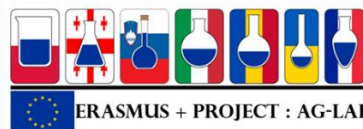




Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union



ЛАБОРАТОРНА СПРАВА В АГРОНОМІЇ

Навчальний посібник



**І.М. Коваленко, Н.М. Кандиба, Т.О. Рожкова, Л.В. Крючко,
О.М. Бакуменко, В.М. Коваленко, І.В. Верещагін, О.М. Данильченко**

ЛАБОРАТОРНА СПРАВА В АГРОНОМІЇ



Навчальний посібник

Суми - 2020

Зміст

Вступ (<i>Бакуменко О.М., Данильченко О.М.</i>)	5
1. Клітинна і молекулярна біологія (<i>Верещагін І.В.</i>)	6
1.1. Предмет клітинної і молекулярної біології	7
1.2. Білки	14
1.3. Нуклеїнові кислоти. ДНК	22
1.4. Нуклеїнові кислоти. РНК	30
1.5. Структура геному вірусів і фагів	35
1.6. Структура геному прокаріотів	41
1.7. Структура геному еукаріотів	47
2. Генетична інженерія (<i>Кандиба Н.М.</i>)	56
2.1. Ферменти генетичної інженерії. Ч.1	57
2.2. Ферменти генетичної інженерії. Ч.2	65
2.3. Вектори генетичної інженерії	68
2.4. Гібридизація нуклеїнових кислот	71
2.5. Секвенування нуклеїнових кислот	74
2.6. Технологія рекомбінантних ДНК	84
2.7. Створення геномних бібліотек та клонотек генів	92
3. Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК-паспортизація (<i>Коваленко В.М.</i>)	103
3.1. Методи отримання генетично модифікованих рослин	104
3.2. Трансформація рослин Ті-плазмідною з <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	110
3.3. Сучасний стан та поширеність ГМ рослин	119
4. Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників (<i>Рожкова Т.О.</i>)	137
4.1. Імунітет рослин у сучасному землеробстві	138
4.2. Властивості патогенів рослин	144
4.3. Генетика патогенезу за зараження рослин мікроорганізмами	149
4.4. Впізнання партнерів та сигнальна трансдукція	154
4.5. Механізми стійкості рослин	157
4.6. Генетика стійкості рослин	165
4.7. Генетика патогенності збудників рослин	177

5. Молекулярна вірусологія (<i>Верещакін І.В.</i>)	184
5.1. Історія розвитку вчення про віруси і введення в вірусологію	185
5.2. Хімічний склад вірусів	193
5.3. Систематика і номенклатура вірусів	199
5.4. Особливості вірусів бактерій, грибів, рослин	205
5.5. Методи дослідження вірусів	216
5.6. Методи виділення вірусів	222
6. Інструментальні методи аналізу (<i>Крючко Л.В., Коваленко І.М.</i>)	233
6.1. Вступ. Інструментальні методи дослідження	234
6.2. Потенціометрія й електрометрія	245
6.3. Електрофорез	257
6.4. Хроматографія	264
6.5. Спектроскопія	272
6.6. Світлова мікроскопія	277

Вступ

Історія лабораторної справи заслуговує на особливу увагу. Сучасна лабораторна практика в агрономії розгалужена. Вона об'єднує широке коло окремих і спеціальних дисциплін: клітинна і молекулярна біологія, генетична інженерія, діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК - паспортизація, генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників, молекулярна вірусологія, інструментальні методи аналізу тощо. Разом із тим, усі ці дисципліни об'єднуються загальними поняттями і закономірностями, що становлять єдиний фундамент всієї лабораторної практики. Такий аспект викладення і є ключовим у пропонованому посібнику.

Підготовка його викликана участю в програмі Erasmus +, проекті КА2 n° 586383-ERP-1-2017-1-SI-ERPKA2-SVNE-JP (2017-2978 / 001-001) «*Поліпшення навичок спеціалістів з лабораторної практики у фахівців агро - продовольчого сектору Східної Європи*» (*Ag-Lab*) та викладанням авторами курсу студентам агрономічного факультету у Сумському національному аграрному університеті, і відсутністю загального посібника з лабораторної практики адаптованого до навчальних програм з дисциплін для підготовки магістрів в аграрних вищих навчальних закладах III – IV рівнів акредитації.

Автори прагнули описати наукові закономірності в найбільш узагальненій формі з наголосом на суті практичних явищ. Враховувалось також і те, що сучасні дисципліни диференційовані на розділи і підрозділи залежно від об'єктів і напрямку досліджень, хоча для всіх закономірності є дуже схожими. При цьому розділам курсу приділено різну увагу, деякі трактуються специфічно.

Даний посібник є конспективним викладенням курсу, узагальненим у вигляді шести розділів, які включають 36 тем.

У *першому розділі* до курсу наводяться відомості про предмет клітинна і молекулярна біологія, її місце в системі біологічних наук, організацію геному еукаріот, генетично детерміновані механізми синтезу білка в клітині та генезис її основних понять.

У *другому розділі* курсу – «*Генетична інженерія*», який складається із семи лекцій, наводяться теоретичні та експериментальні докази ролі ферментів та векторів в генетичній інженерії, методи і способи гібридизації та секвенування нуклеїнових кислот, технологій створення рекомбінантних ДНК та геномних бібліотек і клонотек генів.

У *третьому розділі* курсу – «*Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК-паспортизація*» (3 лекції) - обговорюються методи отримання генетично модифікованих рослин, трансформація рослин Ti-плазмідом з *Agrobacterium tumefaciens* та сучасний стан та поширеність генетично модифікованих рослин.

В *четвертому розділі* курсу – «*Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників*» (7 лекцій) - наводяться відомості про імунітет рослин у сучасному землеробстві, властивості патогенів рослин, генетику патогенезу за зараження рослин мікроорганізмами, впізнання партнерів та сигнальної трансдукції, механізми стійкості рослин, генетику стійкості рослин та патогенності збудників рослин.

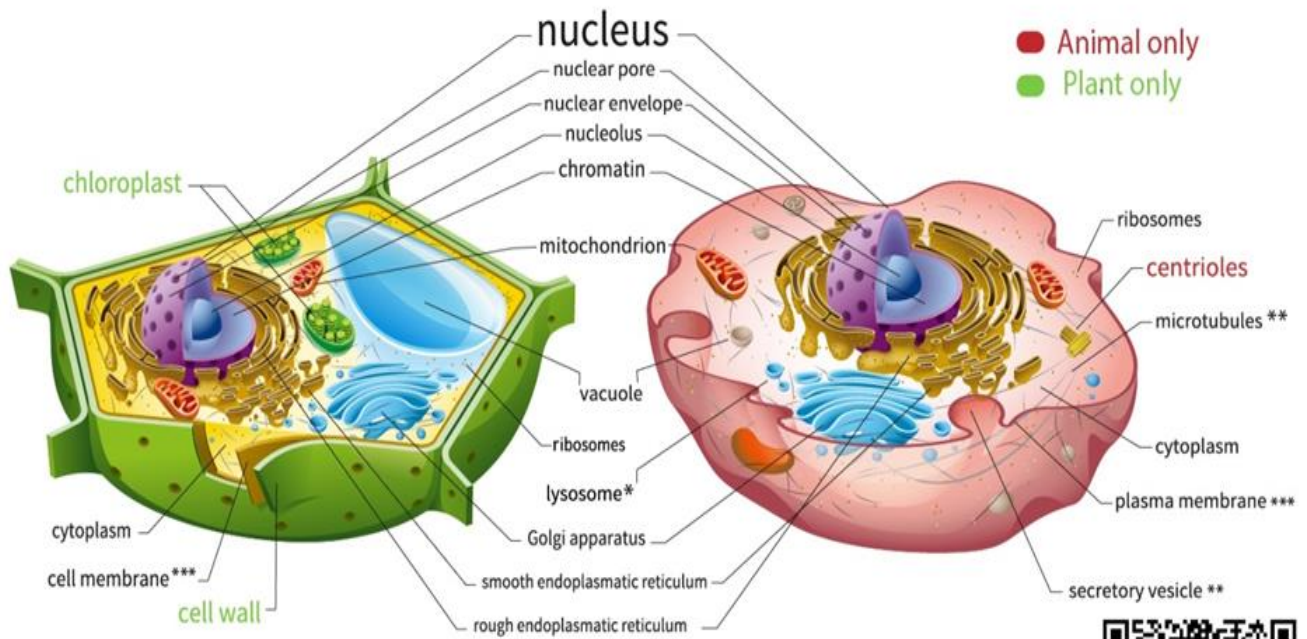
В *п'ятому розділі* – «*Молекулярна вірусологія*» (6 лекцій) розглядаються історія розвитку вчення про віруси, систематика, номенклатура та хімічний склад вірусів, особливості вірусів бактерій, грибів, рослин та методи дослідження і виділення вірусів.

Шостий, заключний розділ курсу «*Інструментальні методи аналізу*» (6 лекцій) присвячено розгляду сучасних проблем та інструментальних методів дослідження: потенціометрія й електрометрія, електрофорез, хроматографія, спектроскопія і світлова мікроскопія.

Кожний розділ завершується контрольними тестовими завданнями для самоконтролю.

Посібник містить список використаної літератури з кожного розділу курсу.

Сподіваємось, що матеріал посібника сприятиме засвоєнню основних положень з лабораторної практики та її складових. Будемо вдячні за побажання і доброзичливу критику відносно даного посібника (e-mail: ihor.kovalenko@snau.edu.ua).



- * Plants may have lytic vacuoles, which act like lysosomes in animal cells.
- ** Although they're not labelled here, plant cells have microtubules and secretory vesicles, too.
- *** Cell membrane and plasma membrane are just different names for the same structure.



1

КЛІТИННА І МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ

Розділ 1

Тема 1.1. Предмет клітинної і молекулярної біології



1.1.1. Клітина як структурна та функціональна одиниця живого організму. Центральна догма молекулярної біології. Клітинна і молекулярна біологія – складається з двох складних компонентів.

Клітинна біологія – розділ біологічної науки, що вивчає біологічні та хімічні процеси, що відбуваються на клітинному рівні організації живої матерії.

Молекулярна біологія – розділ біохімії та клітинної біології, що вивчає закономірності збереження та реалізації генетичної інформації, будову та функціонування інформаційних молекул – ДНК і РНК.

Загальними, спільними в основних своїх рисах для всіх живих систем, процесами, що лежать в основі функціонування організмів, є процеси збереження та реалізації спадкової інформації.

Магістральний шлях передачі інформації в біологічних системах відображає схема, запропонована свого часу *Френсісом Кріком* під назвою центральна догма молекулярної біології (рис. 1.1.1):

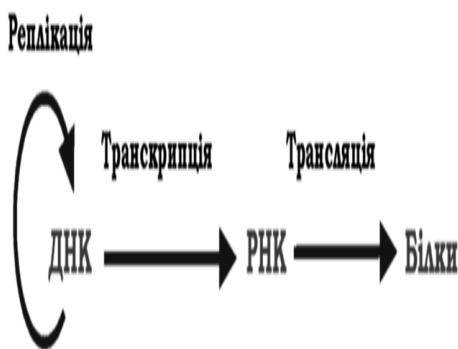


Рис. 1.1.1. Центральна догма молекулярної біології (by Francis Crick, 1958).

Клітинна і молекулярна біологія

Формулювання центральної догми можна вважати початком молекулярної біології як окремої науки. Слід зауважити, що крім відображених на схемі, у живих системах реалізуються також шляхи передачі інформації від РНК на РНК і на ДНК.

Вузловими точками схеми – джерелом і об'єктами передачі інформації – є біологічні макромолекули двох основних типів: нуклеїнові кислоти та білки. Приставка “макро” відображає той простий факт, що молекула має великий розмір не характерний для звичайних молекул неорганічного світу. Великий розмір біологічних макромолекул є принциповою відмінністю живих систем: тільки молекула, яка складається з великої кількості атомів, здатна мінімізувати перешкоджаючий вплив випадкових теплових флуктуацій і здійснювати більш-менш точні операції на основі численних взаємодій з іншими молекулами.

Макромолекули – це полімерні ланцюги, що складаються з мономерних хімічних груп певного класу. Кінцевою точкою передачі біологічної інформації є білки (або протеїни). біополімери, побудовані головним чином з 20 типів амінокислот. Велике розмаїття амінокислотних послідовностей створює можливості для реалізації різноманітних шляхів укладання ланцюгів у просторі. утворення специфічних просторових структур білків для виконання певних специфічних завдань. Головним типом цих завдань є каталіз численних біохімічних реакцій (у тому числі тих, що забезпечують передачу біологічної інформації). Здійснення реакцій, які мають відбуватися у вузькому діапазоні фізіологічних умов, було б практично неможливим без такого каталізу. Крім того, білки є основним будівним матеріалом будь-якої біологічної системи й забезпечують виконання всіх інших біологічних функцій: транспорт речовин, передачу регуляторних сигналів, спрямовані рухи частин системи, захист від чужорідних молекул тощо.

Мономерами нуклеїнових кислот є нуклеотиди: нуклеотиди чотирьох типів

Розділ 1

утворюють полінуклеотидний ланцюг, два такі ланцюги, утримуючись разом за рахунок певних взаємодій, формують дволанцюгову спіральну молекулу дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК).

Нуклеотиди, котрі трохи відрізняються за хімічною будовою, утворюють (як правило, односторонню) полімерну молекулу рибонуклеїнової кислоти (РНК). Молекула ДНК відрізняється високою стабільністю, що робить її надійним сховищем спадкової інформації. Сама інформація записана у вигляді послідовності нуклеотидів чотирьох типів, а структура дволанцюгової молекули забезпечує функціонування ДНК як носія інформації. Ключовим у цьому відношенні є принцип комплементарності, згідно з яким чотири нуклеотиди здатні утворити дві комплементарні пари, і ДНК є стабільною тільки за умови, що у двох ланцюгах один проти одного розташовані нуклеотиди однієї такої пари. Таким чином, кожен із ланцюгів є своєрідним дзеркальним відображенням іншого.

Спадкова інформація, записана в послідовності нуклеотидів на ділянці ДНК, є інформацією про послідовність амінокислот у складі білка. *Окрема змістовна ділянка ДНК, у послідовності якої закодована амінокислотна послідовність білка, називається геном, а сукупна нуклеотидна послідовність ДНК у клітинах певного організму (яка включає не тільки гени) геномом. Упаковка ДНК у клітинах у складі ДНК-білкового комплексу називається хроматином. Система співвідношень між елементами послідовності нуклеотидів і амінокислотними послідовностями білків – генетичний код, який використовується живими системами для перекладу нуклеотидного тексту в послідовність амінокислот у складі білка.*

Суттєвим моментом функціонування живої системи є не тільки реалізація (експресія) генетичної інформації, а й збереження її та подвоєння з метою передачі наступному поколінню. Подвоєння інформації – *реплікація*

Клітинна і молекулярна біологія

– це відтворення молекули ДНК у двох ідентичних дочірніх копіях. Головним механізмом реплікації є вже згадуваний кілька разів принцип комплементарності: кожен з ланцюгів ДНК використовується як матриця для синтезу комплементарної ДНК-репліки. Спеціальні молекулярні системи забезпечують високу точність синтезу ДНК під час реплікації. Процеси виправлення помилок, які все ж таки виникають під час цього процесу, а також пошкоджень у молекулі ДНК, що з'являються під дією зовнішніх впливів, об'єднано під назвою репарації ДНК.

1.1.2. Клітина як структурна і функціональна одиниця живого організму.

Основна маса живих істот представлені клітинними організмами. Серед них є одноклітинні та багатоклітинні форми, в яких кількість клітин представлена мільйонами або мільярдами. З клітинами пов'язані всі найважливіші функції життєдіяльності організмів – ріст та розмноження, поглинання та виділення різних речовин, дихання та подразнення. Клітині притаманні всі властивості живої матерії.

У результаті численних досліджень рослинних і тваринних клітин ботанік *Матіас Шлейден* та цитолог *Теодор Шванн* у 1838 – 1839 рр. сформулювали *клітинну теорію*, яка стала одним з найвизначніших теоретичних узагальнень в історії біологічної науки. Основні положення теорії Шлейдена-Шванна наступні:

- клітина є елементарною одиницею багатоклітинного організму та елементарною живою системою одноклітинного;
- клітини різних організмів гомологічні (подібні) за своєю будовою і складаються з мембрани, цитоплазми та ядра;
- розмноження клітин відбувається за рахунок поділу початкової (материнської) клітини;
- багатоклітинні організми являють собою складні системи клітин, об'єднані в

Розділ 1

цілісні інтегровані системи тканин та органів, підпорядкованих і пов'язаних між собою гуморальними та нервовими формами регуляції.

Існує два типи клітинних організмів – *прокаріоти* (доядерні) та *еукаріоти* (ядерні). До перших належать бактерії та синьозелені водорості, до другого – тварини, гриби та рослини.

Прокаріоти – доядерні організми, які не мають типового ядра, оточеного ядерною мембраною. Генетичний матеріал представлений генофором – ниткою ДНК, яка має вигляд кільця. У клітин прокаріотів відсутні центріолі, пластиди, мітохондрії, розвинена система мембран.

Еукаріоти – ядерні організми, які мають ядро, оточене ядерною мембраною. Генетичний матеріал зосереджений переважно в хромосомах. Діляться ці клітини мітотично, в них є мітохондрії, пластиди, центріолі. Серед еукаріотів є як багатоклітинні, так і одноклітинні організми.

Форма, розміри і структура клітин залежать від функцій, які вони виконують. Кількість клітин в організмі може бути від 1 до 200 млрд. Форма може бути постійною, або ні (амеби, лейкоцити), а розмір коливається від декількох тисячних міліметра до декількох сантиметрів. У багатоклітинних організмів клітини утворюють тканини, що входять до складу органів. Життєдіяльність клітин у багатоклітинних підпорядкована координуючому впливу цілісного організму. Координація у тварин здійснюється нервовою та ендокринною системами, а в рослин – безпосереднім цитоплазматичним зв'язком між клітинами та фітогормонами.

Клітина складається з двох основних компонентів: цитоплазми та ядра.

