігенетичних змін при онкологічних захворюваннях.

Генна діагностика проводиться на декількох рівнях: *пренатальна діагностика* включає скринінгові та інвазивні методи (амніоцентез, біопсія хоріону), що дозволяють виявити генетичні аномалії у плода, такі як муковісцидоз або синдром Едвардса. *Неонатальний скринінг* дозволяє діагностувати спадкові захворювання у новонароджених, наприклад, фенілкетонурію, що дає можливість своєчасного лікування та уникнення тяжких наслідків.

Генна терапія. Генна терапія – це технологія лікування генетичних захворювань шляхом введення або модифікації генетичного матеріалу в клітинах пацієнта. Генна терапія дозволяє коригувати або замінювати дефектні гени. Основні методи включають:

1. Екзогенне введення генів (замісна генна терапія): транспортування здорового гена у клітини пацієнта для заміни дефектного.

Наприклад, лікування спадкового амаврозу Лебера (LCA) за допомогою AAV-вірусів, лікування аденозиндезаміназної імунodefіцитної хвороби (SCID).

2. Редагування геному (генна корекція): редагування мутантного гена за допомогою CRISPR/Cas9, що дозволяє виправляти мутації. Наприклад, усунення мутацій при серповидно-клітинній анемії.

3. Антисенс-терапія: використання олігонуклеотидів для пригнічення експресії дефектних генів. Наприклад, лікування спінальної м'язової атрофії (SMA) за допомогою препарату Nusinersen.

4. РНК-інтерференція (RNAi): блокування патологічної експресії генів. Наприклад, терапії деяких видів раку.

5. Епігенетична терапія: модифікація експресії генів без зміни послідовності ДНК. Наприклад, вплив на метилювання.

Для деяких хвороб завдяки методології генетичної інженерії вдалось розробити методи клінічного лікування. Це зокрема лікування гемофілії А за допомогою генотерапії, терапія хвороби Гентінгтона за допомогою siRNA, генотерапія для імунотерапії раку (CAR-T клітини).

Розрізняють декілька видів генної терапії. *Соматична генна терапія* спрямована на зміну геному соматичних клітин без передачі змін у спадок. Прикладом є терапія бета-таласемії за допомогою генетичних модифікацій стовбурових клітин. *Герміальна генна терапія* змінює генетичний матеріал статевих клітин, що може передаватися наступним поколінням. Ця технологія викликає етичні суперечки та наразі заборонена в більшості країн.

Генетична діагностика та терапія є потужними інструментами сучасної медицини. Вони відкривають можливості для персоналізованого підходу до лікування та покращення якості життя пацієнтів. Генна діагностика та терапія мають значний потенціал для лікування раку, рідкісних генетичних розладів, нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Гентінгтона. Водночас виникають етичні питання щодо редагування геному людини, ризиків довготривалих змін та потенційної нерівності у доступі до таких технологій.

Наприклад, редагування генів ембріонів (як у випадку CRISPR-близнюків у Китаї) спричинило глобальні дискусії щодо його прийнятності. Важливо розвивати технології в цьому напрямку, враховуючи всі етичні та соціальні виклики. Приклади успішного використання генної терапії, такі як лікування лейкемії за допомогою CAR-T терапії, демонструють величезний потенціал цього напрямку в медицині майбутнього.

3. Генно-інженерні підходи до створення вакцин

Генно-інженерні технології стали основою сучасної вакцинології, дозволяючи створювати безпечні, ефективні та доступні вакцини для боротьби з інфекційними захворюваннями. Вони забезпечують точність у розробці антигенів, мінімізують ризики побічних ефектів і відкривають нові можливості для індивідуалізованої імунопрофілактики.

Традиційні вакцини базуються на ослаблених або інактивованих патогенах. Однак вони мають обмеження, зокрема ризик побічних ефектів та складність виробництва.

Генно-інженерні вакцини є революційним підходом у профілактиці інфекційних захворювань. Їх створюють шляхом модифікації генетичного матеріалу патогену для стимуляції імунної відповіді. Основні види таких вакцин включають:

- Рекомбінантні білкові вакцини – містять синтетично створені вірусні або бактеріальні білки, які імунна система розпізнає як антигени. Наприклад, вакцина проти гепатиту В містить поверхневий антиген HBsAg, отриманий за допомогою дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*.
- ДНК- та мРНК-вакцини – використовують генетичний матеріал (ДНК або мРНК), який кодує антигени патогену та стимулює організм виробляти імунну відповідь. Наприклад, вакцини Pfizer-BioNTech та Moderna проти COVID-19 містять мРНК, що кодує спайковий білок SARS-CoV-2. Вони стали проривом під час пандемії COVID-19. ДНК-вакцини – містять плазмідну ДНК,

що кодує антигени збудника (наприклад, індійська вакцина ZyCoV-D проти COVID-19).