Цитоплазма – напіврідка колоїдна маса, що складається з найтонкіших ниток, мембран, зерен. Цитоплазма відмежована від навколишнього середовища тришаровою плазматичною мембраною, на якій в деяких випадках формується клітинна оболонка.

Клітинна і молекулярна біологія

Цитоплазма складається з достатньої однорідної частини (гіалоплазми), пронизаної каналами ендоплазматичної сітки (ретикулуму), також утвореної тришаровими мембранами.

Ендоплазматична сітка (ЕПС) зв'язана з ядром клітини, з усіма її органідами та оболонкою. Вона представляє єдину регуляторну систему клітини.

Спільними для всіх клітин органідами є мітохондрії, рибосоми, апарат Гольджі, у клітинах тварин та примітивних рослин – центросоми (клітинний центр), у тварин – лізосоми, у рослин пластиди. Крім органідів в цитоплазмі клітин наявні речовини щільної чи рідкої консистенції (включення): гранули та вакуолі.

Центросоми (клітинний центр) складається з 2 компонентів – центріолі і центросфери. З центросомою у тварин та примітивних рослин пов'язане утворення ахроматинового веретена поділу. У клітинах вищих рослин центросом не знайдено.

Речовини із зовнішнього середовища надходять у клітину через зовнішню цитоплазматичну мембрану і по каналах ЕПС, або безпосередньо по гіалоплазмі рухаються до ядра та інших органідів клітини. Подальше їх перетворення у клітині зумовлені наявністю численних ферментів, які синтезуються безпосередньо на рибосомах. Рибосоми містять велику кількість РНК та білків: близько 50% всієї клітинної РНК. Встановлено, що в рибосомах інформація, яка надійшла з ядра, «зчитується» в процесі синтезу білків.

У виробництві енергії, яка витрачається на всі процеси життєдіяльності клітин, найважливішу роль відіграють мітохондрії. Мітохондрії складаються з білків, ліпідів, нуклеїнових кислот.

Продукти життєдіяльності клітини каналами ЕПС надходять до зовнішньої цитоплазматичної мембрани, через яку й виводяться. Крім того, вони відкладаються у цитоплазмі у вигляді включень. У разі, якщо білки виділяються з клітини (секреція), вони

Розділ 1
звичайно попередньо транспортуються каналами ЕПС до комплексу Гольджі, у якому концентруються у вигляді секреторних гранул.

Для цитоплазми рослинних клітин характерні **пластиди** – хлоропласти, лейкопласти та хромопласти. Пластиди беруть участь у фотосинтезі, синтезі крохмалю, пігментів, білків, ліпідів, нуклеїнових кислот.

В еукаріотичних клітинах генетичний матеріал зосереджений у **ядрі**. Генетичний матеріал в інтерфазному ядрі знаходиться у вигляді хроматинових ниток. Переплітаючись усередині ядра, вони утворюють хроматинову сітку. Кількість хроматинових ниток відповідає диплоїдному набору **хромосом**. **Хроматинові нитки** – це комплекс ДНК та білків у співвідношенні 1:1. При розподілі ядра хроматин ущільнюється у вигляді коротких спіральних ниток – хромосом. Хромосоми несуть гени – ділянки ДНК, одиниці спадкової інформації.

Властивості хроматину:

1. Забезпечує сталість геному від покоління до покоління;
2. Здатний змінювати гістонові та негістонрові білки залежно від активності геному;
3. Може змінювати структуру в різні періоди клітинного циклу;
4. Існує у вигляді еухроматину та гетерохроматину;
5. Має здатність формувати хромосоми при поділі клітини;

Функції хроматину:

1. Збереження генетичної спадкової інформації у вигляді чіткої послідовності нуклеотидів ДНК;
2. Перенесення спадкових характеристик від батьків до нащадків за допомогою формування хромосом;
3. Забезпечення росту клітин, підтримка їх будови та функцій шляхом керування синтезу структурних білків;
4. Контроль метаболізму шляхом регуляції утворення необхідних ферментів;

Клітинна і молекулярна біологія

5. Формування ядерцець, де утворюються рибосоми.

Хромосома – елемент ядра клітини, здатний до самовідтворення.

Гомологічні хромосоми – хромосоми, що мають однакову форму, зміст генів, розмір, але різні за походженням: 1 від батька, 1 від матері. Хромосома складається з 2 хроматид, які в свою чергу складаються з 2 нуклеопротейдних ниток – **хромонем**. В кожній хромосомі є первинна перетяжка – центромера. За формою хромосоми бувають:

- Телоцентричні;
- Акроцентричні;
- Субметацентричні;
- Метацентричні.

Властивості хромосом:

1. Індивідуальність (кожна хромосома володіє своєю будовою);
2. Парність;
3. Постійне число.

Властивості хромосом нерозривно пов'язані з каріотипом.

Каріотип – сукупність особливостей хромосомного комплексу, яка стосується числа і форми хромосом. Зовнішній вигляд і число хромосом може змінюватися у ході клітинного (мітотичного чи мейотичного) циклу.

Мітоз – зрівняльний поділ клітин, в результаті якого кількість хромосом у дочірніх клітинах залишається такою ж як і в батьківських.

Біологічна сутність мітозу полягає у рівномірному розподілі спадкової інформації між новоутвореними клітинами. Увесь комплекс процесів, в результаті якого з однієї клітини утворюється дві, називається мітотичним циклом. Мітотичний процес поділяється на ряд етапів, що якісно відрізняються між собою. Кожна попередня фаза підготовлює перехід до нової фази.

Інтерфаза – фаза між 2 мітозами, в якій відбувається активні метаболітичні процеси, в цій фазі ядро має гомогенний вигляд. Хромосоми перебувають у деспіралізованому вигляді. В клітині, що готується до поділу,

Розділ 1

подвоюється кількість ДНК. На основі синтезу ДНК подвоюється кількість хромосом. Кожна створює собі подібну. В інтерфазі нагромаджується запаси енергії та будівельний матеріал, які використовуються під час поділу клітини. Інтерфаза складається з 3 стадій:

- **Предсинтетична (G)** – підготовчі процеси до синтезу ДНК;

- **Синтетична (S)** – центральний пункт інтерфази відносно авторепродукування хромосом лежить в синтезі ДНК;

- **Постсинтетична (G-2)** – кожна хромосома починає підготовку до наступного мітозу через ущільнення і спіралізацію хромосом.

1. Профаза – ядро збільшується в розмірі і в результаті спіралізації ниток хромосом з'являються видимі хромосоми, які складаються з 2 половинок – хроматид, утримуваних за допомогою центромер. Профаза завершується зникненням ядерця, руйнується ядерна оболонка і утворюються 2 центріолі. Центріолі розходяться до полюсів клітини і починається утворюватися веретено поділу.

2. Метафаза – хромосоми розміщуються в екваторіальній площині та утворюють метафазну пластинку – центросоми хромосом з'єднуються з нитками веретена, які знаходяться біля полюсів клітини.

3. Анафаза – хроматиди відокремлюються і від'єднуються їх центромери. Кожна хромосома стає самостійною з відокремленою центромерою і відходить до того чи іншого полюсу.

4. Телофаза – на полюсах відбувається деспіралізація хромосом, вони витягуються і утворюють сітку інтерфазного ядра, з'являється ядерна оболонка, ядерце та цитоплазма. 2 ідентичні дочірні клітини.

Отже, внаслідок мітозу матеріал, що входить до складу хромосом рівномірно розподіляється між дочірніми клітинами. Процес правильного розподілу хроматид між

Клітинна і молекулярна біологія

дочірніми клітинами забезпечують стійкі властивості організму. Сталість кількості хромосом в клітині забезпечується тим, що під час мітозу до полюсів відходять половинки хромосом – хроматиди.

Мейоз – особливий поділ клітини, внаслідок чого хромосомний набір зменшується вдвічі (для організмів, що розмножуються статеві).

- **Зиготний** – мейотичний поділ проходить після запліднення (споровики, водорості, аскоміцети), в яких життєвий цикл перебуває у гаплоїдному стані.

- **Гаметний** – мейотичний розподіл йде при розвитку генеративних органів – гаметангіїв (людина).

- **Проміжний** – спостерігається в організмів в період між проходженням стадій спорифіту і гаметофіту.

В результаті мейозу кількість хромосом, утворених при цьому, зменшується в 2 рази. А коли статеві клітини (гамети) зливаються, то відновлюється загальна кількість хромосом.

Гамети – зрілі чоловічі і жіночі клітини, які мають гаплоїдний набір хромосом.

Крім зменшення кількості хромосом в мейозі відбувається інше важливе явище – це обмін ділянками між гомологічними хромосомами – **кросинговер**. Після обміну ділянками відбувається нове поєднання ділянок і утворюються різні комбінації спадкових факторів. Загалом мейоз приводить до спадкової мінливості і має велике значення в еволюційному розвитку.

Біологічне значення мейозу. Мейоз являє собою досконалий механізм, який забезпечує сталість каріотипу видів, які розмножуються статевим шляхом. Мейоз також забезпечує і спадкову мінливість організмів. В профазі 1 гомологічні хромосоми обмінюються ділянками. В анафазі 1 гомологічні хромосоми з різними наборами спадкової інформації опиняються в різних дочірніх клітинах.

Мейоз складається з 2 послідовних поділів, інтерфаза між якими скорочена або

Розділ 1 відсутня, і в цій інтерфазі не відбувається збільшення хромосом.

1-й поділ **редукційний**.

2-й поділ **екваційний** – такий як і мітоз.

Кожен з цих поділів має 4 послідовних фази: профаза, метафаза, анафаза, телофаза.

Найбільш складна фаза 1 поділу складається з 5 стадій:

1) **Лептотена** – ядро збільшується, хромосоми мають вигляд довгих тонких ниток, кожна складається з 2 хроматид.

2) **Зиготена** – кон'югація – зближення гомологічних хромосом по верхню хроматид по всій довжині.

3) **Пахітена** – конюгуючі хромосоми створюють здвоєні пари – біваленти. Кожен бівалент складається з 4 хроматид.

4) **Диплотена** – хроматиди у спарених гомологічних хромосомах починають розходитись. В цей період добре спостерігається перехрест гомологічних хромосом.

5) **Діакінез** – хромосоми спіралізуються, потовщуються, вкорочуються, оболонка ядра повністю зникає.

Метафаза 1. – спарені хромосоми, які складаються з 4 хроматид, розташовуються у площині екватора. Нитки веретена поділу приєднуються до центромер гомологічних хромосом. Центромери хромосом розташовані 1 проти 1.

Анафаза 1. – гомологічні хромосоми розходяться до протилежних полюсів клітини. Кожна складається з 2 зв'язаних між собою хроматид. До кожного полюсу відходить 1 з хромосом кожної пари. Таким чином, в кожен утворену дочірню клітину потрапляє половина хромосомного матеріалу материнської хромосоми. Відбувається редукція, або зменшення числа хромосом у 2 рази. Розходження окремих гомологічних хромосом є випадковою подією і яка з хромосом піде до 1 з полюсів – невідомо. Отже, це також є джерелом спадкової мінливості.

Телофаза 1. – дочірні клітини формують ядерну оболонку, хромосоми

Клітинна і молекулярна біологія
деспіралізуються і утворюють 2 гаплоїдні клітини.

Інтерфаза між 2 мейозами якщо відбувається, то ДНК не подвоюється.

Екваційний поділ. **Профаза 2.** (Йде за принципом мітозу). Кожна з хромосом складається з 2 хроматид, ущільнюються і йдуть до центру клітини, де утворюють веретено поділу.

Метафаза 2. – розташовані центромери в 1 площині точно по екватору і до них прикріплюються нитки веретена поділу.

Анафаза 2. – поділяються центромери і хроматиди і кожна з хроматид розходить до різних полюсів клітини.

Телофаза 2. – хромосоми деспіралізуються, формують ядерце і ядерна оболонка, і утворюється 4 гаплоїдні клітини.

Результаті 2 мейотичного поділу кількість хромосом залишається такою, як і після першого, але кількість хроматид кожної з хромосом зменшується вдвічі. Отже, після 2 послідовних мейотичних поділів диплоїдна материнська клітина утворює 4 гаплоїдні дочірні.

Генетичне значення мейозу. 1) мейоз – механізм підтримки сталої видової кількості хромосом. 2) мейоз забезпечує генетичну різноманітність гамет дякуючи випадковій рекомбінації материнських і батьківських хромосом. 3) мейоз утворює хромосоми нового генетичного складу, дякуючи кросинговеру.

1.1.3. Методи дослідження у клітинній та молекулярній біології. Структурні методи, що застосовуються в біологічних дослідженнях, включають мікроскопію у видимому світлі, електронна мікроскопія та дифракція рентгенівських променів (на волокнах і кристалах).

Світловий мікроскоп дозволяє розрізнити лінію або об'єкти, що знаходяться один від одного на відстані 0,3 мкм і більше (інакше кажучи, має роздільну здатність, 0,3 мкм); таким чином, з його допомогою можна

Розділ 1

отримати дані на рівні від великих органел до клітин. В *електронній мікроскопії* замість квантів світла використовуються електрони, що дозволяє розрізняти об'єкти або лінії, що відстоять один від одного на відстані 1 нм; цей метод використовується для більш детального вивчення клітин і клітинних органел.

Корисну інформацію про форму і масу макромолекул і органел (наприклад, рибосом) часто можна отримати за допомогою *ультрацентрифугування*, результати якого виражають у вигляді коефіцієнта седиментації (в одиницях Сведберга, S).

Таким чином, наявні методи дозволяють отримувати детальну структурну інформацію по всьому спектру біологічних об'єктів, від клітин до атомів.

Полімеразна ланцюгова реакція.

Альтернативним і додатковим до клонування методом збільшення кількості бажаного фрагмента ДНК ампліфікації є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, або PCR. Polymerase Chain Reaction). Практично ПЛР – це реакція синтезу ДНК *in vitro*, яка повторюється багато разів: синтезовані ланцюги стають матрицями для синтезу в наступному циклі реакції. Для здійснення ПЛР треба знати принаймні короткі послідовності ДНК на кінцях того фрагмента, котрий має бути ампліфікований.

У першому циклі ПЛР відбувається нагрівання суміші до 95 °С (денатурація ДНК) і охолодження до 60 °С. Після охолодження до такої все ще досить високої температури ланцюги ДНК не ренатурують, але праймери (оскільки вони присутні в досить високих концентраціях) знаходять свої комплементарні ділянки й зв'язуються з ними. Полімераза Taq починає працювати, подовжуючи ці праймери.

Усі наступні цикли ПЛР (реакція здійснюється в автоматичному режимі на приладі, що називається ампліфікатором) полягають у нагріванні суміші до 95 °С, яке змінюється охолодженням до 60 °С.

Секвенування ДНК. Клонований або ампліфікований фрагмент ДНК можна дослідити різними способами, однак

Клітинна і молекулярна біологія

найвичерпнішу інформацію дає встановлення нуклеотидної послідовності (sequence) фрагмента секвенування. Найбільш популярний сьогодні метод – Сангера (Frederick Sanger). До одноланцюгової ДНК-матриці додається радіоактивно мічений праймер, повний набір дезоксинуклеозид-трифосфатів (dNTP), ДНК-полімераза та невелика кількість дидезоксинуклеозидтрифосфату одного із чотирьох типів (наприклад, ddATP).

З метою визначення довжини фрагментів проводять гель-електрофорез у денатуруючих умовах, на сусідні лунки гелю наносять також продукти синтезу у присутності інших дидезоксинуклеотидів. Після електрофорезу та візуалізації смуг із такого гелю можна прочитати нуклеотидну послідовність.

Питання до самоконтролю:

- Хто сформулював центральну догму молекулярної біології?
 - Дж. Уотсон
 - Л. Пастер
 - Т. Шванн
 - Ф. Крік
- Що є головною особливістю клітини прокариот?
 - відсутність мітохондрій
 - відсутність центріолей
 - відсутність ядра клітини
 - відсутність розвиненої системи мембран
- Хроматинові нитки це:
 - Комплекс ДНК та білків у співвідношенні 1:1
 - Компактне пакування ДНК
 - Набір генів у певній послідовності
 - Елементи ядра клітини, здатні до самовідтворення
- Як називається зрівняльний поділ клітини?
 - мітоз
 - амітоз
 - ендомітоз

Розділ 1

г) мейоз

5. У чому полягає біологічне значення мейозу?

- а) подвоєння кількості хромосом
- б) утворюється 4 гаплоїдні дочірні клітини
- в) відбувається кон'югація хромосом
- г) забезпечує сталість каріотипу видів

6. Які з перерахованих органел клітини належать до двомембранних?

- а) комплекс Гольджі
- б) клітинний центр
- в) ендоплазматична сітка
- г) пластиди

7. Які з цих органел не містять ДНК?

- а) ядро
- б) клітинний центр
- в) мітохондрії
- г) пластиди

8. Зі скількох стадій складається профазі 1 мейозу?

- а) 4
- б) 5
- в) 6
- г) 7

9. Хто з представлених науковців сформулював положення клітинної теорії?

- а) А. Левенгук
- б) М. Мальпігі
- в) Р. Вірхов
- г) Т. Шванн

10. Єдина регуляторна система клітини це:

- а) ядро
- б) вакуоля
- в) ендоплазматична сітка
- г) комплекс Гольджі

Тема 1.2. Білки



1.2.1. Загальна характеристика білків. Білки, або протеїни (у перекладі з грецької *protos* – перший) – найважливіший клас біологічно активних речовин. Вони, як основа всього живого на Землі, здавна перебували в центрі уваги дослідників. Протягом двох століть, що налічує наука про білки, змінилося декілька концепцій про будову білків, які мало відповідали дійсності. В основному це було пов'язано з дуже низьким рівнем техніки експерименту в XIX і на початку XX століть. У наступні роки, у зв'язку з розробкою і застосуванням нових методів дослідження і обчислювальної техніки, це питання було практично вирішене. Вивчення структури великої кількості індивідуальних білків у зв'язку з їхньою біологічною функцією продовжується і сьогодні.

Білки – це високомолекулярні органічні азотовмісні сполуки, побудовані з великої кількості амінокислот, сполучених між собою кислотно-амідним (пептидним) зв'язком у поліпептидний ланцюг або ланцюги, які мають складну просторову організацію (конформацію) і виконують різноманітні функції живих організмів.

Назва «білок» походить від німецького слова «Eiweiß», що означає яєчний білок або білок взагалі. У 1838 р. голландський хімік і лікар *О. Мульдер* першим спробував дати наукове обґрунтування білкам, визначив у них вміст азоту і дав їм назву «протеїни», як обов'язковому компоненту живих організмів.

Білки є основними структурними компонентами живих організмів і в кількісному відношенні посідають перше місце серед усіх макромолекул, які містяться в живій клітині. В організмі тварин білків міститься від 40 до 50% і більше від сухої маси, менше у рослин – до 20–30%. У тканинах ссавців білки складають –

Розділ 1

18–20%, тоді як нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди – 1–15%.

Але не тільки кількісні показники свідчать про важливу роль білків. Вони мають низку особливостей, не властивих іншим органічним сполукам, а саме:

- білки – найскладніші органічні сполуки в природі; кількість можливих різновидів білкових молекул може бути нескінченною, що необхідно для реалізації видової, органкової й тканинної специфічності організмів;

- білкові сполуки, завдяки сукупності великої кількості функціональних груп і безлічі конформаційних станів, забезпечують різногачних функцій організмів;

- можливість взаємодії один з одним та з іншими сполуками, з утворенням білок-небілкових комплексів і внутрішньоклітинних біологічних структур, дозволяє білкам розпізнавати серед безлічі різних молекул клітини певну молекулу і вибірково сполучатися з нею. Це зумовлює структурну організацію речовини в живій клітині, спрямованість й послідовність хімічних перетворень у процесі метаболізму речовин;

- здатність відповідати на зовнішні і внутрішні впливи закономірною зміною конформації молекули, і відновлювати вихідний стан після припинення їх дії;

- наявність біокаталітичних (ферментативних) властивостей та інші якості забезпечують спільно з нуклеїновими кислотами передачу генетичної інформації, біосинтез білків та його регуляцію, ріст, диференціювання клітин і відтворення живих організмів.

Білки виконують різноманітні і надзвичайно важливі функції, наведені нижче.

1. Будівельна (структурна, пластична) функція. Макромолекули білків складають кістяк тканин і органів, утворюють основу протоплазми будь-якої живої клітини.

2. Каталітична, або ферментативна функція – одна з головних функцій білкових сполук. Вона полягає у прискоренні хімічних перетворень розпаду і синтезу речовин,

Клітинна і молекулярна біологія

перенесенні окремих груп атомів, електронів, протонів від однієї речовини до іншої тощо. Ця функція дозволяє вважати білки найважливішим класом біорегуляторів.

3. Рухова (механічна) функція. Будь-які форми руху в живій природі забезпечуються білковими структурами клітин. Білки беруть участь у забезпеченні різних форм механічного руху – у скороченні і розслабленні м'язів, у роботі внутрішніх органів (серця, легенів, шлунка та ін.). Ці процеси відбуваються за участю таких білків, як актин, міозин, тропоміозин і ряду інших.

4. Транспортна функція. Окремі групи білків здатні взаємодіяти з різноманітними сполуками і переносити їх. Так транспортуються в організмі нерозчинні у воді речовини (кисень, діоксид вуглецю, іони металів, ліпіди та ін.) і токсичні продукти (білірубін та ін.). Перенесення багатьох речовин через клітинні мембрани здійснюється за рахунок особливих білків-переносників.

5. Захисна функція. Ряд білкових сполук допомагає організму боротися зі збудниками хвороб та деякими патологіями. Процес зсідання крові, який захищає організм від надмірної її втрати, проходить за участю багатьох білкових факторів. Внутрішні стінки органів травлення вистелені захисним шаром слизових білків-муцинів. Основу шкіри, що охороняє організм від багатьох зовнішніх впливів, складають білки (колаген).

6. Регуляторна функція. Вона забезпечує регуляцію обміну речовин у клітинах та інтеграцію обміну в різних клітинах цілого організму. Ряд гормонів за своєю будовою належать до білків або продуктів їх перетворення; вони беруть участь у регуляції різноманітних процесів, які протікають в організмі. Регуляторна дія білків не обмежується тільки каталітичною та гормональною.

7. Рецепторна функція. Багато білкових сполук виконують важливу функцію вибіркового розпізнавання і приєднання окремих речовин. На поверхні клітинних

Розділ 1 мембран, а також усередині клітини розташовуються рецептори – білкові утворення, здатні вибірково взаємодіяти з різноманітними регуляторами (гормонами, медіаторами й іншими біологічно активними сполуками), зумовлюючи цілу низку специфічних ефектів.

8. Поживна функція. Цю функцію виконують так звані резервні, запасні білки, які є джерелом живлення плоду, клітин, які розвиваються. Білки – найважливіша складова частина їжі людини і корму тварин. Білку та його компонентам відводиться центральне місце і в проблемі створення синтетичної їжі, над розв'язанням якої працюють багато лабораторій світу.

9. Знешкоджувальна функція. Завдяки різноманітним функціональним групам білки можуть зв'язувати різні токсичні сполуки (важкі метали, алкалоїди, токсини та ін.) і знешкоджувати їх. На цьому засноване їхнє застосування як антидотів.

10. Енергетична функція. При повному розпаді одного грама білка виділяється 17,1 кДж енергії, що вказує на здатність білків брати участь у забезпеченні організму енергією. Але використання білків із цією метою відбувається тільки у випадку нестачі основних джерел енергії – вуглеводів і ліпідів.

11. Когенетична функція (префікс «ко» в перекладі з латинської означає сумісність дії). Ця функція виконується складними білками – нуклеопротейнами. Самі білки – це негенетичний (неспадковий) матеріал, але вони допомагають нуклеїновим кислотам реалізувати здатність до перенесення генетичної інформації і відтворення.

1.2.2. Амінокислотний склад білків.

Амінокислоти – структурні мономери білків. Під час повного кислотного, лужного або ферментативного гідролізу білків звільняються вільні амінокислоти.

Амінокислоти є похідними органічних карбонових кислот, у яких один або декілька

Клітинна і молекулярна біологія атомів водню у вуглецевому радикалі заміщені на аміногрупу. Залежно від розташування NH₂-групи розрізняють α-, β-, γ- та інші амінокислоти. У живих організмах вони зустрічаються у вільному або зв'язаному стані в складі деяких біологічно активних речовин, але до складу білків входять лише α-L-амінокислоти, у яких NH₂-група приєднується до α-вуглецевого атома. Якщо амінокислота містить дві аміногрупи, то друга знаходиться, головним чином, біля найвіддаленішого (крайнього) вуглецю стосовно α-вуглецевого атома.

Загальний вигляд будови α-L-амінокислоти може бути поданий формулою (рис. 1.2.1.):

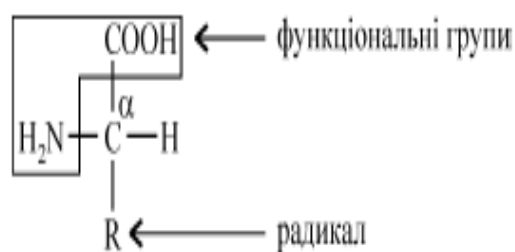


Рис. 1.2.1. Загальний вигляд будови α-L-амінокислоти. (Біологічна хімія / Л. М. Вороніна та ін. Харків : "Основа", 2000. 608 с.)

Класифікація і будова амінокислот.

Амінокислоти класифікуються кількома способами залежно від ознаки, за якою відбувається їх розподіл на групи. Прийнято в основному три класифікації амінокислот: **структурна** – за будовою бокового радикалу; **електрохімічна** – за кислото-лужними властивостями амінокислот; **біологічна** (фізіологічна) – за мірою незамінності амінокислот для організму. Відповідно до загальної формули α-амінокислоти відрізняються лише будовою R, згідно з чим вони поділяються на аліфатичні (ациклічні), циклічні (див. схему). Кожна група підрозділяється на підгрупи. Так, амінокислоти аліфатичного ряду в залежності від кількості аміно- і карбоксильних груп поділяються на моноаміномонокарбоніві, діаміномонокарбоніві.

Розділ 1

У свою чергу аліфатичні амінокислоти, залежно від наявності тієї чи іншої групи в радикалі, підрозділяють на такі підгрупи: гідрокси-, сірко-, амідовмісні та інші амінокислоти.

За електрохімічними (кислотно-лужними) властивостями амінокислоти залежно від кількості NH_2 - і COOH - груп у молекулі поділяють на три групи: **кислі** – з додатковими карбоксильними групами в боковому радикалі (моноамінодикарбонові кислоти: аспарагінова і глутамінова); **лужні** – діаміномонокарбонові (лізин, аргінін) і гістидин; **нейтральні** – решта амінокислот, у яких боковий радикал не проявляє ні кислих, ні лужних властивостей. Деякі автори вважають, що у цистеїну і тирозину сульфгідрильна і гідроксильна групи в боковому радикалі мають слабковиражені кислі властивості.

Сучасна раціональна класифікація амінокислот ґрунтується на полярності радикалів, тобто здатності їх до взаємодії з водою при фізіологічних значеннях рН (близько рН 7,0). Вона включає 4 класи амінокислот:

- **неполярні** (гідрофобні), бокові радикали яких не мають спорідненості з водою. До них відносяться аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін;

- **полярні** (гідрофільні) **незаряджені** – гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін, глутамін;

- **полярні негативно заряджені** – аспарагінова і глутамінова кислоти;

- **полярні позитивно заряджені** – лізин, аргінін, гістидин.

За біологічним (фізіологічним) значенням амінокислоти поділяють на три групи:

- **незамінні**, котрі не можуть синтезуватися в організмі з інших сполук, тому повинні обов'язково надходити з харчовими продуктами. Це незамінні добавки їжі. Незамінних амінокислот для людини вісім:

Клітинна і молекулярна біологія

треонін, метіонін, валін, лейцин, ізолейцин, лізин, фенілаланін і триптофан;

- **напівзамінні** амінокислоти можуть утворюватися в організмі, але не в достатній кількості, тому частково мають надходити з їжею.

Для людини такими амінокислотами є аргінін, тирозин, гістидин.

- **замінні** амінокислоти синтезуються в організмі в достатній кількості з незамінних амінокислот та інших сполук. До них належить решта амінокислот.

Наведена біологічна класифікація амінокислот не є універсальною на відміну від попередніх і певною мірою є умовною, тому що залежить від виду організму. Однак абсолютна незамінність восьми амінокислот є універсальною для усіх видів організмів.

1.2.3. Будова і рівні організації білків.

Первинна структура білка. Первинна структура білка являє собою лінійний ланцюг залишків α -амінокислот, які розташовані у певній послідовності в поліпептидному ланцюзі і з'єднані між собою пептидними зв'язками. Таким чином, під первинною структурою білка розуміють кількість, склад і порядок розташування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюзі.

Вторинна структура білка. Вторинна структура являє собою впорядковану просторову конформацію поліпептидного ланцюга. Вона утворюється за рахунок водневих зв'язків між пептидними групами в одному поліпептидному ланцюзі або між сусідніми поліпептидними ланцюгами. При цьому конформація може набувати вигляду спіральних і шаруватоскладчастих структур.

Третинна структура білків. Третинна структура білків являє собою спосіб укладання поліпептидного ланцюга з елементами вторинної структури (α -спіралі і β -структури) у просторі, який досягається за рахунок взаємодії між радикалами залишків амінокислот. Третинна структура білка визначає форму

Розділ 1

білкової молекули, утворюючи або глобулу (глобулярні білки) або достатньо витягнуті волокна (фібрилярні білки).

Четвертинна структура білків. Білки, побудовані з одного поліпептидного ланцюга, мають тільки третинну структуру. Але багато білків складаються із декількох ідентичних або неідентичних поліпептидних ланцюгів, кожен з яких має свою третинну конформацію. Об'єднуючись, вони утворюють єдиний функціональний комплекс із вищим рівнем організації – четвертинну структуру білка.

Білки, які мають четвертинну структуру, називають **олігомерними**. Кожний окремих поліпептидний ланцюг у складі олігомерного білка зветься **протомером**, або **субодиноцею**. Деякі автори терміном «субодиноця» називають лише ту частину молекули, якій властива функціональна активність. Вона може бути представлена як одним протомером, так і декількома. Наприклад, у білка з чотирьох однакових субодиноць (a_4) протомером є мономер a , а білок із двох типів субодиноць (a_4b_4) має 2 протомери складу av .

Класичним прикладом білків із четвертинною структурою є гемоглобін, молекула якого побудована з 4 субодиноць: двох α - і двох β -поліпептидних ланцюгів. Ці ланцюги утворюють надзвичайно впорядковану і компактну структуру. Гемоглобін має 4 гемогрупи, і являє собою унікальний зразок взаємовідношень між молекулярною структурою і функцією білка. Головна функція гемоглобіну полягає в перенесенні кисню з легенів у тканини.

1.2.4. Класифікація білків. Характеризуючи білкові речовини за ступенем складності, серед них виділяють дві великі групи: **прості і складні білки**. До простих білків, або протеїнів, відносяться білки, котрі дають при гідролізі лише амінокислоти. Складні білки складаються із простого білка і додаткової групи небілкової природи. Складні білки поділяються на групи в залежності від будови небілкової частини –

Клітинна і молекулярна біологія

простетичної групи. За формою молекул білки ділять на **глобулярні** і **фібрилярні**. Існує також класифікація білків за їх розчинністю.

Прості білки розділяють на такі класи: **альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, проламіни, глютеліни, протеїноїди**.

Альбуміни. Це водорозчинні білки, які осаджуються при насиченні розчинів нейтральними солями, наприклад $(NH_4)_2SO_4$. Альбуміни широко розповсюджені в природі. Вони складають біля 50% усіх білків плазми людини. Молекулярна маса альбумінів 35000–70000. Молекули їх мають еліпсоїдну форму, яка є компактнішою і симетричнішою, ніж у глобулінів. Для хімічного складу характерним є вміст лейцину (15%), значної кількості сірковмісних амінокислот, лізину, аспарагінової і глутамінової кислот, а також незначний вміст гліцину.

Глобуліни. Глобуліни, як і альбуміни, дуже поширені у складі тваринних і рослинних тканин. На відміну від альбумінів, глобуліни не розчиняються в концентрованих розчинах нейтральних солей. Із тканин їх виділяють за допомогою екстрагування 10% розчином солей. При підвищенні концентрації солей розчинність глобулінів зменшується, а в 50% розчині вони випадають в осад.

Молекулярна маса глобулінів – 0,9-1,5 млн. Вони більш грубодисперсні і менш гідрофільні, ніж альбуміни. За хімічним складом глобуліни дещо відрізняються від альбумінів і містять більше гліцину (~5%) і меншу кількість сірковмісних амінокислот.

Гістони. Це лужні білки з молекулярною масою 12000–30000, які містять 20–30% лужних амінокислот. Вони розчиняються у слабких кислотах, осаджуються спиртом, не містять триптофану і, у більшості випадків, цистеїну і цистину. Основна маса гістонів входить до складу хромосом ядер клітин і відіграє важливу роль у стабілізації ДНК.

Протаміни. Це сильно лужні білки з низькою молекулярною масою (до 12000), завдяки чому деякі з них проходять через

Розділ 1

целофан при діалізі. Протаміни розчиняються в слабких кислотах, не осаджуються при кип'ятінні; у їх молекулі вміст діаміномонокарбонових кислот становить близько 80%, особливо багато аргініну. У протамінах не зустрічаються цистеїн, триптофан, аспарагін, найчастіше відсутні тирозин, фенілаланін, тому вони не дають багатьох кольорових реакцій на білок. Протаміни широко розповсюджені в природі. Вони містяться в статевих клітинах тварин і людини і складають основну масу білків хроматину.

Проламіни. Ця група білків дуже поширена в рослинних організмах, добре розчиняється в 60–80% етиловому спирті, до їх складу входить багато проліну, а також глютамінової кислоти. У дуже незначній кількості до складу цих білків входять лізин, аргінін, гліцин.

Глютеліни. Як і проламіни, – це білки рослинного походження, добре розчинні в лужних розчинах (0,2–2% NaOH). До їх складу входить велика кількість глютамінової кислоти і лізину.

Протеїноїди. Це важкорозчинні білки, котрі не розчиняються у воді, розчинах солей та в розчинах кислот і лугів; для їх складу характерною є висока частка сірковмісних амінокислот. До протеїноїдів належать фібрилярні білки: кератини, колагени, фіброїни шовку та ін. Вони відрізняються високою стійкістю й еластичністю. Протеїноїди слабо розщеплюються ферментами кишкового тракту, тому погано засвоюються і сприяють процесам гниття в кишечнику.

Складні білки (колишня назва – протеїди) складаються із двох компонентів – простого білка і небілкової речовини. Останню називають простетичною групою (від грецьк. prostheto – приєдную, додаю). Білкові й небілкові компоненти складних білків зв'язані між собою ковалентними та нековалентними зв'язками. В організмі складні білки виділяються і функціонують як єдине ціле.

Клітинна і молекулярна біологія

У залежності від хімічної природи простетичної групи складних білків вони поділяються на: **хромопротейни** (містять як простетичну групу забарвлений небілковий компонент), **глікопротейни** (містять вуглеводи та їхні похідні), **ліпопротейни** (містять ліпіди), **фосфопротейни** (містять фосфорну кислоту), **нуклеопротейни** (до їхнього складу входять нуклеїнові кислоти), **металопротейни** (містять різноманітні атоми металів).

Практичний блок

Кількісне визначення білка хімічними методами.

Хімічні методи кількісного визначення білків різноманітні. Найбільш простий з них – кількісне визначення загального або білкового (після осадження білка і відділення його від розчинних азотвмісних речовин) азоту. Найпоширенішим методом кількісного визначення білків є колориметричний метод. Він заснований на вимірюванні інтенсивності кольорових реакцій, що розвиваються при взаємодії білків з тим або іншим специфічним реагентом.

Біуретова реакція

Біуретова реакція заснована на здатності розчинів білка давати фіолетове забарвлення при взаємодії з розчином сульфату міді в лужному середовищі. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації білка в розчині.