- Векторні вакцини – базуються на використанні вірусних векторів для доставки генетичного матеріалу, що кодує антиген. Наприклад, вакцина AstraZeneca використовує аденовірус шимпанзе для доставки гена спайкового білка коронавірусу.

Сучасні підходи створення генно-інженерних вакцин включають багато цікавих підходів, що поєднують можливості генної інженерії, імунології, хімії нуклеїнових кислот, фізики, матеріалознавства. Зокрема, цікаві результати отримали при *клонуванні та експресії антигенів* – генів, що кодують білок патогену і вводяться у клітини-господарі (дріжджі, бактерії, ссавці) для отримання рекомбінантного білка. Так було використано клітини комах для виробництва білків при створенні вакцини проти грипу Flublok.

Використання наночастинок допомагає стабілізувати мРНК та покращити її доставку в клітини. Наприклад, для захисту мРНК у вакцинах Pfizer-BioNTech та Moderna використовувались ліпідні наночастинок.

Редагування геному (CRISPR/Cas9) дозволяє модифікувати ДНК патогену для створення ослаблених штамів для вакцин. Такий підхід використали для створення вакцин проти ВІЛ.

Приклади успішних генно-інженерних вакцин:

- Вакцина проти гепатиту В (рекомбінантна білкова вакцина), що використовується для запобігання інфікуванню вірусом гепатиту В.
- Вакцини проти COVID-19 – мРНК-вакцини Pfizer/BioNTech, Moderna, а також векторні вакцини AstraZeneca, Johnson & Johnson.
- Вакцина проти вірусу папіломи людини (ВПЛ) – рекомбінантна білкова вакцина Gardasil-9, що захищає від дев'яти штамів ВПЛ, асоційованих із раком шийки матки.
- Вакцина проти вірусу Ебола – рекомбінантна векторна вакцина rVSV-ZEBOV, яка містить ген вірусу Ебола, інтегрований у вірус

- Вакцина проти грипу – Flublok, рекомбінантна білкова вакцина, що не потребує використання курячих ембріонів для вирощування вірусу.

Використання генно-інженерних вакцин набуває все більшого поширення, оскільки їх переваги не викликають сумнівів. По-перше, це висока точність у розробці та цільовій дії, можливість швидкої адаптації до нових патогенів (наприклад, швидка розробка мРНК-вакцин проти COVID-19), по-друге, менший ризик побічних ефектів порівняно з традиційними вакцинами, що містять ослаблені або інактивовані віруси. Ну і нарешті, можливість отримання більш ефективних вакцин завдяки використанню ад'ювантів і векторів.

Генно-інженерні вакцини є революційним проривом у медицині. Вони дозволяють швидко реагувати на нові інфекційні загрози та значно покращують глобальну систему імунопрофілактики. Подальші дослідження та розвиток технологій сприятимуть створенню ще ефективніших та безпечніших вакцин. Розробка універсальної вакцини проти грипу та ВІЛ залишається однією з ключових цілей сучасної вакцинології. Також тривають дослідження щодо вакцин проти автоімунних та онкологічних захворювань, що може відкрити нові можливості для лікування складних патологій.

Проте, наукові дослідження в цій галузі наштовхуються на певні виклики. Це, наприклад, довготривала стабільність вакцин. Відомо, що мРНК-вакцини потребують зберігання за наднизьких температурах (-70°C для Pfizer-BioNTech). Новітні вакцини мають високу вартість виробництва та складну логістику, що може обмежувати доступ до вакцин, особливо в країнах, що розвиваються. Дослідження у сфері генної інженерії можуть викликати етичні суперечки, особливо щодо редагування геному людини. Виникнення резистентності та мутацій патогенів може потребувати регулярного оновлення вакцин, що не буде сприяти їх здешевленню.

Але незважаючи на певні проблеми, генно-інженерні технології стали основою сучасної вакцинології, дозволяючи створювати безпечні, ефективні

та швидко доступні вакцини для боротьби з інфекційними захворюваннями. Вони забезпечують точність у розробці антигенів, мінімізують ризики побічних ефектів і відкривають нові можливості для індивідуалізованої імунопрофілактики. Розвиток цих технологій значно прискорив розробку вакцин у відповідь на пандемії, такі як COVID-19.

4. Лікувальні засоби на основі олігонуклеотидів

Олігонуклеотидні терапевтичні засоби є сучасним напрямом у біомедицині, що використовує короткі синтетичні нуклеотидні послідовності для модулювання експресії генів. Ці молекули застосовуються для лікування широкого спектра захворювань, включаючи генетичні патології, вірусні інфекції, онкологічні та нейродегенеративні захворювання. Вони мають певні переваги у порівнянні з іншими лікарськими засобами: висока специфічність до генетичних мішеней, можливість лікування раніше невиліковних генетичних захворювань, відносно швидка розробка нових препаратів, менший ризик токсичності порівняно з традиційною хіміотерапією.