Досліджуваний розчин: стандартний розчин білка, що містить 10 мг в 1 мл.

Реактиви: біуретовий реактив - 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ і 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислий натрій-калій, або сегнетова сіль) – розчиняють в 50 мл H_2O , при енергійному перемішуванні доливають 30 мл 10-відсоткового розчину NaOH, вільного від Na_2CO_3 ; додають 0,1 г KI і доводять водою до 100 мл. Зберігають в поліетиленовій склянці.

Обладнання: пробірки, піпетки, ФЕК, кювети з довжиною світлового шляху 5 мм.

Розділ 1

Хід роботи

В 4 сухі пробірки вносять по 0,5 мл розчину білка. В три пробірки поміщають стандартні розчини з вмістом білка 2,5; 5,0; 7,5 мг в 1 мл. Ці пробірки служать для побудови калібрувальної кривої. В 4-у пробірку наливають розчин білка з невідомою концентрацією, яку необхідно визначити.

У кожену пробірку додають по 2 мл біуретового реактиву. Вміст пробірок добре перемішують і залишають при кімнатній температурі на 20 хв (для розвитку забарвлення). Забарвлені розчини колориметрують на ФЕК в кюветах з довжиною оптичного шляху 5 мм, користуючись зеленим світлофільтром (довжина хвилі 540 нм). В якості контрольного розчину при вимірюванні на ФЕК використовують біуретовий реактив.

Мікробіуретовий метод

Досліджуваний матеріал: стандартний розчин білка, що містить 1 мг в 1 мл.

Реактиви: біуретовий реактив для мікрОВизначення (реактив Бенедикта) – 17,3 г цитрату натрію і 10 г Na_2CO_3 – розчиняють при підігріванні в невеликій кількості води, в розчин додають 1,73 г сульфату міді, розчиненого в 10 мл води, і доводять водою до 100 мл; 6-процентний розчин NaOH .

Обладнання: пробірки, піпетки, спектрофотометр, кювети.

Хід роботи

До 2 мл розчину, що містить 0,1-2,0 мг білка, додають 2 мл 6-процентного розчину NaOH і 0,2 мл розчину Бенедикта. Розчин добре перемішують і через 15 хв. фотометрують при 530 нм на спектрофотометрі. Попередньо за стандартним розчином білка будують графік.

Метод Бредфорда

Метод заснований на зв'язуванні з білками одного з кислих барвників Кумассі синього.

Досліджуваний матеріал: стандартний розчин білка, що містить 0,05 мг/мл.

Реактиви: розчин барвника - 10 мг Кумассі G-250 – гомогенізують в скляному гомогенізаторі в 5 мл 95-процентного спирту,

Клітинна і молекулярна біологія

отриманий розчин змішують з 10 мл 95-відсоткової фосфорної кислоти, розводять до кінцевого об'єму (100 мл). Відфільтрований розчин барвника зберігається близько 2-х тижнів.

Обладнання: пробірки, піпетки, спектрофотометр, кювети.

Хід роботи

1,5 мл розчину, що містить від 10 до 50 мкг білка, змішують з 1,5 мл розчину барвника. Через 3-5 хв вимірюють оптичну щільність при 595 нм, в якості контролю використовуючи пробу, яка містить білок. В описаній модифікації A_{595} лінійно залежить від кількості білка в інтервалі від 10 до 50 мкг.

Кількісне визначення білка методом Лоурі та осадженням трихлороцтовою кислотою (ТХО)**Метод Лоурі**

Метод Лоурі заснований на утворенні забарвлених продуктів реакції ароматичних амінокислот з реактивом Фолина в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки. У лужному середовищі при взаємодії сульфату міді II з пептидними групами білка CO-NH- утворюються комплексні сполуки фіолетового забарвлення, іони Cu^{2+} при цьому переходять в Cu^{+} .

Матеріали та обладнання: спектрофотометр, кювети, ретельно вимиті і просушені, розчин БСА (10 мг / мл), розчин досліджуваного білка, реагенти.

Розчини:

- Реагенти А і В для методу Лоурі: розчин А – 2% Na_2CO_3 ; розчин В – 5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% цитрату Na .

- 50% трихлороцтової кислота (ТХО). Зберігати в темряві під тягою.

- Реактив Фолина. Приготування реактиву на 1 л: 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчинити в 700 мл води в круглдонной колбі на 1 л, забезпеченою прищліфованою

Розділ 1

зворотним холодильником Лібіха. Додати 50 мл 50% -ної H_3PO_4 і 100 мл HCl (конц.). Помістити в колбу кілька капілярів (центрів кипіння) і кип'ятити протягом 10 год. Потім додати 150 г Li_2SO_4 , 50 мл води і кілька крапель бромю. Від'єднавши зворотний холодильник кип'ятити вміст колби під тягою 15 хв для видалення надлишків бромю. Охолодити, довести водою до 1 л, перелити в склянку з темного скла.

Хід роботи

1. Довести об'єм зразка до 0,8 мл водою.
2. Додати 02 мл 50% ТХО (кінцева концентрація 10%), перемішати.
3. Почекаати 10 хв, центрифугувати 10 хв при 14000 об / хв.
4. Супернатант злити і додати до осаду 150 мкл 1М $NaOH$, 50 мкл 10% SDS, 0,75 мл розчину D (суміш А і В, 50: 1), 50 мкл реактиву Фоліна. Перемішати і чекати розвитку забарвлення 30 хв.
5. Виміряти А750 в 1 мл кюветі.
6. Розрахувати концентрацію білка за калібрувальною кривою.

Концентрування білків шляхом осадження ТХО

Метод осадження білків трихлороцтовою кислотою корисний, коли концентрація білка в колоїдному розчині занадто мала для аналізу або об'єм розчину занадто великий, щоб завдати потрібну кількість білка в лунку гелю при електрофорезі. Осад розчиняють в меншому об'ємі буфера, концентруючи, таким чином, розчин білка.

Матеріали та обладнання: ТХО, дезоксихолат натрію, розчин білка БСА, розчин досліджуваного білка, центрифуга.

Розчини:

- Трихлороцтова кислота (ТХО).
- 0,15% дезоксихолат натрію. Зберігати при кімнатній температурі.

Хід роботи

1. Якщо мінімальна концентрація білка близько 5 мкг / мл, то до розчину білка додати 1/10 об'єму 100% ТХО.

Клітинна і молекулярна біологія

2. Якщо мінімальна концентрація білка менше 1 мкг / мл, то до розчину білка додати 1/10 об'єму 0,15% дезоксихолату натрію (співосаджувач), витримати 10 хв при кімнатній температурі і додати 1/20 початкового об'єму 100% ТХО.

3. Інкубувати 30 хв на льоду або 15 хв при $-20^{\circ}C$.

4. Центрифугувати 5-10 хв при максимальній швидкості центрифуги.

5. Відібрати супернатант піпеткою. Білок - в осаді.

6. Далі можна розчинити осад в 50-100 мкл 0,1 н $NaOH$ і промити 1 мл суміші етанол-ефір 1:1. Для повного видалення залишків ТХО промивати потрібно ретельно, кілька разів поспіль.

7. Центрифугувати на максимальній швидкості мікроцентрифуги. Супернатант відкинути. Осад білка розчинити в буфері PBS.

Питання до самоконтролю:

1. На чому будується сучасна раціональна класифікація амінокислот?

- а) Полярності радикалів
- б) Незамінності для людини
- в) Кислотності-лужності
- г) Структурі будови радикалів

2. Які амінокислоти є незамінними для людського організму?

- а) Аргінін
- б) Тирозин
- в) Гістидин
- г) Метіонін

3. Функція білків, що полягає у прискоренні хімічних перетворень розпаду і синтезу речовин, це:

- а) рухова
- б) механічна
- в) каталітична
- г) рецепторна

Розділ 1

4. Функція вибіркового розпізнавання і приєднання окремих речовин білковими молекулами має назву:

- а) рецепторна
- б) захисна
- в) каталітична
- г) когенетична

5. Функція, завдяки якій білки можуть зв'язувати різні токсичні сполуки (важкі метали, алкалоїди, токсини та ін.) має назву:

- а) захисна
- б) знешкоджувальна
- в) рецепторна
- г) регуляторна

6. Скільки білків міститься в рослинному організмі у перерахунку на суху речовину?

- а) 2-3%
- б) 5%
- в) 10-15%
- г) 20-30%

7. До кислих амінокислот належать:

- а) лізин
- б) аргінін
- в) гістидин
- г) аспарагінова кислота

8. До лужних амінокислот належать:

- а) гістидин
- б) аспарагін
- в) глутамін
- г) триптофан

9. До нейтральних амінокислот належить:

- а) тирозін
- б) лізин
- в) аргінін
- г) гістидин

10. Протеїни - це:

- а) клас амінокислот
- б) рибосомні білки
- в) група ферментів
- г) назва простих білків

Клітинна і молекулярна біологія
Тема 1.3. Нуклеїнові кислоти. ДНК



1.3.1. Загальна характеристика будови нуклеїнових кислот. У 1868 р. швейцарський хімік *Ф. Мішер* уперше з ядер лейкоцитів людини виділив сполуки нового типу до того часу невідомі і дав їм назву нуклеїни (від лат. *nucleus* – ядро). Потім нуклеїни були одержані з ядерного матеріалу багатьох організмів. Пізніше *Ф. Мішер* встановив, що нуклеїн є складною сполукою, яка включає кислий компонент із вмістом близько 10% фосфору (він був названий нуклеїновою кислотою) та білковий компонент. Так були відкриті нуклеїнові кислоти та нова група складних білків – нуклеопротеїни.

До середини 80-х років XIX ст. нуклеїни були знайдені у складі хромосом, у зв'язку з чим сформувалося перше уявлення про їх важливу роль у передачі спадкових властивостей. Але ці уявлення не одержали подальшого розвитку, оскільки передачу генетичних властивостей зв'язували з молекулою білка. І тільки в 50-х роках XX ст. були одержані експериментальні докази дуже важливої ролі нуклеїнових кислот (ДНК) у явищах спадковості (*О.Евері, К.Мак-Леоду, М.Мак-Карті, Ф.Гриффітс, А.Херші, М.Чейз та ін.*). Так було доведено, що нуклеїнові кислоти містяться в усіх клітинах організмів і є матеріальними носіями генетичної інформації, тобто забезпечують збереження, передачу і відтворення спадкової інформації. За участю нуклеїнових кислот відбувається біосинтез білків, які є матеріальною основою всіх процесів життєдіяльності.

Нуклеїнові кислоти – це високомолекулярні органічні сполуки, які складаються з великої кількості залишків мононуклеотидів (нуклеотидів), з'єднаних 3',5'-фосфодиефірними зв'язками в полінуклеотидні ланцюги, і які виконують важливу роль у

Розділ 1

збереженні й передачі генетичної інформації, беруть участь у біосинтезі та регуляції біосинтезу специфічних білків живого організму. Нуклеїнова кислота – це гетерополімер, мономером якого представлені не однією певною речовиною, а трьохкомпонентним утворенням – нуклеотидом. Нуклеотиди складаються із гетероциклічної основи, сполученої з вуглеводним залишком, етерифікованим, у свою чергу, фосфорною кислотою.

За умови повного гідролізу нуклеїнової кислоти утворюються пуринові і піримідинові основи, моносахарид – пентоза (рибоза або дезоксирибоза) і фосфорна кислота. Усі нуклеїнові кислоти поділяються на два типи в залежності від того, яка пентоза входить до їх складу. Нуклеїнова кислота називається **рибонуклеїною (РНК)**, якщо до її складу входить рибоза, або **дезоксирибонуклеїною (ДНК)**, якщо до її складу входить дезоксирибоза (рис.1.4.1.).

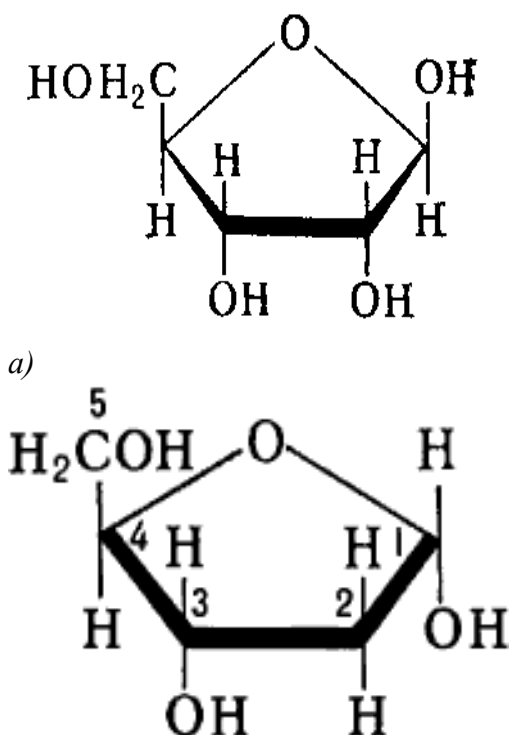


Рис. 1.3.1. Дезоксирибоза (а) та рибоза (б). (Біологічна хімія / Л. М. Вороніна та ін. Харків: "Основа", 2000. 608 с.)

Незначна відмінність – присутність водню замість гідроксильної групи біля С-2'-рибози є

Клітинна і молекулярна біологія

однією з основних ознак суттєвої різниці у будові та властивостях ДНК і РНК.

Азотисті основи. Азотисті основи, які входять до складу нуклеїнових кислот, є похідними гетероциклічних сполук – пурину і піримідину. Молекула пурину складається із двох конденсованих кілець: піримідину та імідазолу. Серед піримідинових основ головна роль належить цитозину (Ц), урацилу (У) і тиміну (Т; 5-метилурацил), а серед пуринових основ – аденіну (А) і гуаніну (Г).

До складу ДНК входять аденін, гуанін, цитозин, тимін; до складу РНК – аденін, гуанін, цитозин, а замість тиміну – урацил.

Азотисті основи, з'єднуючись із пентозами, утворюють сполуки, що одержали назву нуклеозидів. Пуринові основи через 9-й атом азоту, а піримідинові – через 1-й – утворюють N-глікозидний зв'язок із рибозою або 2'-дезоксирибозою.

У залежності від природи пентози нуклеозиди поділяються на рибонуклеозиди і дезоксирибонуклеозиди. Утворюється їх назва як і у всіх глікозидів, наприклад, β-гуанінрибофуранозид або гуанінрибозид. Проте частіше використовуються назви, які походять від тривіальної назви відповідної азотистої основи із закінченням *-идин (-идин)* у піримідинових і *-озин* – у пуринових нуклеозидів:

Аденін + Рибоза → Аденозин (А)
 Гуанін + Рибоза → Гуанозин (Г)
 Цитозин + Рибоза → Цитидин (Ц)
 Урацил + Рибоза → Уридин (У)
 Аденін + 2'-Дезоксирибоза →
 Дезоксиаденозин (дА)
 Гуанін + 2'-Дезоксирибоза →
 Дезоксигуанозин (дГ)
 Цитозин + 2'-Дезоксирибоза →
 Дезоксицитидин (дЦ)
 Тимін + 2'-Дезоксирибоза →
 Дезокситимідин (дТ).

Нуклеотиди – це фосфати нуклеозидів. Найчастіше в нуклеозидах етерифікується гідроксильна група біля С-5' або біля С-3' пентозного залишку. У залежності від будови

Розділ 1

пентози розрізняють рибонуклеотиди і дезоксирибонуклеотиди. Нуклеотиди, з одного боку, є складними ефірами нуклеозидів (фосфати), з іншого – кислотами, завдяки наявності в їх складі залишку фосфорної кислоти.

Будова полінуклеотидного ланцюга.

Нуклеотиди є мономерними одиницями олігонуклеотидів і полінуклеотидів. Олігонуклеотиди містять у своєму складі декілька мономерів, а полінуклеотиди – багато. Нуклеїнові кислоти являють собою полінуклеотиди, побудовані з мономерів – нуклеотидів, кількість яких варіюється від 7 десятків до сотень мільйонів (продукт поліконденсації). Роль містка між нуклеотидами виконує 3',5'-фосфодіефірний зв'язок, з'єднуючий С-3'-D-рибози (або 3'-дезоксирибози) одного нуклеотиду з С-5' другого (рис.19, 20). У зв'язку з цим полінуклеотидний ланцюг має певний напрямок: на одному його кінці (початок ланцюга) залишається вільною 5'-ОН, на іншому – 3'-ОН група (кінець ланцюга). Тому кінці лінійного (нерозгалуженого) полінуклеотидного ланцюга позначають: 5'-кінець (ліворуч) і 3'-кінець (праворуч), оскільки написання ланцюга починають з 5'-кінця. У цьому випадку загальний напрямок утворення фосфодіефірних зв'язків у ланцюгу позначається 5'→3'. На 5'-кінці знаходиться фосфатна група у складі першого нуклеотиду, тому такий кінець позначають літерою «Р» (фосфор) або «Ф». На іншому кінці в пентозному залишку зберігається вільна гідроксильна група в С-3', і тому цей кінець ланцюга ще позначають як 3'-ОН-кінець.

1.3.2. Структура ДНК. Структура нуклеїнових кислот краще вивчена в найпростіших живих організмів – прокариотів (бактерії, рикетсії, мікоплазми, синьо-зелені водорості). У клітинах прокариотів міститься одна хромосома, яка складається з однієї молекули ДНК, не відокремленої від цитоплазми

Клітинна і молекулярна біологія

мембраною (немає оформленого ядра). У клітинах еукаріотів (тварини, рослини, гриби, більша частина різновидів водоростей) знаходиться ядро, оточене мембраною. Ядерний матеріал розподіляється між кількома хромосомами, основу яких складають ДНК, білки (головним чином – гістони) і невелика кількість РНК.

ДНК, як і білки, мають первинну, вторинну і третинну структури.