Серед найбільш відомих олігонуклеотидних препаратів виділяють антизмістовні олігонуклеотиди (ASO), малі інтерферуючі РНК (siRNA), рибозими, ДНК-зими та аптамери. Олігонуклеотидні препарати працюють шляхом специфічної взаємодії з нуклеїновими кислотами в клітині, впливаючи на експресію певних генів або на активність білків. Основні механізми їхньої дії:

1. Антизмістовні олігонуклеотиди (ASO) – комплементарно зв'язуються з мРНК-мішенню, викликаючи її деградацію або блокуючи трансляцію білка. Наприклад, лікування спінальної м'язової атрофії препаратом Spinraza, застосування препарату Eteplirsen, який сприяє екзон-скипанню для лікування м'язової дистрофії Дюшенна.

2. Малі інтерферуючі РНК (siRNA) – викликають деградацію специфічної мРНК шляхом активації RNA-induced silencing complex (RISC), використовуються для зниження експресії певних генів шляхом деградації

мРНК. Наприклад, терапія при гіперхолестеринемії (препарат Inclisiran), який використовується для зниження рівня холестерину, блокуючи синтез білка PCSK9.

3. Аптамери – специфічні нуклеотидні послідовності, що зв'язуються з білковими мішенями, змінюючи їхню функцію. Наприклад, Pegaptanib (Macugen) інгібує VEGF при лікуванні вікової макулярної дегенерації.

4. Рибозими та ДНК-зими – каталізують розщеплення мРНК, знижуючи рівень експресії генів. Наприклад, розрізання РНК для лікування вірусних інфекцій, зокрема терапії ВІЛ-інфекції та деяких онкологічних захворювань.

Олігонуклеотидні препарати вже показали ефективність у клінічній практиці. Для лікування спінальної м'язової атрофії (SMA) використовують препарат Nusinersen (Spinraza) – ASO, що модифікує сплайсинг гена SMN2, підвищуючи виробництво функціонального білка. Для лікування м'язової дистрофії Дюшенна використовують інший ASO Golodirsen (Vyondys 53). Він сприяє екзон-скипанню під час трансляції дистрофіну. Tegsedi (Inotersen) – ASO, що знижує рівень транстиретину при hATTR-амілоїдозі. Інші лікарські засоби, що довели свою ефективність - Patisiran (Onpattro) та Golodirsen (Vyondys 53) належать до siRNA-препаратів і використовуються для зниження рівня мутантного білка TTR у плазмі при лікуванні спадкової транстиретинової амілоїдозної полінейропатії (hATTR) (перший), а другий – для лікування гострої печінкової порфірії шляхом зниження рівня ALAS1. Аптамер Pegaptanib (Macugen) використовують для лікування вікової макулярної дегенерації, він інгібує VEGF.

Впровадження олігонуклеотидів потребує вирішення ряду проблем, як то *доставка до клітин*. Тут необхідно покращити процес проникнення олігонуклеотидів через мембрани клітин і захистити їх від деградації нуклеазами. Потребує детального дослідження питання виникнення *небажаних імунних реакцій*. Для *стабільності та біодоступності* таких лікувальних препаратів необхідно проводити хімічні модифікації, що значно підвищує вартість препаратів і обмежує їхню доступність.

Перспективи розвитку цього напрямку включають використання ліпідних та полімерних наночастинок для ефективної доставки олігонуклеотидів у клітини та кон'югатів з лігандами, що значно покращують ефективність та специфічність дії (GalNAc-кон'юговані ASO та siRNA для печінкових захворювань). Цікаві результати може дати поєднання використання олігонуклеотидів з CRISPR/Cas9 у генній терапії для редагування геному. Нові ASO та siRNA, спрямовані на онкогени, такі як MYC або KRAS, знайшли застосування у онкології для лікування раку підшлункової залози, легень та інших злоякісних пухлин. Перспективні дослідження включають розширення застосування ASO також для нейродегенеративних захворювань при лікуванні хвороби Гентінгтона та Альцгеймера.

Олігонуклеотидні терапевтичні засоби представляють перспективний клас ліків, здатних модулювати генетичну експресію для лікування різних захворювань. Їх широке впровадження залежить від подолання проблем доставки та стабільності, проте успіх існуючих препаратів свідчить про величезний потенціал цієї галузі біомедицини. Подальші дослідження можуть призвести до появи нових методів лікування раку, вірусних інфекцій та рідкісних генетичних захворювань.