Первинна структура ДНК – кількість, якість і порядок розташування залишків дезоксирибонуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі. Великих успіхів у вивченні структури ДНК досягли *Е. Чаргафф* і співробітники його лабораторії (Англія), які, використовуючи метод хроматографії, вперше в 1950 р. визначили нуклеотидний склад ДНК, виділеної з різних організмів. Вони встановили, що співвідношення азотистих основ у ДНК підпорядковується універсальним закономірностям, які одержали назву **правил Чаргаффа**:

1. Сума пуринових (Пур) нуклеотидів дорівнює сумі піримідинових (Пір) нуклеотидів ($\Sigma \text{Пур} = \Sigma \text{Пір}$, або $\text{Пур}/\text{Пір} = 1$).

2. Молярний вміст гуаніну дорівнює молярному вмісту цитозину ($\Gamma = \text{Ц}$, або $\Gamma/\text{Ц} = 1$).

3. Молярний вміст аденіну дорівнює молярному вмісту тиміну ($\text{А} = \text{Т}$, або $\text{А}/\text{Т} = 1$).

4. Кількість аденіну і цитозину дорівнює кількості гуаніну і тиміну.

5. У ДНК, виділених з різних джерел (співвідношення нуклеотидів неоднакове): в одних організмів переважає вміст аденіну над гуаніном, тиміну над цитозином, а в інших – навпаки. У зв'язку з цим *Е. Чаргафф* запропонував положення про видову специфічність ДНК залежно від нуклеотидного складу. Це положення було всебічно досліджене в лабораторії російського вченого *А.М. Білозерського*. Його школою було створене унікальне, найповніше у світовій науковій літературі зведення нуклеотидного

Розділ 1

складу ДНК майже для всіх таксономічних груп організмів.

Вторинна структура ДНК – це просторова організація полінуклеотидних ланцюгів в її молекулі. З'ясування вторинної структури ДНК – одне з найважливіших досягнень у біології, оскільки при цьому одночасно було відкрито механізм передачі спадкової інформації в ряді поколінь. У 1953 р. Дж. Уотсон і Ф.Крік, узагальнюючи роботи багатьох учених (М. Уілкінс, Ф. Фраклін, Е. Чаргаф, А. Тодд, Р. Гослінг, Л. Полінг та ін.), описали вторинну структуру ДНК, зобразивши її у вигляді подвійної спіралі. Згідно з моделлю Дж. Уотсона та Ф. Кріка, молекула ДНК складається із двох полінуклеотидних ланцюгів, правозакручених навколо спільної осі з утворенням подвійної спіралі, що має діаметр 1,8–2,0 нм з періодом ідентичності (кроком) 3,4 нм та відстанню між площинами основ 0,34 нм. Ці два полінуклеотидних ланцюги обвивають один одного, утворюючи праву спіраль, де вуглеводно-фосфатні групи розташовуються ззовні, а нуклеотидні основи – всередині. На кожен виток спіралі припадає 10 пар основ. Азотисті основи двох ланцюгів вибірково з'єднуються між собою водневими зв'язками, утворюючи специфічні пари: А-Т, Г-Ц. Аденін та тимін з'єднуються двома водневими зв'язками, а гуанін та цитозин – трьома:

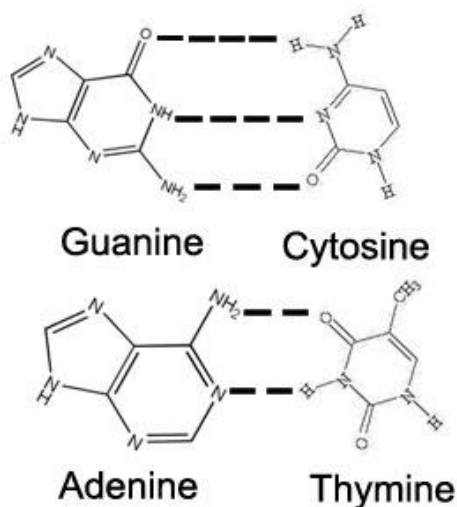


Рис. 1.3.2. Азотисті основи. Margaret Scofield, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007.

Клітинна і молекулярна біологія

Такі азотисті основи називаються комплементарними. Специфічне спарювання азотистих основ зумовлює *комплементарність*, тобто доповнюваність і взаємозалежність ланцюгів ДНК один від одного. Міжплощинні вертикальні взаємодії визначаються ван-дер-ваальсовими силами. Ланцюги ДНК спрямовані протилежно одне одному: в одному ланцюзі напрямом 5'→3', в другому – 3'→5'.

Конфігурація подвійної спіралі ДНК сильно змінюється в залежності від кількісного вмісту води та іонної сили навколишнього середовища. Методами рентгеноструктурного аналізу доведено існування не менше чотирьох форм ДНК, які одержали назву А-, В-, С- і Т-форм.

Подвійна спіраль характерна для більшості молекул ДНК. Однак ДНК може мати й інші форми. Так, деякі віруси містять одноланцюгову ДНК; зустрічаються також кільцеві форми ДНК (плазмід).

Третинна структура ДНК. Дослідження будови ДНК показало, що лінійні двоспіральні або кільцеві форми ДНК у просторі утворюють спіралізовані і суперспіралізовані форми, тобто утворюють третинні структури. У частинках вірусів, клітинах бактерій, як і в ядрах вищих організмів, ДНК щільно “упакована” і утворює складні структури.

ДНК еукаріотів майже вся знаходиться в хромосомах ядер, лише невелика її кількість міститься в мітохондріях, а в рослин – ще й у пластидах. Сумарний матеріал хромосом – хроматин – містить ДНК, гістонові і негістонові білки, невелику кількість РНК та іонів металів.

Цитоплазматична ДНК. У цитоплазмі еукаріотів міститься невелика кількість ДНК (менш ніж 1% усієї ДНК клітини). Вона одержала назву цитоплазматичної і відрізняється від ядерної ДНК нуклеотидним складом і молекулярною масою. Генетична інформація, що міститься в ній, обумовлює цитоплазматичну спадковість. Цитоплазматичні гени знаходяться в мітохондріях і хлоропластах.

Розділ 1

Бактеріальні плазміди. У цитоплазмі багатьох бактерій окрім хромосомної ДНК містяться додаткові маленькі кільцеві молекули ДНК, присутність котрих необов'язкова для життя клітини. Вони одержали назву плазмід. Плазміди здатні автономно розмножуватися, стабільно успадковуються. Деякі плазміди можуть включатися в хромосому бактерій; вони називаються епісомами.

Мігруючі елементи ДНК. Останнім часом накопичилися дані про існування «стрибаючих генів», тобто таких ділянок ДНК, які можуть переміщуватися з одних частин генома в інші. Ці мігруючі елементи ДНК беруть участь у регуляції дії генів та індукції хромосомних перебудов. Вони сприяють здійсненню незвичайних рекомбінаційних перебудов. Є два типи мігруючих елементів прокаріотів: IS-елементи і транспозони. IS-елементи, інсерційні сегменти (від англ. insertion sequences) або вставні послідовності містять лише ті гени, що необхідні для вбудовування в ДНК. Їх розмір у більшості випадків від 800 до 1400 нуклеотидних пар. IS-елементи впливають як позитивно, так і негативно на експресію (роботу) сусідніх генів, тобто на їх функціонування.

Транспозони – це більш складні мігруючі елементи, до складу яких входить 3000–25000 нуклеотидних пар. Вони подібні до IS-елементів, але крім генів, відповідальних за здатність до переміщення, містять також додаткові гени, наприклад, гени стійкості до лікарських препаратів.

1.3.3. Властивості нуклеїнових кислот.

Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот визначаються високою молекулярною масою і рівнем структурної організації.

Нуклеїнові кислоти – це речовини білого кольору, волокнистої будови, слабкорозчинні у воді у вільному стані, але добре розчинні у воді у вигляді солей лужних металів. Вони також добре розчинні в сольових розчинах: РНК – у розбавлених, а ДНК – у більш концентрованих.

Клітинна і молекулярна біологія

Розчинність двоспіральних нуклеїнових кислот гірша, ніж односпіральних.

Молекулярна маса ДНК – від 0,5 млн до 20 млн і вище, а її молекула складається з багатьох тисяч нуклеотидів; молекулярна маса РНК – від 30 тис. до 2 млн, а нуклеотидів у молекулі – до 4–6 тис.

Завдяки негативному заряду молекули нуклеїнових кислот рухаються в електричному полі.

Під впливом денатуруючих факторів (температура 70°–100°С, вплив хімічних речовин, сильноокисле і лужне середовище тощо) відбувається розрив водневих і ван-дер-ваальсових зв'язків, що стабілізують вторинну і третинну структуру нуклеїнових кислот. Якщо розчин нуклеїнової кислоти, денатурований нагріванням, повільно охолоджувати, то полінуклеотидні ланцюги ДНК об'єднуються за принципом комплементарності. При цьому утворюється нативна подвійна спіраль ДНК. Це явище називається ренатурацією. При швидкому охолодженні ренатурація не відбувається.

1.3.4. Біологічна роль нуклеїнових кислот.

Нуклеїнові кислоти виконують в організмі різні функції. Найважливіші з них – це участь у передачі спадкових ознак і в процесі біосинтезу білка та його регуляції. Основним носієм генетичної інформації для більшості організмів є ДНК. Виняток становлять тільки окремі фаги, віруси, у яких носієм спадкової інформації служить молекула РНК. Комплементарність ланцюгів ДНК складає хімічну основу найважливішої функції ДНК – зберігання і передачу спадкових (генетичних) ознак. При поділі клітин подвійна спіраль ДНК розкручується і розділяється на два ланцюги. На кожному окремому ланцюзі, як на матриці, відбувається біосинтез нового ланцюга ДНК із врахуванням принципу комплементарності. Новоутворений ланцюг не ідентичний, а комплементарно подібний до матриці. Внаслідок цього утворюються дві нові подвійні

Таблиця 1.3.1. *Генетичний код*

Перша основа	Друга основа				Третя основа
	У	Ц	А	Г	
У	ФЕН	СЕР	ТИР	ЦИС	У
	ФЕН	СЕР	ТИР	ЦИС	Ц
	ЛЕЙ	СЕР	Стоп-кодон	Стоп-кодон	А
	ЛЕЙ	СЕР	Стоп-кодон	ТРИ	Г
	ЛЕЙ	ПРО	ГІС	АРГ	У
	ЛЕЙ	ПРО	ГІС	АРГ	Ц
	ЛЕЙ	ПРО	ГЛН	АРГ	А
	ЛЕЙ	ПРО	ГЛН	АРГ	Г
А	ІЛЕ	ТРЕ	АСН	СЕР	У
	ІЛЕ	ТРЕ	АСН	СЕР	Ц
	ІЛЕ	ТРЕ	ЛІЗ	АРГ	А
	МЕТ	ТРЕ	ЛІЗ	АРГ	Г
Г	ВАЛ	АЛА	АСП	ГЛІ	У
	ВАЛ	АЛА	АСП	ГЛІ	Ц
	ВАЛ	АЛА	ГЛУ	ГЛІ	А
	ВАЛ	АЛА	ГЛУ	ГЛІ	Г

Розділ 1 спіралі, кожна з яких включає один старий (материнський) і один новосинтезований ланцюги. *Такий процес точного копіювання молекули ДНК, у результаті якого утворюються дві однакові двоспіральні молекули, називається реплікацією.* Реплікація лежить в основі забезпечення дочірніх клітин молекулами ДНК, повністю ідентичними з ДНК материнських клітин.

Таким чином спадкові ознаки зберігаються в поколіннях.

Генетична інформація, тобто інформація про синтез певних білків, записана (закодована) в нуклеотидній послідовності ДНК. Одну амінокислоту кодує тринуклеотидна послідовність, тому код називається триплетним. Три нуклеотиди, що контролюють включення даної амінокислоти у відповідний білок у процесі його біосинтезу, називають *кодonom*. Збереження нуклеотидної послідовності і точність її транскрипції є запорукою безпомилкової передачі спадкової інформації.

Послідовності всіх 64 кодонів (у напрямку від 5'- до 3'-кінця у складі мРНК). Серед 64 кодонів три є сигналами зупинки синтезу білка (стоп-кодони, або нонсенс-кодони), решта – 61 змістовний кодон відповідають двадцяти амінокислотам. Співвідношення між кодонами та амінокислотами є однозначним: певний триплет кодує одну і тільки одну певну амінокислоту. Зворотне співвідношення не є однозначним: більшість амінокислот кодуються кількома триплетами – код є виродженим. Дві амінокислоти – Трп і Met – невироджені й кодуються лише одним кодомом кожна. Усі інші 18 амінокислот кодуються серіями кодонів-синонімів – від двох до шести кодонів на серію (табл. 1.3.1).

Властивості генетичного коду:

- **Триплетність** – три послідовно розміщені нуклеотиди кодують одну з 20 амінокислот, які разом утворюють триплет, або кодон.
- **Безперервність** – кодони не розділяються між собою, тобто інформація зчитується безперервно.

Розділ 1

Кожний з кодонів не залежить один від одного і під час біосинтезу зчитується повністю.

- **Дискретність** – один і той же нуклеотид не може входити одночасно до складу двох або більш кодонів.
- **Специфічність** – кожний кодон може кодувати лише одну амінокислоту. Завдяки цьому генетичний код не перекривається.
- **Виродженість** – одна і та ж амінокислота може кодуватися декількома різними кодонами.
- **Колінеарність** – послідовність кодонів нуклеотидів точно відповідає послідовності амінокислотних залишків у поліпептиді
- **Наявність термінальних кодонів** – беззмистовних, або стоп-кодонів, які не здатні кодувати амінокислоти. Вони виконують функцію роздільника між двома ланцюгами кодонів та переривають синтез поліпептиду.
- **Універсальність** – єдиний генетичний код є, практично, однаковим в організмах різного рівня складності – від вірусів до людини.

Практичний блок

Виділення ДНК з клітини еукаріот

Мета роботи. Освоїти високосольовий метод виділення ДНК з рослинних об'єктів.

Принцип методу. Основний принцип сольовий екстракції – осадження білків і ліпідів на кристалах ДДС - Na (додецилсульфата натрію), що випадають в умовах високої іонної сили.

Матеріали та обладнання:

1. Мікротермостат для мікропробірок до 65 °С.
3. Мікроцентрифуга-вортекс для мікропробірок до 10000 g.
4. Ваги лабораторні на 0,01 - 10 м

Клітинна і молекулярна біологія

5. Скляні палички для гомогенізації.
 6. Автоматичні дозатори змінного обсягу з наконечниками.
 7. Мікропробірки місткістю 1.5 мл (типу Еппендорф).
 8. Рукавички латексні непудрені.
 9. Зразок свіжої тваринної або рослинної тканини для виділення ДНК і РНК.
 10. 96% -ний етанол **.
 11. Вода дистильована.
 12. Зразок тваринних тканин масою 100 мг.
 13. Лізуючий буфер (містить 0,4 М NaCl, 10 мМ трис-НСl, рН 8, 2 мМ ЕДТА-Na рН 8).
 14. 6 М розчин NaCl *.
 15. 20% -ний розчин ДДС-Na.
 16. Деіонізована вода.
 17. Розчин протеїнази К (20 мг / мл, готувати на стерильній деіонізованій воді) **.
- * - зберігати при температурі 2 - 8 °С
 ** - зберігати при температурі -18 °С

Хід роботи.

1. Наважку рослинної тканини (50-100 мг) поміщають в пробірку Еппендорф і додають 400 мкл готового лізуючого буфера. Ретельно гомогенізують біологічний матеріал в лізуючому буфері протягом 20 сек., використовуючи скляну паличку.
2. До отриманого гомогенату додають 40 мкл 20% розчину ДДС - Na і 8 мкл розчину протеїнази К.
3. Вміст пробірки перемішують на вортексі протягом 15 сек.
4. Пробірку інкубують в мікротермостаті при 65 °С протягом 30 хв. періодично перемішуючи вміст.
5. Після закінчення інкубації в пробірку додають 300 мкл 6М NaCl.
6. Вміст пробірки перемішують на вортексі протягом 15 сек., потім пробірку центрифугують 20 хв при 15000 об / хв.
7. Отриманий супернатант переносять в чисту пробірку і додають рівну кількість холодного етилового спирту (-18°).

Розділ 1

8. Пробірку поміщають в морозильну камеру (-18 °) на 15 хв.

6. Після інкубації вміст пробірки центрифугують 20 хв. при 10000 об / хв.

9. Супернатант повністю видаляють. Осад висушують у відкритих пробірках при 65 °С протягом 5-7 хв.

10. До висушеному осадку додають 500 мкл деіонізованої води і залишають розчинятися протягом доби при температурі - 70 °С.

Питання до самоконтролю:

1. Мономери нуклеїнових кислот це:

- 1) гени
- 2) гістони
- 3) нуклеотиди
- 4) нуклеозиди

2. Яка з азотистих основ не входить до складу ДНК?

- 1) аденін
- 2) гуанін
- 3) урацил
- 4) цитозін

3. Які з азотистих основ належать до пуринових?

- 1) урацил
- 2) гуанін
- 3) тимін
- 4) цитозін

4. Властивість нуклеотидів утворювати парні водневі зв'язки у дволанцюгові молекулі ДНК:

- 1) реплікація
- 2) комплементарність
- 3) колінеарність
- 4) дискретність

5. Виродженість генетичного коду це:

- 1) один і той же нуклеотид не може входити одночасно до складу двох або більш кодонів
- 2) одна і та ж амінокислота може кодуватися декількома різними кодонами

Клітинна і молекулярна біологія

3) єдиний генетичний код є, практично, однаковим в організмах різного рівня складності - від вірусів до людини

4) три послідовно розміщені нуклеотиди кодують одну з 20 амінокислот, які разом утворюють триплет, або кодон

6. Яка азотиста основа комплементарна гуаніну?

- 1) тимін
- 2) цитозін
- 3) аденін
- 4) урацил

7. Яка азотиста основа в молекулі ДНК комплементарна аденіну?

- 1) гуанін
- 2) цитозін
- 3) тимін
- 4) урацил

8. Що таке колінеарність генетичного коду?

- 1) одна і та ж амінокислота може кодуватися декількома різними кодонами
- 2) один і той же нуклеотид не може входити одночасно до складу двох або більш кодонів
- 3) кодони не розділяються між собою, тобто інформація зчитується безперервно
- 4) послідовність кодонів нуклеотидів точно відповідає послідовності амінокислотних залишків у поліпептиді

9. Як називається система співвідношень між елементами послідовності нуклеотидів і амінокислотними послідовностями білків?