Таким чином, генетична інженерія відкриває нові горизонти у медицині, забезпечуючи точну діагностику та ефективне лікування численних захворювань. Використання молекулярно-генетичних методів, ДНК- та РНК-вакцин, а також засобів на основі олігонуклеотидів є ключовими напрямками, які формують майбутнє медицини. Надалі, інтеграція цих підходів у клінічну практику сприятиме підвищенню якості життя пацієнтів. Перспективи розвитку включають: вдосконалення технології CRISPR для безпечного редагування геному, використання стовбурових клітин у комбінації з генною терапією, масове впровадження персоналізованої медицини на основі генетичних даних. Водночас, необхідно врегулювати етичні та соціальні аспекти, щоб уникнути можливих негативних наслідків використання цих технологій. Серед цих проблем:

- Ризик створення "дизайнерських дітей" з заданими характеристиками.
- Нерівний доступ до дорогих лікувань.
- Етичні питання використання CRISPR/Cas9 для модифікації ембріонів, потенційні ризики для майбутніх поколінь.
- Можливість обмеження прав людини на основі її генетичного профілю

Контрольні питання:

- 1) Які молекулярно-генетичні методи використовують у генній діагностиці?
- 2) Як працює генна терапія?
- 3) Які існують методи введення генетичного матеріалу в клітини людини?
- 4) Які перспективи використання ДНК-вакцин?
- 5) Як олігонуклеотиди можуть застосовуватися у терапії?
- 6) Які основні стратегії генної діагностики спадкових захворювань?
- 7) Які існують ризики та обмеження генної терапії?

ЛЕКЦІЯ 8

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ У МОЛЕКУЛЯРНІЙ БІОЛОГІЇ

(2 ГОДИНИ)

1. Геноміка та протеоміка.
2. Білкова інженерія.
3. Технологія мікрочіпів.
4. Застосування нанотехнологій.
5. Методи дослідження ДНК-білкових та білок-білкових взаємодій.
6. Вестерн-блоттінг.
7. Олігонуклеотид-направлений мутагенез з використанням ПЛР.

1. Геноміка та протеоміка

Геноміка та протеоміка є фундаментальними напрямками сучасної біології, що мають велике значення для розуміння функціонування живих організмів. Геноміка вивчає структуру та функції ДНК, а протеоміка досліджує білки та їх взаємодію. Ці науки активно розвиваються завдяки технологічним досягненням у молекулярній біології, біоінформатиці та нанотехнологіях.

Геноміка – це наука, що досліджує структуру, функції, взаємодію та еволюцію геномів. Основними методами геноміки є секвенування ДНК та технології редагування геному. Більш розширений перелік наведений нижче.

- Секвенування нового покоління (NGS) – дозволяє швидко отримувати послідовності ДНК завдяки масовому паралельному аналізу. Наприклад, використання NGS для ідентифікації мутацій, що викликають рак.
- CRISPR-Cas9 – метод редагування геному, що базується на використанні направлених РНК для розпізнавання та зміни цільових послідовностей ДНК. Наприклад, корекція мутації, що викликає серповидно-клітинну анемію.

- Мікрочіпові технології дозволяють аналізувати генетичні варіації та експресію генів.
- Метагеноміка дає змогу вивчати мікробіом людини, оскільки забезпечує аналіз ДНК мікроорганізмів без необхідності їх культивування.

Прийнято виділяти декілька основних напрямків геноміки. *Порівняльна геноміка* аналізує геном різних видів для вивчення еволюційних процесів (наприклад, порівняння геномів людини та неандертальця для виявлення змін, що визначили еволюційні відмінності). Дослідженням функцій генів та їх експресії займається *функціональна геноміка*. Предметом *медичної геноміки* є вивчення мутацій, що викликають генетичні захворювання, і розробка персоналізованої медицини.

Протеоміка досліджує білковий склад клітин, їх структуру, функції та взаємодії. Наприклад, вивчення протеомного профілю пухлинних клітин для виявлення специфічних маркерів раку. Основні методи протеоміки включають мас-спектрометрію, яка використовується для точного визначення маси та структури білків, наприклад, ідентифікація біомаркерів раку. *Двовимірний електрофорез* дозволяє розділити білки за ізоелектричним фокусуванням та молекулярною масою. Для виявлення білкових взаємодій, наприклад при дослідженні механізмів регуляції гена p53, використовують *імунопреципітаційні методи*. *Біоінформаційний* аналіз білків також використовується в протеоміці.

Структурна протеоміка займається аналізом просторової організації білків. Дослідження взаємодій білків між собою та з іншими молекулами - предмет *функціональної протеоміки*. *Клінічна протеоміка* здійснює пошук біомаркерів захворювань та розробку нових методів діагностики.

Сфери застосування протеоміки:

- Розробка нових ліків (ідентифікація білків-мішеней для терапії);
- Ідентифікація біомаркерів захворювань (рання діагностика хвороб);
- Вивчення механізмів роботи білків;

- Біотехнологічні дослідження.

Методи протеоміки вирізняються високою чутливістю, можливістю дослідження змінних білкових структур, але вони складні у стандартизації та мають високу вартість.

Таким чином, найбільш широко застосовуваними методами геноміки та протеоміки є секвенування нового покоління (NGS) для швидкого аналізу геномів, CRISPR-Cas9 для редагування геному, використання мікрочіпів для аналізу експресії генів на рівні окремої клітини, мас-спектрометрія високої роздільної здатності для вивчення білкових комплексів, метагеноміка для дослідження мікробіомів.

2. Білкова інженерія

Білкова інженерія спрямована на модифікацію існуючих білків або створення нових із заданими властивостями шляхом зміни амінокислотної послідовності. Це дозволяє створювати ферменти для біотехнології, біомедицини, фармацевтики та промислового використання, наприклад, ферменти на основі моноклональних антитіл, створення ензимів для біомедицини тощо.

Основні методи, що використовуються в білковій інженерії:

- Сайт-спрямований мутагенез – отримання мутацій у білках для покращення їхніх властивостей (розробка більш стабільних ферментів для промислового використання).
- Раціональний дизайн – моделювання нових білків на основі їхньої структури.
- Еволюційна інженерія – використання штучного добору для покращення функцій білків.

Завдяки методології білкової інженерії ми маємо можливість створення нових біологічних молекул з унікальними властивостями, хоча такі дослідження і є достатньо складними і високовартісними.

3. Технологія мікрочіпів: принципи організації

Мікрочіпи дозволяють досліджувати тисячі генів одночасно за допомогою гібридизації ДНК. Це невеликі пластинки, на які наносять олігонуклеотиди або фрагменти ДНК. Біологічні мікрочіпи застосовуються для аналізу експресії генів, мутаційного скринінгу та ідентифікації біомаркерів. ДНК-мікрочіпи, білкові мікрочіпи та тканинні мікрочіпи є основними типами мікрочіпів. ДНК-мікрочіпи дозволяють аналізувати експресію генів, білкові мікрочіпи – проводити ідентифікацію взаємодій між білками, а тканинні мікрочіпи використовують для аналізу біологічних зразків. Мікрочіпи дозволяють проводити швидкий аналіз, досліджуючи тисячі молекул одночасно.

Основними сферами їх застосування є медицина (діагностика захворювань), фармакогенетика, молекулярна генетика (виявлення мутації у генах та аналіз експресії генів у тканинах), екологія (аналіз забруднення навколишнього середовища). Незважаючи на такі перспективи застосування метод потребує складного обладнання та має високу вартість.

4. Застосування нанотехнологій

Нанотехнології в біології використовуються для створення наночастинок, нанопор, наноконтейнерів, що допомагають у таргетній доставці ліків (наночастинки для спрямованого транспорту ліків до уражених клітин), візуалізації клітинних структур та розробці біосенсорів (швидка діагностика інфекцій на рівні однієї молекули). Наприклад, наночастинки для адресної доставки хіміотерапевтичних засобів.

Переваги методу - висока точність, можливість доставки ліків без пошкодження здорових клітин, але є і суттєві недоліки, серед яких можна виділити потенційна токсичність наночастинок та регуляторні обмеження.

5. Методи дослідження ДНК-білкових та білок-білкових взаємодій

Методи зайшли використання для дослідження механізмів регуляції генів, вивчення функцій білків та розробки ліків.

Найбільш широко використовувані *методи для вивчення ДНК-білкових взаємодій*:

- Електрофоретична мобільність (EMSA) – визначає зв'язування білків із ДНК.
- Хроматин-імунопреципітація (ChIP) – дозволяє ідентифікувати місця зв'язування білків із ДНК у живій клітині.

Білок-білкові взаємодії вивчають за допомогою:

- Тандемної афінної очистки (TAP) - метод виділення білкових комплексів.
- Методики FRET (резонансного переносу енергії флуоресценції) – дослідження взаємодій між білками у живій клітині.
- Y2H (дріжджової двохгібридної система) – визначення білкових взаємодій у клітинах дріжджів.
- SPR (поверхневого плазмонного резонансу) – реєстрація білкових взаємодій у реальному часі.

6. Вестерн-блоттінг

Вестерн-блоттінг використовується для виявлення специфічних білків у зразках, наприклад, при діагностиці вірусних інфекцій (ВІЛ). Він має високу специфічність та можливість кількісного аналізує але є достатньо трудомісним та вимагає наявності високоякісних реагентів, зокрема якісних антитіл.

Основні етапи:

- Екстракція білків.
- Електрофорез білків – розділення білків за масою.
- Перенесення на мембрану – фіксація білків.
- Інкубація з антитілами – специфічне виявлення цільового білка.

- Детекція – отримання сигналу (хемілюмінесцентний, флуоресцентний).