- 1) геном
- 2) каріотип
- 3) поліген
- 4) генетичний код

10. Скількима водневими зв'язками з'єднуються аденін та тимін?

- 1) 1
- 2) 2
- 3) 3
- 4) 4

Тема 1.4. Нуклеїнові кислоти. РНК



1.4.1. Структура РНК. Рибонуклеїнові кислоти – полірибонуклеотиди, що в клітинах еукаріотів та прокаріотів за характером своєї структури та біологічних функцій поділяються на основні класи: інформаційні (матричні) РНК (мРНК), транспортні РНК (тРНК), рибосомні РНК (рРНК). У клітинах РНК-вмісних вірусів полірибонуклеотиди виконують генетичну функцію зберігання та переносу спадкової інформації. Їх структура подібна до такої в ДНК.

Первинна структура РНК – кількість, якість і послідовність розташування залишків рибонуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі. Дослідження первинної структури різних видів РНК свідчать про те, що для них характерна в основному така ж закономірність у співвідношенні нуклеотидів, як і для ДНК. При цьому необхідно мати на увазі, що молекула РНК відрізняється від молекули ДНК: замість тиміну в ДНК у РНК присутній урацил: дезоксирибоза замінена на рибозу; молекула РНК на відміну від ДНК складається (окрім незначної кількості винятків) із одного полінуклеотидного ланцюга; сума пуринових основ у РНК не відповідає сумі піримідинових; молекула РНК менша за молекулу ДНК; але кількість РНК у клітині більша, аніж ДНК; РНК представлена декількома різновидами молекул, які синтезуються на матриці ДНК.

Вторинна структура – це частково спіралізований одинарний полінуклеотидний ланцюг РНК (форма і ступінь спіралізації полінуклеотидного ланцюга РНК у просторі). Полінуклеотидному ланцюгу РНК властива своєрідна спіралізація: ланцюг закручується сам на себе, утворюючи короткі двоспіральні «шпильки», «петлі», у яких між азотистими основами виникають водневі зв'язки,

утворюючи комплементарні пари аденіну з урацилом (А-У), гуаніну з цитозином (Г-Ц).

Третинна структура РНК

характеризується більшою укомплектованістю в просторі і може мати вигляд одиночного ланцюга, компактного стрижня або клубка. Усі три структури можуть переходити одна в одну в залежності від умов навколишнього середовища – концентрації солей, рН, температури і т.ін.

Якщо ДНК міститься головним чином у ядрах клітин, то РНК переважно знаходиться в цитоплазмі, у рибосомах. Загальна роль РНК полягає в безпосередній участі в біосинтезі білка. РНК, що містяться в клітині, відрізняються складом, розміром, функцією і локалізацією.

У цитоплазмі містяться кілька РНК: транспортна РНК (тРНК), матрична, або інформаційна (мРНК, або іРНК), рибосомна (рРНК). Крім перелічених типів РНК, у ядрі клітини виявлена ще одна – так звана гетерогенна ядерна РНК (гяРНК). Вона синтезується в ядрі на ДНК і є попередником усіх типів РНК. Утворення різних типів РНК із попередників називають процесингом. Окрім клітинних РНК, існують вірусні РНК, що входять до складу більшості вірусів.

1.4.2. Характеристика основних видів РНК.

Транспортна РНК (тРНК). На її частку припадає 10–15% від усієї РНК клітини. Це найбільш низькомолекулярні молекули РНК. Вони містять у собі від 75 до 90 нуклеотидів, М.м. = 23000–30000 дальтон. Раніше їх називали розчинними і позначали sРНК (від англ. soluble – розчинний). Основна функція тРНК полягає в тому, що вони транспортують α-амінокислоти з цитоплазми до місця синтезу білка, тобто до рибосом, і розташовують їх у певному порядку в поліпептидному ланцюзі під час його біосинтезу. Таким чином, тРНК беруть участь у процесі трансляції, тобто служать своєрідним перекладачем – перекладають

Розділ 1

послідовність нуклеотидів у послідовність амінокислотних залишків білкової молекули.

Первинна структура тРНК відзначається великою кількістю мінорних нуклеотидів – наявністю метильованих, псевдоуридилових та дигідроуридилових залишків.

Вторинна структура молекул тРНК у двомірному просторі має конформацію «листка конюшини», що утворюється за рахунок специфічної взаємодії комплементарних азотистих основ упродовж полірибонуклеотидного ланцюга. Неспарені нуклеотидні послідовності формують специфічні для будови тРНК структурні елементи:

Акцепторну гілку (стебло) – 3'-кінець молекули, який містить термінальну послідовність нуклеотидів ЦЦА. Кінцевий аденозин через 3'-гідроксильну групу рибози акцептує амінокислоту в процесі трансляції.

Антикодону петлю — містить групу з трьох нуклеотидів (антикодон), комплементарних триплету нуклеотидів (кодону) в складі мРНК. Ця петля відповідає за взаємодію тРНК із певними нуклеотидами мРНК при утворенні в рибосомі транслюючого комплексу.

Дигідроуридилову петлю — складається з 8-12 нуклеотидів, містить у собі 1-4 дигідроуридилові залишки.

Псевдоуридилову петлю — ділянка тРНК, яка в усіх молекулах містить обов'язкову нуклеотидну послідовність — 5'-ТψС-3'. Вважають, що ця петля необхідна для взаємодії тРНК із рибосоною.

Додаткову гілку — структура, за кількістю нуклеотидних залишків в якій тРНК поділяються на два класи: тРНК класу I — містить 3-5 нуклеотидів; тРНК класу II — з додатковою гілкою, яка має довжину від 13 до 21 нуклеотиду.



Рис. 1.4.1. Молекула транспортної РНК (тРНК). Марченко М. М., Копильчук Г. П. Біохімія інформаційних макромолекул. Чернівці: Рута, 2003. 344 с.

Матрична РНК (мРНК). Оскільки мРНК переносить відкопійовану з ділянки ДНК інформацію про первинну структуру білка, нерідко її називають інформаційною РНК (іРНК). Матрична РНК становить близько 2–6% усієї клітинної РНК, її молекулярна маса варіюється від 300000 до 4000000 дальтон і складається з одного полінуклеотидного ланцюга, довжина якого залежить від поліпептидного ланцюга, який повинен синтезуватися на цій матриці.

Рибосомна РНК (рРНК). Рибосомна РНК є тією основою, на якій розташовуються білки, що утворюють рибосоми – найдрібніші внутрішньоклітинні структури, які містять близько 70% рРНК. Звідси і походить її назва. Рибосоми беруть активну участь у біосинтезі білка. Вони локалізовані головним чином у цитоплазмі, крім того, – в мітохондріях і хлоропластах. Вторинна структура рРНК представлена значною кількістю коротких двоспіральних ділянок, що мають вигляд “шпильок” або паличок. Крім зазначених класів РНК, в ядрах клітин ссавців містяться рибонуклеїнові кислоти різної молекулярної маси, так звані **гетерогенні ядерні РНК (гЯРНК)**. Їх молекулярна маса може перевищувати 107. ГЯРНК є продуктами транскрипції генів, що не зазнали посттранскрипційної модифікації – процесингу.

Розділ 1

1.4.3. Біосинтез білка. Живим організмам властива унікальна здатність до передачі генетичної інформації від покоління до покоління зі збереженням своїх спадкових властивостей. Матеріальним носієм відтворення спадкової інформації є нуклеїнова кислота, яка має для цього відповідну хімічну будову й біологічні властивості. У більшості організмів цю функцію виконує ДНК. Виняток становлять окремі віруси, в яких носієм інформації є РНК. За участю нуклеїнових кислот відбувається утворення всіх білків, які є матеріальною основою життєвих процесів. Кожний живий організм містить свої специфічні білки, якими він відрізняється від інших організмів. Інформація, що визначає особливості структури білків, закодована в ДНК і передається в ряді поколінь її молекулами. Варто відзначити три види переносу генетичної інформації, які наявні на різних рівнях організації живої матерії:

1. Реплікація (самоподвоєння, копіювання). Це перенесення генетичної інформації в межах одного класу нуклеїнових кислот: в основному від ДНК до ДНК або в деяких вірусів від РНК до РНК. Має місце тільки під час ділення клітини (на стадії S-фази мітотичного циклу) і розмноження вірусів і супроводжується реплікацією всієї молекули ДНК чи РНК. Молекула ДНК розплітається, і на її одиночних ланцюгах у результаті реплікації утворюються точні копії вихідної ДНК, тобто синтезовані ДНК схожі одна на одну і на вихідну материнську; отже спадкова інформація зберігається.

Таким чином, унаслідок реплікації з однієї молекули утворюються дві нові цілком однакові молекули ДНК: одна з них залишається в материнській клітині, а інша переходить у дочірню.

Можлива також реплікація окремих фрагментів ДНК, яка називається **ампліфікацією**.

2. Транскрипція (перетисування). Це перенесення генетичної інформації між різними класами нуклеїнових кислот: ДНК → РНК.

Клітинна і молекулярна біологія

Навідміну від реплікації відбувається копіювання не всієї молекули ДНК, а тільки її окремих фрагментів (цистронів). Під час транскрипції утворюються різні види РНК (мРНК, тРНК, рРНК), які беруть участь у біосинтезі білка. Цистрони ДНК містять інформацію про структуру всіх типів РНК і про структуру всіх білків даного виду організму.

Розрізняють транскрипцію пряму (від ДНК до РНК) і зворотну (від РНК до ДНК). При цьому утворюється гібридна об'єднана молекула РНК–ДНК. Потім фермент РНК-аза Н видаляє рибонуклеотидний ланцюг із гібридної молекули, а на ланцюзі ДНК комплементарно в присутності ферменту **ДНК-полімерази** здійснюється синтез другого ланцюга ДНК. Утворена ДНК (копія вірусної РНК) вбудовується в ДНК клітини-хазяїна і викликає пухлинну трансформацію клітини.

3. Трансляція (переклад) здійснюється між різними класами макромолекул – генетична інформація передається від мРНК до білка, тобто відбувається переклад інформації з «мови» нуклеотидної послідовності нуклеїнових кислот на «мову» амінокислотної послідовності білка. Трансляція може бути тільки прямою.

Напрямок переносу генетичної інформації від ДНК через РНК до білка називається **центральним постулатом (догмою) молекулярної генетики**. Згідно з ним не може бути перенесення інформації від білка до РНК, але можливе від РНК до ДНК.

Реплікація ДНК. Реплікація – це подвоєння ДНК. Кожна з новоутворених молекул містить один ланцюг вихідної ДНК (материнської) і один знов синтезований ланцюг (дочірній). Інакше кажучи, реплікація напівконсервативна – половина материнської молекули зберігається в дочірній молекулі.

Для реплікації ДНК необхідна наявність:

- 1) чотирьох видів дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатів;
- 2) матриці у вигляді дволанцюжкової ДНК;
- 3) затравки (праймера);

Розділ 1

4) ферментів і регуляторних факторів;

5) іонів металів (Mg^{2+} , Mn^{2+}).

Реплікація ДНК у хромосомах еукаріотів відбувається також напівконсервативним шляхом і складається із трьох основних стадій: ініціації, елонгації і термінації.

Репарація пошкодженої ДНК. Під впливом хімічних, фізичних та інших факторів зовнішнього середовища в молекулах ДНК можуть відбуватися різні пошкодження, пов'язані, головним чином, із порушенням процесів реплікації, розривом молекул ДНК і т.ін., що призводить до серйозних наслідків. Так, ультрафіолетове (УФ) опромінення у великих дозах чинить летальну, а в малих – антимітотичну і мутагенну дію. При цьому в молекулі ДНК виникає ряд змін, наприклад:

а) окислювальне дезамінування азотовмісних пуринових і піримідинових основ, що входять до складу ДНК. Так, цитозин перетворюється на урацил, аденін – на 6-гідроксипурин, гуанін – на 2,6-дигідроксипурин, що порушує процес комплементарності (урацил стає комплементарним аденіну, а утворені похідні аденіну й гуаніну – цитозину), що надалі призводить до порушення в структурі закодованого білка;

б) між двома поряд розміщеними залишками тимідилової кислоти в одному ланцюзі ДНК, або між її ланцюгами, внаслідок реакції фотодимеризації молекули тиміну утворюють димери – подвійні тимінові кільця з утворенням між ними 5,6-циклобутанового кільця. Між димерами виникають ковалентні зв'язки, які порушують стеричні умови, необхідні для реплікації ДНК, тобто виникають перешкоди при реплікації ДНК;

в) можлива поява ділянок локальної денатурації ДНК (розходження ланцюгів), які також перешкоджають реплікації.

Етапи біосинтезу білка

1. Активація амінокислот, сполучення їх із тРНК та перенос до рибосом. Цей процес йде в одну стадію, але для зручності й кращого тлумачення його розбивають на два етапи.

Клітинна і молекулярна біологія

а) Активування амінокислот – утворення аміноациладенілатів. Амінокислоти в цитоплазмі знаходяться в неактивному стані. Вони активуються за карбоксильною групою завдяки енергії АТФ, у присутності солей Mg^{2+} за допомогою спеціальних ферментів аміноацил-тРНК-синтеаз, що позначаються скорочено АРСази. Ці ферменти забезпечують обидва етапи процесу – активацію амінокислот і з'єднання їх із тРНК. Кожен фермент виявляє подвійну специфічність: до певної амінокислоти і до відповідної їй тРНК.

б) Перенесення аміноациладенілатів до місця синтезу білка – до рибосом. Активовані амінокислоти повинні переноситися до рибосом. Це перенесення здійснюється тРНК. Транспортні РНК – найбільш низькомолекулярні РНК, полінуклеотидний ланцюг їх складається в середньому з 75–90 нуклеотидів, $M.M.=23000-30000$, вони розчинні у воді, тому їх ще позначають S-РНК. На їх частку припадає 10–20% сумарної РНК клітин.

2. Процес трансляції на рибосомах.

Процес перекладу нуклеотидної послідовності мРНК на амінокислотну одержав назву трансляції. Трансляція складається із трьох етапів: ініціації (початок синтезу поліпептидного ланцюга), елонгації (його подовження) і термінації (завершення синтезу).

а) Ініціація трансляції

Ініціація – це одна з найважливіших і найскладніших стадій процесу трансляції. Для того, щоб біосинтез поліпептидного ланцюга почався в напрямку $\alpha NH_2 \rightarrow COOH$, αNH_2 -група першої амінокислоти метіоніну в прокаріотів захищається формільною ($-C=O$) групою Н.

Елонгація. На першому етапі елонгації відбувається надходження другої амінокислоти, наприклад, тРНК_{фен} до А-ділянки рибосоми і комплементарне її сполучення з кодоном мРНК (УУУ). У цьому процесі беруть участь фактори елонгації та ГТФ. На другому етапі елонгації утворюється пептидний зв'язок в А-ділянці, де знаходиться друга аміноацил-тРНК_{фен}. В А-ділянку з П-ділянки пересувається залишок N-

Розділ 1
формілметіоніну від тРНК_{фмет}, яка його переносить на аміногрупу фенілаланіл-тРНК_{фен}, і утворюється перший пептидний зв'язок. У цьому процесі бере участь фермент **пептидилтрансфераза**. При цьому утворюється дипептидил-тРНК_{фен} (N-формілметіоніл-фенілаланіл-тРНК_{фен}). Далі (третьій етап) відбувається процес **транслокації** – переміщення рибосоми на один кодон відносно мРНК і дипептидил-тРНК_{фен}. При трансляції бере участь позарибосомний білок – фактор елонгації – G, який називається **транслоказою**. Цикл елонгації повторюється багаторазово, тобто стільки, скільки амінокислот входить до складу поліпептидного ланцюга. Швидкість елонгації велика: синтез поліпептиду з 150–200 амінокислот триває близько 1–3 хв. Залишок першої амінокислоти N-формілметіонін, або формільна група, або пептид, що містить N-формілметіонін і знаходиться з N-кінця ланцюга, який подовжується, відщеплюються за участю специфічних ферментів ще під час елонгації (проте у деяких білків зберігаються).

в) Стадія термінації. Елонгація завершується тоді, коли в A-ділянці з'являється один із трьох термінуючих триплетів: УАГ, УГА, УАА. Наявність їх у будь-якій ділянці мРНК обриває білковий синтез. У зоні цих триплетів за участю факторів термінації відбувається гідролітичне розщеплення зв'язку між поліпептидом і останньою тРНК. Вивільняється синтезований білок, який залишає рибосому. При цьому рибосома дисоціює на субодиниці. Термінацію синтезу білка в еукаріотів зумовлюють ті ж триплети.

3. Посттрансляційні зміни білків. Результатом процесу трансляції не завжди є утворення функціонально активного білка. У багатьох випадках необхідні наступні трансформації (перетворення). Велика кількість неактивних проферментів (пепсиноген, трипсиноген та ін.) також активуються, перетворюючись в активні ферменти шляхом часткового протеолізу. Асоціація протомерів з утворенням четвертинної структури

Клітинна і молекулярна біологія
відбувається вже після закінчення синтезу поліпептидів.

Питання до самоконтролю:

- Як називається процес початку трансляції під час біосинтезу білка?
 - 1) термінація
 - 2) елонгація
 - 3) ініціація
 - 4) трансформація
- Як називається процес завершення трансляції під час біосинтезу білка?
 - 1) ініціація
 - 2) елонгація
 - 3) термінація
 - 4) трансформація
- Що з перерахованого відповідає молекулі РНК?
 - 1) наявність дезоксирибози
 - 2) наявність тиміну
 - 3) складається з двох поліпептидних ланцюгів
 - 4) сума пуринових основ не відповідає сумі піримідинових
- На думку науковців, з чим пов'язаний низький ступінь спіралізації молекули РНК?
 - 1) з участю в біосинтезі білка
 - 2) наявністю рибози
 - 3) порівняно невисокою молекулярною масою
 - 4) заміною тиміну на урацил
- Скільки пар азотистих основ на 1 виток містить подвійна спіраль РНК в А-формі?
 - 1) 8
 - 2) 10
 - 3) 11
 - 4) 19
- Яка РНК має будову "Листок конюшини"?
 - 1) мРНК
 - 2) рРНК
 - 3) тРНК
 - 4) гяРНК

Розділ 1

7. Зі скількох нуклеотидів складається молекула тРНК?