7. Олігонуклеотид-направлений мутагенез з використанням ПЛР

Цей метод дозволяє цілеспрямовано змінювати послідовність ДНК за допомогою олігонуклеотидів і ПЛР. Він широко використовується у створенні мутантних білків, вивченні функцій генів та створенні генетично модифікованих організмів. Для нього характерна висока точність мутагенезу але можна отримати і неспецифічні мутації.

Основні етапи проведення:

- Розробка праймерів із заданою мутацією.
- Проведення ПЛР для ампліфікації ДНК.
- Перевірка результатів за допомогою секвенування.

Отже, ми переконались, що генетична інженерія, геноміка та протеоміка відкривають величезні можливості для розвитку медицини, біотехнологій та екології. Сучасні методи дозволяють більш точно і швидко аналізувати та модифікувати генетичну інформацію, що сприяє появі нових терапевтичних стратегій і технологій.

Контрольні питання:

- 1) Що таке протеоміка та як вона взаємодіє з геномікою?
- 2) Які принципи роботи мікрочіпів у молекулярній біології?
- 3) Як проводять дослідження ДНК-білкових взаємодій?
- 4) Які методи використовують для аналізу білок-білкових взаємодій?
- 5) Що таке вестерн-блоттінг і як він застосовується?
- 6) Які перспективи використання нанотехнологій у молекулярній біології?
- 7) Як здійснюється олігонуклеотид-направлений мутагенез?

ЛЕКЦІЯ 9

ПОТЕНЦІЙНІ ЗАГРОЗИ ВІД ВПРОВАДЖЕННЯ ТРАНСГЕННИХ ТЕХНОЛОГІЙ ТА БІОБЕЗПЕКА

(2 ГОДИНИ)

1. Потенційні загрози від використання трансгенних технологій.
 2. Біобезпека: визначення та значення. Перспективи розвитку біобезпеки
 3. Приклади загроз та заходів біобезпеки
 4. Етичні аспекти та громадська думка.
 5. Контроль досліджень у галузі молекулярної біотехнології.
- Міжнародні регулюючі організації та їх роль у забезпеченні біобезпеки.

Трансгенні технології — це методи введення генетичних змін у живі організми з метою отримання нових властивостей або поліпшення існуючих. Їх застосовують у сільському господарстві, медицині, промисловості та екології. Наприклад, створення трансгенних рослин, стійких до шкідників, таких як кукурудза з геном *B. thuringiensis* (Bt).

1. Потенційні загрози від використання трансгенних технологій

Загрози від використання трансгенних технологій мають багато аспектів. З точки зору екології – це зміна біорізноманіття внаслідок поширення трансгенних організмів (ТО) та ризик утворення «супербур'янів» через перехресне запилення. Це стосується перш за все неконтрольованого поширення трансгенних рослин у дикій природі.

З точки зору медицини достатньо серйозні загрози можуть виникати для здоров'я. Це можуть бути алергічні реакції або токсичність від трансгенних продуктів (дискусія щодо потенційної алергенності трансгенної сої). Крім того, дуже велика небезпека може загрожувати людству через ризик передачі генів антибіотикорезистентності.

Економічні ризики можуть виникнути через монополізація ринку біотехнологічними компаніями, що може створити відчутну проблему залежності фермерів від трансгенного насіння.

Створення генетично модифікованих організмів (ГМО) може викликати конфлікти через відсутність належного маркування та упереджене сприйняття технологій суспільством, тобто зумовлювати соціальні та етичні проблеми

2. Біобезпека: визначення та значення

Біобезпека – це система заходів для попередження ризиків, пов’язаних із використанням біотехнологій. Вона охоплює регулювання, моніторинг та етичні норми.

Основні принципи біобезпеки:

- Запобігання неконтрольованому розповсюдженню трансгенних організмів.
- Оцінка ризиків перед виведенням продуктів на ринок.
- Захист від біологічного тероризму.

Перспективи розвитку біобезпеки включають: створення нових систем моніторингу поширення трансгенних організмів, використання CRISPR-Cas9 для точного регулювання генетичних змін, розробка програм навчання для підвищення обізнаності суспільства щодо ГМО.

3. Приклади загроз та заходів біобезпеки

Найбільш яскравим прикладом загроз, які виникають через розповсюдження в природі генетично модифікованих організмів, є генетично модифікований лосось, який швидко росте та витісняє природного лосося. Для унеможливлення такого процесу необхідно суворо дотримуватись заходів безпеки - вирощувати такі організми лише у закритих системах.

Інший приклад - розповсюдження ГМО-зерна. Зважаючи на ті переваги, яке воно має у порівнянні з звичайним зерном, відмовитись від його

впровадження у сільськогосподарське виробництво не представляється можливим, але щоб запобігти витісненню традиційних видів з природи необхідно провести додаткові наукові дослідження по створенню стерильних трансгенних організмів (технологія термінатора).

4. Етичні аспекти та громадська думка

Створення ГМО організмів та широке впровадження їх у всі галузі діяльності викликає ряд етичних питань:

- Чи є морально допустимим змінювати генетичний код живих організмів?
- Чи припустимо втручання у природні екосистеми?

Для того, щоб сформувати в суспільстві правильне сприйняття ГМО необхідно проводити велику популяризаційну роботу, оскільки суспільні кампанії проти ГМО часто викликані недостатньою обізнаністю та страхами. Як програму мінімум багато країн запроваджують маркування продуктів, що містять ГМО, для забезпечення права вибору споживачів.

Для формування правильної громадської думки велику роботу повинні проводити профільні вчені.

5. Контроль досліджень у галузі молекулярної біотехнології.

Міжнародні регулюючі організації та їх роль у забезпеченні біобезпеки

У багатьох країнах існують суворі норми щодо випробувань та комерціалізації трансгенних організмів. Наприклад, у ЄС діє директива про вивільнення ГМО в навколишнє середовище. Це стосується і лабораторної безпеки. Тут незалежно від ризиків встановлюються рівні біобезпеки від BSL-1 до BSL-4.

Крім того передбачається комплексна оцінка потенційного впливу на здоров'я людей, тварин і довкілля. Стандарти оцінки ризиків ГМО розробляє світова організація охорони здоров'я (ВООЗ). Продовольча та

сільськогосподарська організація ООН (FAO) сприяє безпечному використанню біотехнологій у сільському господарстві.

Основні нормативні документи з біобезпеки:

- Картахенський протокол з біобезпеки (2000). Забезпечує регулювання транскордонного переміщення ГМО. Вимагає проведення оцінки ризиків перед імпортом ГМО в країни.
- Організація економічного співробітництва та розвитку (OECD). Розробляє керівництва з безпечного використання біотехнологій.
- Директива ЄС 2001/18/ЕС. Регулює вивільнення ГМО в довкілля та їх використання у харчових продуктах.
- Національні закони. Наприклад, у США діє законодавство, що контролює розробку та використання біотехнологій через Агентство з охорони навколишнього середовища (EPA) та Міністерство сільського господарства США (USDA).
- Протокол про заборону біологічної зброї (1972). Забороняє розробку та зберігання біологічної зброї, що включає небезпечні біотехнологічні розробки.

Потенційні загрози від впровадження трансгенних технологій потребують ретельного аналізу та регулювання. Біобезпека — це ключовий елемент у забезпеченні безпечного використання біотехнологій. Залучення міжнародних організацій та впровадження інноваційних технологій допоможуть мінімізувати ризики та сприяти сталому розвитку цієї галузі.

Контрольні питання:

- 1) Які потенційні загрози для довкілля пов'язані з використанням ГМО?
- 2) Які основні заходи біобезпеки використовують при роботі з трансгенними організмами?
- 3) Які існують міжнародні та національні регуляторні механізми контролю за ГМО?
- 4) Як трансгенні технології можуть впливати на біорізноманіття?

- 5) Які соціальні та етичні питання виникають у зв'язку з використанням генетично модифікованих організмів?
- 6) Які методи оцінки безпеки ГМО існують?
- 7) Як здійснюється контроль за поширенням ГМО в сільському господарстві?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Базова

1. Біотехнологія : підруч. для підготов. спец. в аграр. вищ. навч. закладах / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський ; за ред. В. Г. Герасименка. Київ : Фірма "Інкос", 2006. - 646 с.
2. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підручник. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. - 520 с.
3. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія. Київ : НУХТ, 2009.- 336 с.
4. Яворська Г. В., Гудзь С. П., Гнатуш С. О. Промислова мікробіологія. Львів, вид. центр Львів. нац. ун-ту ім. І Франка, 2008. -256 с.
5. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник / Трохимчук І. М., Плюта Н. В., Логвиненко І. П., Сачук Р. М. Київ : Видавничий дім «Кондор», 2019. - 304 с.
6. Федоренко В.О. , Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Навчальний посібник для студентів біологічних факультетів університетів. – Львів: Видавничий центр імені Івана Франка, 2007.- 279 с.

Допоміжна

7. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ : Логос, 2005. - 730 с.
8. Кушнір Г. П., Сарнацькак В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ:Наукова думка, 2005. – 272 с.
9. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Культура ізолюваних клітин, тканин і органів рослин. Київ : Фітоцентр, 2001. - 48 с.
10. Іншина Н. М. Біотехнологія. Суми : Видавництво СумДПУ ім. А.С.Макаренка, 2009. - 171 с.
11. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології. Лабораторний практикум. Київ: Академперіодика, 2010. - 232 с.