- 1) 28
- 2) 44
- 3) 55
- 4) 75

8. На частку якої РНК припадає 10 - 15% всієї РНК клітини?

- 1) мРНК
- 2) рРНК
- 3) гяРНК
- 4) тРНК

9. Як називається передача генетичної інформації від мРНК до молекули білка?

- 1) транскрипція
- 2) трансляція
- 3) реплікація
- 4) репарація

10. Яка з різновидів РНК є основою для білкового синтезу?

- 1) іРНК
- 2) тРНК
- 3) гяРНК
- 4) рРНК

Тема 1.5. Структура геному вірусів і фагів



1.5.1. Історія відкриття і загальна характеристика вірусів. Заслуга відкриття вірусів і описання їх основних ознак належить російському вченому – *Д. Й. Івановському* (1864–1920). Свої дослідження він розпочав ще студентом Петербурзького університету. Вивчаючи мозаїчну хворобу тютюну, вчений з'ясував, що це інфекційна хвороба рослин, але збудник її не належить до жодної з відомих тоді груп мікроорганізмів. Пізніше Івановський

Клітинна і молекулярна біологія

ставив класичний експеримент: він фільтрує сік листка ураженої рослини через бактеріальний фільтр і доводить, що інфекційна активність соку не зникає. Івановський вперше описав основні властивості відкритого ним збудника мозаїчної хвороби тютюну – малі розміри (фільтропроникність), абсолютний паразитизм, здатність розмножуватися і накопичуватися при пасуванні через організм хазяїна.

Голландський дослідник *М. Беєринк* (1898) повторив досліди Івановського, але вважав, що ним відкрито своєрідний живий розчинений збудник — *contagium vivum fluidum*. Івановський у полеміці з Беєринком за допомогою простих, але переконливих експериментів з вивчення проникності вірусу у товщу свіжого та підсохлого агару, довів, що відкритий ним інфекційний агент має корпускулярну природу. Таким чином, Івановський вирізняв головні характерні ознаки вірусів, які довгий час служили орієнтиром для доведення вірусної природи збудника.

У подальшому були відкриті основні групи вірусів. *Ф. Лефлер і П. Фрош* (1898) довели фільтропроникність збудника ящуру (вірус ящуру вражає тварин і людей), *П. Раус* (1911) довів фільтропроникність збудника пухлинного захворювання — курячої саркоми, *Ф. Творт* (1915) і *Ф. д'Ерель* (1917) відкрили фаги – віруси бактерій.

Так було відкрито основні групи вірусів. Сьогодні відомо понад 500 видів вірусів. Подальший прогрес у розвитку вірусології пов'язаний з розробкою методів культивування вірусів. Спочатку вивчення вірусів відбувалося лише при зараженні чутливих організмів. Значним кроком вперед стала розробка методу культивування вірусів у курячих ембріонах (*А. Вудруф і Е. Гудпасчуром*, 1931). Революція у вірусології — це розробка методу культивування вірусів в одношарових культурах клітин (*Дж. Ендерс, Т. Уеллер, Ф. Роббінс*, 1948). В 1952 р. це відкриття було удостоєне Нобелівської премії.

Розділ 1

Термін «**вірус**» запровадив у наукову термінологію ще Л. Пастер. У 1885 р. він одержав вакцину для профілактики сказу, хоча і не виявив збудника цієї хвороби — до відкриття вірусів залишалося ще 7 років. Він назвав гіпотетичного збудника вірусом сказу, що в перекладі значить «отрута сказу».

Термін «вірус» застосовується для позначення будь-якої стадії розвитку вірусу і позаклітинно розміщених інфекційних часток та вірусу, який репродукується внутрішньоклітинно. Для позначення окремої вірусної частки, за пропозицією А. Львова, застосовують термін **віріон**.

Віруси – найпростіша неклітинна форма життя, що містить лише один тип нуклеїнової кислоти, має своєрідний обмін речовин, опосередкований через метаболізм клітин і організмів, унікальний роздільний спосіб розмноження і здатність паразитувати на генетичному рівні.

Поза клітиною віруси не можуть реплікуватися, оскільки у більшості з них немає ферментів, необхідних для повного відтворення зрілої вірусної частки. Діаметр вірусних частинок (віріонів) дорівнює 20-300 нм. Внаслідок їх малих розмірів і нездатності до самовідтворення віруси часто відносять до розряду «неживого».

1.5.2. ДНК-вмісні віруси. Віруси містять лише один тип нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК. Відповідно виділяють ДНК-геномні (ДНК-вмісні) і РНК-геномні (РНК-вмісні) віруси несуть в якості генетичного матеріалу або одно-, або дволанцюгову ДНК, яка може бути як лінійною, так і кільцевою. У ДНК закодована інформація про всі білки вірусу. Віруси класифікують в залежності від того, одно- або дволанцюжкова у них ДНК і про чи еукаріотичною є клітина-господар. Віруси, що заражають бактерії, називаються **бактеріофагами**.

Структура вірусу в принципі така: це молекула ДНК в білковій «обгортці», званої

Клітинна і молекулярна біологія

капсидом. Існує, однак, безліч різних варіантів будови вірусів – від просто покритої білком ДНК (наприклад, бактеріофаг РП) до складних макромолекулярних комплексів, оточених мембранними структурами (наприклад, вірус віспи).

Ультраструктура вірусів — це будова віріонів. Форма віріонів може бути різною — сферичною, кубічною, паличкоподібною, сперматозоїдоподібною. Структура віріонів розрізняється у простих і складних вірусів. *Кожний віріон складається з нуклеїнової кислоти, яка у вірусів складає нуклеон*, який часто, особливо у складних вірусів, називають також **нуклеоїд** (порівняйте: нуклеус — у еукаріот, нуклеоїд — у прокаріот). Нуклеїнова кислота обов'язково зв'язана з *первинною білковою оболонкою — капсидом* (лат. *capsa* — вмістилище), який складається із білкових капсомерів. **Капсомери** — це видимі в електронний мікроскоп утворення з однієї або кількох білкових молекул. У результаті об'єднання нуклеїнової кислоти з капсомерами утворюється **нуклеопротеїд (нуклеокапсид)**.

Прості віруси складаються лише з нуклеокапсиду (віруси поліомієліту, вірус мозаїчної хвороби тютюну). **Складні віруси** мають ще вторинну оболонку – **суперкапсид**, який містить, окрім білків, ліпіди і вуглеводи. Об'єднання структурних елементів у віріоні може бути різним. Виділяють три типи симетрії вірусів – спіральний, кубічний, змішаний. Вірусні частинки симетричні відносно осі (рис.1.5.1).

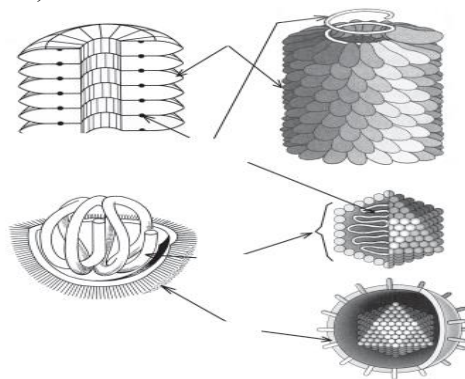


Рис. 1.5.1. Типи симетрії вірусів. Гудзь С. П., Перетятко Т. Б., Павлова Ю. О. Загальна вірусологія. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 264 с.

Розділ 1

При *спіральному типу симетрії* окремі капсомери, які можна розрізнити в електронному мікроскопі, розміщуються за ходом спіралі нуклеїнової кислоти так, що її нитка проходить між двома капсомерами, які охоплюють її з усіх боків. У результаті утворюється паличкоподібна структура (наприклад, у вірусу тютюнової мозаїки). Але не обов'язково віруси зі спіральним типом симетрії повинні бути паличкоподібними. Наприклад, вірус грипу, хоча і має спіральний тип симетрії, але його нуклеокапсид скручується певним чином і вкривається суперкапсидом. У результаті віріони грипу мають, як правило, сферичну форму.

При *кубічному типу симетрії* нуклеїнова кислота скручується певним чином у центрі віріона, а капсомери вкривають нуклеїнову кислоту ззовні, утворюючи об'ємну геометричну фігуру. Найчастіше утворюється фігура багатогранника ікосаедра. Таку форму мають, наприклад, віруси поліомієліту. В профіль віріон має форму шестикутника. Більш складну форму має аденовірус, також кубічного типу симетрії. Від вершин багатогранника відходять довгі нитки — фібри, які закінчуються потовщенням.

При *змішаному типі симетрії* (наприклад, у бактеріофагів) голівка з кубічним типом симетрії має форму ікосаедра, а відросток містить спіральну закручену скоротливу фібрилу. Якщо у вірусу є мембрана, кажуть, що він в оболонці, а якщо мембрани немає, вірус називають «роздягненим». Розрізняють чотири основні класи капсидів ДНК-вмісних вірусів: спіральні, ікосаедричні, складні без оболонки, складні з оболонкою.

Спіральні капсиди зазвичай зустрічаються у ниткоподібних вірусів. Вони утворюються шляхом самозбірки асиметричних білкових субодиниць (капсомерів), об'єднуються в трубчасту структуру зі спіральною симетрією (наприклад, у РП). Субодиниці в більшості випадків гомогенні, так що поверхня віріона складається з безлічі копій одного й того ж білка, хоча під зовнішнім

Клітинна і молекулярна біологія

капсидом можуть перебувати й інші білки. ДНК в таких вірусах або витягнута, або може бути туго скручена в комплексі зі спеціальними зв'язуючими білками.

Ікосаедричні капсиди властиві більшості сферичним ДНК-вірусам. Ікосаедр — це багатогранник з двадцятьма трикутними гранями, має кубічну симетрію і приблизно сферичну форму. Вершини трикутників, з'єднуючись, утворюють відповідно дванадцять вершин ікосаедра; в місцях з'єднання розташовуються зазвичай пентамерні білкові структури — пентони; там же можуть знаходитися ділянки, на яких формуються білкові нитки, нерідко асоційовані з вершинами. ДНК зазвичай щільно згорнута всередині капсиду; іноді вона пов'язана з білками або поліпептидами, здатними стабілізувати її структуру.

Складні капсиди без оболонки типові для бактеріофагів: вони складаються з частин з різними типами симетрії. У бактеріофага Т2, наприклад, ДНК знаходиться в ікосаедричній голівці, а для «впізнання» бактерії і введення в неї ДНК служать трубчасті і фібрилярні структури (в впізнаванні бере участь також лізоцим, розташований на дистальному кінці хвостового відростка).

Складні капсиди з оболонкою є тільки у вірусів еукаріотів. Вони властиві багатьом вірусам з нуклеоїдом, що складається з ДНК-білкових комплексів. Ці комплекси оточені одним або декількома білковими шарами, що мають або ікосаедричну, або нерегулярну симетрію, і зовнішньої мембраною, майже всі білкові компоненти якої є за своїм походженням вірусними, а ліпідні структури — клітинними.

1.5.3. РНК-вмісні віруси. РНК-вмісні віруси не мають ДНК; генетична інформація цих вірусів закодована в РНК. РНК може бути одно- або дволанцюговою, а клітина-хазяїн — про- чи еукаріотична. Тільки віруси з одноланцюговою РНК заражують бактерії, тоді як віруси рослин

Розділ 1

і тварин можуть бути як одно-, так і дволанцюговими.

Віруси з дволанцюгової РНК заражають як рослини, так і тварин. Наприклад, вірус колорадської кліщової лихоманки і вірус карликовості рису заражують відповідно комах і рослини. Ці віруси містять РНК в сегментованій формі: у вигляді деякого числа дволанцюжкових фрагментів.

Віруси з одноланцюговою РНК можна розділити на два типи: з «плюс» ланцюгом і «мінус» ланцюгом. У вірусів першого типу ланцюг РНК може функціонувати у клітині-хазяїні безпосередньо як мРНК, тоді як у вірусів другого типу на «мінус» - ланцюга повинна спочатку за допомогою клітинних РНК-полімерази утворити «плюс» -ланцюг. Віруси тварин бувають як першого, так і другого типів, а більшість вірусів рослин відносяться до «плюс» -типів. Особливий клас «плюс» -одноланцюгових вірусів утворюють ретровіруси, які здатні заражати лише клітини тварин. Вони відрізняються від інших РНК-вмісних вірусів тим, що мають диплоїдний геном, який складається з двох ідентичних «плюс» -ланцюгів РНК.

Реовіруси – це ікосаедричні віруси без оболонки, білковий капсид яких складається з двох шарів – зовнішнього і внутрішнього. Всередині капсида знадяться 10 або 11 сегментів дволанцюгової РНК. Інфекційний процес починається з проникнення в клітину РНК і потім протікає відповідно з наступною схемою. Після часткового руйнування зовнішнього капсида ферментами лізосом РНК в утвореній таким чином вірусній частці транскрибується, її копії залишають частинку і поєднуються з рибосомами. Потім у клітині-хазяїні продукуються білки, необхідні для формування нових вірусних частинок.

Реплікація РНК вірусів відбувається по консервативному механізму – на відміну від реплікації у ДНК-вмісних організмів, яка є напівконсервативною. Один з ланцюгів кожного сегмента РНК служить матрицею для синтезу великого числа нових «плюс» -

Клітинна і молекулярна біологія

ланцюгів. На цих «плюс» -ланцюгах утворюються потім як на матриці «мінус» -ланцюги; «плюс» - і «мінус» -ланцюги при цьому не розходяться, а залишаються разом у вигляді дволанцюжкових молекул. Збірка нових вірусних частинок з новостворених «плюс» - і «мінус» -сегментів і капсидних білків пов'язана якимось чином з мітотичним веретеном клітини-господаря, проте точно механізм складання не відомий.

Вірус грипу є прикладом вірусу з «мінус» - одноланцюговою РНК. У нього є оболонка і спіральна серцевина. Остання складається з восьми сегментів «мінус» РНК, які в комплексі з білками утворюють спіралеподібні структури. Кожен сегмент кодує один з білків вірусу. У найбільшій кількості вірус містить білок матриксу, розташовується на внутрішній стороні оболонки і що надає їй стабільності. Всі білки оболонки кодуються вірусною РНК, тоді як ліпіди є за своїм походженням клітинними. Основні білки оболонки – гемаглютинін і нейрамінідаза.

Інфекційний процес, починається з прикріплення вірусу до поверхні клітини-господаря через гемаглютинін. Потім відбувається злиття оболонки з клітинною мембраною, нуклеопротеїнова серцевина (нуклеокапсид) входить у клітину, і кодована вірусом РНК-залежна РНК-полімераза синтезує «плюс» -ланцюги мРНК на вірусних «мінус» -ланцюгах, після чого на рибосомах клітини господаря продукуються вірусні білки. Деякі з цих білків відіграють важливу роль в реплікації вірусного геному.

Вірус тютюнової мозаїки – приклад «плюс» -одноланцюжкового вірусу рослин. Він не має оболонки, спіральний вірус містить 2130 ідентичних молекул білка капсида і один ланцюг РНК. РНК розташовується в спіральному жолобку, утвореному білковими субодиницями, і утримується багаточисельними слабкими зв'язками.

Інфекційний процес полягає в проникненні вірусу в рослинну клітину з подальшою швидкою втратою ними капсида.

Розділ 1

Потім в результаті трансляції безпосередньо «плюс» -ланцюговою вірусною РНК рибосомами клітини-господаря утворюються кілька білків, частина яких необхідна для реплікації вірусного геному.

Ретровіруси належать до «плюс» -ланцюгових РНК-вірусів тварин; майже всі вони є онкогенними. У ретровірусів є оболонка і ікосаедрична серцевина, що містить дві ідентичні молекули «плюс» -ланцюгової РНК.

Процес інфікування починається з проникнення вірусу в клітину. Після вивільнення РНК в цитоплазмі клітини-господаря РНК-залежна ДНК-полімераза, кодується вірусним геномом, синтезує на «Плюс» -ланцюгу РНК «мінус» -ланцюг ДНК. Потім рибонуклеиновий ланцюг в РНК / ДНК-гібриді руйнується, і на «мінус» -ланцюгу ДНК, як на матриці, утворюється «плюс» -ланцюг ДНК. Отримана в результаті дволанцюгова ДНК переміщується в ядро клітини-хазяїна і вбудовується там в клітинну ДНК.

Практичний блок

Визначення температури «плавлення» водневих зв'язків

Досліджуваний матеріал: препарат ДНК.

Реактиви: стандартний сольовий розчин, що містить хлорид натрію (0,15 моль) і цитрат натрію (0,015 моль) в 1 л (рН = 7,0).

Обладнання: спектрофотометр з термостатованою камерою.

Хід роботи

Препарат ДНК розчиняють (з розрахунку 10-20 мкг ДНК в 1 мл) в стандартному сольовому розчині, розбавленому в 10 разів. розчин поміщують в кварцову кювету (1 см) з герметичною кришкою для запобігання обертання випаровування. На спектрофотометрі визначають екстинкцію (E260 нм) при різних температурах в проміжку

Клітинна і молекулярна біологія

від 25 до 95° С з інтервалом не більше 5 ° С і витримкою при певній температурі протягом 5-10 хвилин. Якщо спостерігається різка зміна екстинкції при будь-якої температурі, це вказує на те, що досліджувана ДНК нативна; якщо зростання екстинкції відбувається поступово, то ДНК частково денатурована. За результатами вимірювань будують криву «плавлення». Для цього по осі ординат відкладають відношення оптичної щільності розчину при вимірюваній температурі (t) до оптичної щільності при 25 ° С, а по осі абсцис – температуру. Крапку «плавлення» (tпл.) ДНК знаходять по кривій «плавлення». Вона відповідає середині зони підйому кривої відносної екстинкції.

Залежність між точкою «плавлення» і змістом ГЦ-пар в ДНК визначають за формулою:

$$СГЦ = 2,44 (t_{пл.} - 69,3),$$

де СГЦ - зміст ГЦ-пар в молярних відсотках; 69,3 і 2,44 – постійні коефіцієнти.