12. Бондар І. В., Гуляєв В. М. Промислова мікробіологія. Харчова і агробіотехнологія : навчальний посібник для студентів спеціальності 7.092901-"Промислова біотехнологія". Дніпродзержинськ : ДДТУ, 2004.- 280 с.
13. Галяс В. Л., Колотницький А. Г. Біохімічний і біотехнологічний словник. Львів : Оріяна-Нова, 2006. - 468 с. 87. Екологічна біотехнологія / Швед О. В., Миколів О. Б., Комаровська-Порохнявець О. З., Новіков В. П.: у 2 кн. Львів: Вид-во Нац. ун-ту «Львівська політехніка», 2010. Кн. 1. - 424 с.
14. Екологічна біотехнологія / Швед О. В., Миколів О. Б., Комаровська-Порохнявець О. З., Новіков В. П.: у 2 кн. Львів: Вид-во Нац. ун-ту «Львівська політехніка», 2010. Кн. 2.— 368 с.
15. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology/ Edited by K.Wilson and J.Wolker (Sixth edition).-Cambridge University Press, 2005. 759 p.
16. Nicholl Desmond S.T. An Introduction to Genetic Engineering (Third edition).-Cambridge University Press, 2023. 504 p.
17. Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology.Principle and Application of Recombinant DNA (Second edition).- ASM PRESS WASHINGTON, D.C., 2002.1020 p.
18. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Lab. Press, 2012.2028 p.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Карпов О. В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія: Підручник. Київ: Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
2. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Київ : Поліграф-Консалтинг, 2003. 520 с.
3. Кравців Р. Й., Колотницький А.Г., Буцяк В. І. Генетична інженерія. – Львів, 2008. 214 с.
4. Генетика: підручник / А. В. Сиволоб та ін. Київ : Видавничо-полігр. центр «Київ. універси-тет», 2008. 320 с.
5. Яворська Г. В., Гудзь С. П., Гнатуш С. О. Промислова мікробіологія. Львів : вид. центр Львів. нац. ун-ту ім. І Франка, 2008. 256 с.
6. Molecular Biology Of The Cel / B. Alberts et al. 7th ed. 2024. 1555 p.
7. Industrial Biotechnology / ed. by C. Wittmann, J. C. Liao. Weinheim, Germany : Wiley, Co. KGaA, 2017. 640 p.URL: <https://doi.org/10.1002/9783527807796>.
8. Transgenic Plants / ed. by J. M. Dunwell, A. C. Wetten. Totowa, NJ : Humana Press, 2012. 512 p.URL: <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-558-9>.
9. Glick B. R., Patten C. L. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, Fifth Edition. American Society of Microbiology, 2017. 740 p.URL: <https://doi.org/10.1128/9781555819378>.
10. Poluri K. M., Gulati K. Protein Engineering Techniques. Singapore : Springer Singapore, 2017. 134 p.URL: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2732-1>.
11. A review of transgenic animal techniques and their applications / W. M. E. Shakweer et al. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 21, no. 1. 14 p.URL: <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00502-z>.
12. Bawa A. S., Anilakumar K. R. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2012. Vol. 50, no. 6. P. 1035–1046. URL: <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0899-1>.
13. Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2664 p.
14. Essential stem cell methods. London : Academic Press, 2009. 608 p.

15. Biosafety and Bioethics in Biotechnology. Taylor & Francis Group, 2022.238 p.
16. Genetically Engineered Crops. Washington, D.C.: National Academies Press, 2016. 606 p.URL: <https://doi.org/10.17226/23395>.
17. Nicholl D. S. T. Introduction to Genetic Engineering. Cambridge University Press, 2023.350 p.
18. Niemeyer C. M., Mirkin C. A. Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives. Wiley & Sons, Limited, John, 2005. 491 p.
19. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology / ed. by K. Wilson, J. Walker. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 761 p.URL: <https://doi.org/10.1017/cbo9780511841477>.
20. AL. Advanced Textbook on Genomic Proteomic. World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 2022.450 p.
21. Strachan T., Read A. Human Molecular Genetics. Taylor & Francis Group, 2018.784 p.
22. Molecular Biology: Principles of Genome Function. Oxford University Press, Incorporated, 2020.912 p.
23. Genetic Engineering in 2025- Definition, History, Process and Applications: Интернет-ресурс. URL: <https://geneticeducation.co.in/genetic-engineering-in-2025/>.
24. Genetic engineering and its importance in research and development: Интернет-ресурс. URL: <https://www.labtoo.com/en/blog/genetic-engineering>
25. Editing livestock genomes with site-specific nucleases / D. F. Carlson et al. *Reproduction, Fertility and Development*. 2014. Vol. 26, no. 1. P. 74. URL: <https://doi.org/10.1071/rd13260>.
26. Synthetic biology-inspired cell engineering in diagnosis, treatment, and drug development / N. Zhao et al. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023. Vol. 8, no. 1. 21 p. URL: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01375-x>.