Середні дані отримують з 3-4 паралельних дослідів.

Концентрування ДНК шляхом осадження спиртом

Мета роботи. Ознайомлення з методами осадження ДНК з розчинів різної концентрації.

Найбільш часто використовуваний метод концентрування ДНК – осадження етанолом. Розчинивши отриманий осад в меншому об'ємі буферного розчину, отримують більш концентрований розчин ДНК. При переосадженні ДНК спиртом відбувається її додаткове очищення.

Етиловий спирт як водовіднімаючий засіб знижує розчинність нуклеїнових кислот (їх солей) в воді. ДНК (РНК) агрегує в 70% етанолі в присутності солі, нейтралізує фосфатні групи. Агрегація НК проходить краще при низькій температурі і для неї потрібен якийсь час. Утворені агрегати осаджують центрифугуванням.

Розділ 1

На осадження ДНК з розчину беруть 2,5 об'єму етанолу або 1 об'єм ізопропанолу. При значних масштабах робіт з метою економії допускається брати 0,6 об'єму ізопропанолу як мінімум. Потрібно пам'ятати, що 70% - це оптимум концентрації етилового спирту для преципітації нуклеїнових кислот. Якщо концентрація етанолу буде низькою, то ДНК в кристалічний стан (холестеричні рідкі кристали) не перейде, якщо високою - в осад разом з нею випадуть білки, що залишилися та інші домішки. Оптимальна іонна сила для осадження ДНК становить 0,2М NaCl; при її зниженні ДНК буде преципітувати гірше.

ДНК після осаджування потрібно перевести в розчин з нейтральним або слабколужним показником рН середовища, якщо передбачається зберігання. Крім спиртів для осадження нуклеїнових кислот застосовують також поліетиленгліколь PEG, цетилтриметіламмоніум бромід СТАВ та інші хаотропні речовини. Стандартна процедура - спиртове осадження.

Матеріали та обладнання:

Зразок ДНК будь-якого походження з низькою концентрацією, мікроцентрифуга, глікоген.

Розчини:

- 5М NaCl. Розчинити 292,5 в воді, довівши об'єм до 1 л.
- 3М ацетат натрію, рН 5,2 (тема 1).
- Розчин глікогену в воді 10 мг / мл.
- 96% і 70% етанол.

Методика

1. Довести концентрацію солі в препараті до 0,2 М NaCl (або до 0,3М ацетату натрію), використовуючи концентровані стічні розчини цих солей. Найчастіше до розчину ДНК додають 1/25 об'єму 5М NaCl або 1/10 об'єму 3М ацетату натрію, рН 5,2, оскільки ці розчини завжди є під рукою у дослідника ДНК і білків.

2. Якщо концентрація ДНК низька, то потрібно додати будь-який співосаджувач, наприклад глікоген, до кінцевої концентрації 50 мкг/мл.

Клітинна і молекулярна біологія

3. Додати до розчину ДНК 2,5 об'єму холодного 96% етанолу, з огляду на об'єм доданого розчину солі.

4. Інкубувати при кімнатній температурі від 5 хв і до витримання протягом ночі при -20 °С в залежності від концентрації ДНК.

5. Центрифугувати при максимальній швидкості мікроцентрифуги протягом 10 хвилин. (Препарати ДНК з низькою концентрацією осаджують протягом 1-2 годин в високошвидкісний центрифугі з охолодженням при швидкості 27000 об / хв і постійній температурі + 4 °С).

6. Промити осад ДНК холодним 70% -ним етанолом. Для цього перемішати вміст перевертанням колби декілька разів, злити спирт і помістити пробірку в перевернутому вигляді на фільтрувальний папір, щоб стекли залишки спирту. Підсушити осад.

7. Розчинити ДНК в буфері TE або H₂O.

Примітки:

а) Будь-яка ДНК і РНК в розчині (колоїдному) це не кислота, а сіль нуклеїнової кислоти. І катіон у неї той же, що і у солі, в присутності якої вона осідала.

б) Ацетати, цитрати, сульфати є космоотропними солями, ціанати - хаотропні солі. Для осадження ДНК з розчинів, що містять SDS, найчастіше застосовується NaCl, оскільки інші солі висаджують SDS істотно краще.

в) Робочі концентрації інших співосаджувачів: тРНК - 5-10 мкг / мл, лінійний поліакриламід - 10-20 мкг / мл.

г) Замість етанолу можна використовувати ізопропанол. В цьому випадку додається не 2,5 об'єму, а 1 об'єм. Осадження ізопропанолом має одну перевагу перед етанольним – пробірки можуть бути меншого об'єму. Основний недолік – ізопропанол менш летючий і подальша промивка 70% етанолом є обов'язковою.

д) Було показано, що збільшення часу інкубації, так само як і зниження температури, не робить істотного впливу на ефективність осадження ДНК.

Розділ 1

е) Пробірку потрібно заповнювати 70% спиртом не більше ніж на 2/3. Добре буде перед зливанням 70% спирту центрифугувати пробу протягом 2-3 хв при максимальній швидкості центрифуги: опади хоч і щільні, але їх можна випадково вилити разом з розведеним спиртом. Таке іноді трапляється, особливо якщо ДНК погано очищена від білків, без яких вона ніколи не існує *in vivo*. У клітині ДНК – це завжди ДНП, і поза клітиною також покрита білковими молекулами (вірус, бактеріофаг). У роботі з ДНК якісні показники важливіші за кількісні.

Питання до самоконтролю:

1. Яка кількість білків може бути у складі вірусів?

- 1) 10 - 20%
- 2) 30 - 40%
- 3) 5 - 15%
- 4) 50 - 90%

2. Віруси, що вражають бактерій, називаються:

- 1) Віріони
- 2) Фаги
- 3) Реовіруси
- 4) Ретровіруси

3. Хто з науковців відкрив віруси?

- 1) М. Беєринк
- 2) Д. Івановський
- 3) Л. Полінг
- 4) Л. Пастер

4. Хто з науковців відкрив фагів?

- 1) Дж. Уотсон і Ф. Крік
- 2) Ф. Лефлер і П. Фрош
- 3) П. Раус
- 4) Ф. Тфорт і Ф. дЕрелль

5. Що належить до ультраструктури вірусів?

- 1) Будова капсиди
- 2) ДНК
- 3) РНК
- 4) Будова віріонів

Клітинна і молекулярна біологія

6. Ікосаедричні віруси без оболонки, білковий капсид яких складається з двох шарів, це:

- 1) реовіруси
- 2) ретровіруси
- 3) фаги
- 4) тотівіріди

7. Характерною особливістю вірусів є:

- 1) відсутня ядерна оболонка
- 2) відсутність клітинної організації
- 3) наявність РНК
- 4) особливе упакування генетичного матеріалу

8. Що таке вірогенія?

- 1) проникнення вірусу в клітину
- 2) фагоцитоз вірусів
- 3) збереження вірусу в клітині за рахунок постійної реплікації
- 4) вихід вірусу з клітини хазяїна

9. Які речовини необхідні для реплікації вірусів?

- 1) вуглеводи
- 2) ферменти
- 3) ліпіди
- 4) білки

10. Як здійснюється метаболізм вірусів?

- 1) опосередковано через клітину хазяїна
- 2) віруси здатні до автотрофного живлення
- 3) віруси здатні до гетеротрофного живлення
- 4) метаболізм вірусів здійснюється автономно

Тема 1.6. Структура геному прокаріотів

1.6.1. Загальна характеристика прокаріотичної клітини. Прокаріотична клітина – найпростіший тип живої клітини. До прокаріотів належать такі одноклітинні організми, як бактерії і синьо-зелені водорості. Визначальною особливістю прокаріотичної

Розділ 1

клітини є наявність прямого контакту між її хромосоною і цитоплазмою. Хромосоми еукаріотичної клітини, навпаки, укладені в мембранну структуру – ядро. Від еукаріотів прокаріоти відрізняються, крім того, відсутністю мітохондрій і хлоропластів, меншими розмірами рибосом (їх коефіцієнт седиментації 70S), а також вельми обмеженою – через наявність клітинної стінки – здатністю виділяти і поглинати великі молекули.

Хромосома в прокаріотичній клітині всього одна. Вона являє собою безперервний кільцевий тяж дволанцюгової ДНК. Молекула ДНК може досягати довжини близько 1 мм (наприклад, у бактерії *E. coli*); в клітині вона зазвичай туго скручена в компакту спіральну структуру. існують також позахромосомні ДНК-вмісні елементи – плазміди. Це маленькі кільцеві структури, що несуть лише по кілька генів; деякі з них можуть кодувати такі ферменти, завдяки яким клітина стає стійкою до різних антибіотиків.

Плазматична мембрана клітини складається з ліпідів і білків. Вона служить напівпроникним бар'єром, який контролює перенесення малих молекул і іонів в клітину і з клітини.

Мезосома є вп'ячуванням плазматичної мембрани в цитоплазму. Вона містить багат шарову мембранну систему, яка своїм цитоплазматичним боком часто пов'язана з ДНК. Вважається, що мезосоми беруть участь в клітині в двох різних процесах: вони можуть служити місцем прикріплення ДНК (особливо під час реплікації) і грати певну роль в секреції.

Клітинна стінка розташована зовні від плазматичної мембрани і покриває всю клітину. вона забезпечує клітині жорсткість, надає їй певну форму, а також захищає її від ушкодження при осмотичних і механічних впливах. У бактерій клітинна стінка є жорсткою мережею з ліпідів, полісахаридів і білків.

Желатиновий шар (гликокалікс) – найзовнішній шар клітини прокаріотів; найчастіше він зустрічається у синьо-зелених

Клітинна і молекулярна біологія

водоростей. Основним компонентом клітинної стінки бактерій є **пептидоглікан**, або **муреїн** (лат. *mureus* — стінка). Скелет пептидоглікану складається з паралельно розміщених молекул глікану (аміносахаридів), які складаються із залишків N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, зв'язаних між собою глюкозидними зв'язками. Гліканові молекули зв'язані бічними і поперечними пептидними містками, звідси і назва полімеру – пептидоглікан.

Отже, за компонентами і структурою клітинної стінки бактерії докорінно відрізняються від тварин і рослин.

Джгутик – білкова органела, що відходить від поповерхні клітини у вигляді витягнутого відростка довжиною від 1 до 20 мкм. За допомогою джгутиків клітина переміщується в рідкому середовищі.

Рибосома – складна органела, в якій здійснюється синтез білка. У зв'язку з тим що бактерії розмножуються дуже швидко, рибосоми можуть становити до 40% маси клітини. Рибосома – це комплекс молекул білків і РНК (рРНК), що утворюють майже сферичну частинку діаметром 20 нм. В рибосомі можна виділити дві частини – велику і малу субчастини. Велика субчастина складається з 34 різних білків, пов'язаних з великою (23S) та малою (5S) молекулами рРНК. Мала субчастина містить 21 білок і молекулу рРНК середнього розміру (16S).

Включення – це морфологічно диференційовані частки, які виникають у цитоплазмі бактерій у процесі життєдіяльності: гранули волютину, ліпопротеїдні тільця, глікоген, гранульоза, скупчення пігменту, краплини сірки, кальцію гідрокарбонат та ін. Вони є продуктами метаболізму і використовуються бактеріями як запасні поживні речовини.

Рух прокаріотів здійснюється за допомогою джгутиків. Ці ниткоподібні відростки можуть обертатися як за, так і проти годинникової стрілки. Обертанням керує складне білкове утворення, розташоване біля

Розділ 1

основи джгутіка. Нитка, що відходить від основи, є полімером білка флагелліна. Клітка або рухається поступально, або як би перекидається на місці. У *E. coli* є невелике число джгутіків, розташованих на одному кінці клітини; тип руху клітини визначається напрямленим обертанням її джгутіків. Розмноження прокаріотів відбувається нестатевим шляхом. Кожна прокаріотична клітина ділиться на дві внаслідок мітозу; з дочірніми клітинами відбувається те ж саме, і т. д.

1.6.2. Клітинний цикл прокаріотів. Ділення прокаріотичної клітки включає реплікацію єдиної кільцевої хромосоми і всіх розміщених в клітині плазмід, а також подвоєння клітинних органел, в тому числі плазматичної мембрани і компонентів клітинної стінки. Швидкість поділу бактерій залежить від вмісту поживних речовин в середовищі, в якій ростуть клітини. Якщо бракує будь-яких важливих субстратів, зменшується швидкість ініціації реплікації; при цьому швидкість самої реплікації не змінюється.

Тривалість реплікації у більшості прокаріотів постійна (близько 40 хв). Якщо подвоєння ДНК почалося, воно триває до кінця, незалежно від будь-яких змін у складі живильного середовища, що відбулися в цей час. Час, що передує ініціації реплікації ДНК, не постійний (20-220 хв). Довгий і короткий цикли. Довгий цикл має місце тоді, коли дуже значний час до початку ініціації. В цьому випадку після початку реплікації нові точки ініціації в хромосомі не виникають до тих пір, поки не здійсняться всі події клітинного циклу. Час, необхідний для появи нових точок ініціації, мінливий, і від нього в основному залежить повна тривалість клітинного циклу. Короткий цикл має місце тоді, коли нові точки ініціації виникають до повного завершення циклу реплікації. Таким чином, ще до закінчення поділу клітини починається наступний цикл реплікації.

Клітинна і молекулярна біологія

Ініціація реплікації здійснюється за допомогою специфічних білків. Якщо клітини помістити в середовища без будь-якого ключового субстрату, наприклад триптофану, синтез білка відразу зупиниться. хоча реплікація ДНК і поділ клітин тривають, новий цикл реплікації починається до тих пір, поки знову не почнеться синтез білка. Звідси слідує, що ініціатори – це білки, які взаємодіють з ДНК і переводять її в такий стан, в якому вона здатна зв'язувати ДНК-полімерази.

Поділ клітини відбувається, коли її сумарна маса достатня для двох клітин і коли завершилася реплікація. Час, що витрачається на процес поділу, відносно постійний і становить близько 20 хв.

1.6.3. Структура і функції бактеріальних плазмід та оперонна організація геному. Клітини прокаріот містять єдину копію геномної ДНК і є, таким чином, гаплоїдними.

Хромосома прокаріотів містить приблизно 2000 – 3000 генів, що не перекриваються, розташованих вздовж ДНК. Структурні гени поділяються на три основних типи: незалежні гени, транскрипційні одиниці (транскриптони) і оперони. Крім того, в клітині можуть перебувати більш дрібні одиниці, здатні до автономної реплікації, звані *плазмідами*.

Оперон – це групи послідовно слідуючих структурних генів, що знаходяться під контролем певної ділянки ДНК, званого *оператором*. Прикладом може служити *lac*-оперон, що складається з трьох структурних генів (*Z*, *Y* і *A*) і регуляторної ділянки ДНК, який в свою чергу складається з двох послідовностей – промотора і оператора. Ще один ген, ген-регулятор (*I*), кодує білок, так званий репресор, за допомогою якого відбувається регуляція транскрипційної активності *lac*-оперону.

Плазміди є невеликими кільцевими молекулами ДНК різної довжини. Великі плазміди можуть містити до 100 генів. Такі

Розділ 1

плазмиди часто (хоча і не завжди) несуть генетичну інформацію, яка дозволяє їм переходити з однієї клітини в іншу під час процесу, званого кон'югацією.

У дрібних плаزمідах число генів може становити всього близько 10, і вони не здатні переходити з клітини в клітину при кон'югації. Число генів в плазміді не постійне. Обмін генетичною інформацією з геномом клітини або з іншими плазмідами відбувається шляхом перенесення певних ділянок плазмидної ДНК, здатних до переміщення (транспозиції), з однієї молекули ДНК на іншу і званих транспозонами.

Транспозони – ділянки ДНК, здатні до переміщення з однієї молекули на іншу, - часто містять гени резистентності (нечутливості) до антибіотика. Гени, які опинилися в транспозоні, можуть переходити від плазмід до хромосомної ДНК і назад. Таким чином, внаслідок перенесення плазмід при кон'югації гени резистентності можуть швидко поширюватися в популяції бактерій.

Is-послідовності (англ. *insertion* — вставка, *sequence* — послідовність) — це фрагменти ДНК довжиною в 100 і більше пар нуклеотидів, які містять інформацію лише для транспозиції, переміщення в різні ділянки ДНК. При переміщенні Is-послідовностей змінюється функціонування хромосомних генів — вони можуть інактивуватися або ж експресуватися, в них можуть виникати мутації.

Прокаріоти – це найпростіші одноклітинні організми, яким для того, щоб вижити, потрібно лише сприятливе хімічне середовище.

Репресор – це білок, який блокує транскрипцію гена. У lac-системі репресор є тетрамерний білок і називається lac-репресором. Він зв'язується з певною ділянкою на ДНК, котора називається оператором.

Оператор (O) являє собою невелику ділянку ДНК, межує з першим структурним геном. Білок-репресор може зв'язуватися з цією ділянкою, блокуючи тим самим ініціацію транскрипції. Операторна послідовність, з якою

Клітинна і молекулярна біологія

зв'язується репресор, містить ділянку паліндромний ДНК. Послідовність з віссю симетрії 2-го порядку є частиною місця зв'язування з репресором в lac -опероні.

Промотор (P) – це невелика ділянка ДНК перед оператором. Він служить місцем зв'язування РНК полімерази. Місце зв'язування репресора (O) і ділянки P злегка перекриваються, так що, коли репресор знаходиться на ДНК, РНК-полімераза не може зв'язатися з промотором і транскрипція не йде.

Індуктор – являє собою низькомолекулярну речовину, яка зв'язується з репресором і переводить його в неактивну форму, нездатну більше зв'язуватися з оператором. Так, в lac-системі індуктором є лактоза, після асоціації з якою репресор від'єднується від lac-оператора. Індукція є однією з форм негативної регуляції; називаються так тому, що транскрипція може йти лише після видалення репресора. Ще однією різновидністю негативної регуляції є так звана катаболітна репресія.

Репресія відбувається тоді, коли репресор зв'язується з оператором не інакше, як в комплексі з низькомолекулярним кофактором (корепресором). Таким корепресором часто буває кінцевий продукт білкового синтезу, який кодується опероном. Тоді, якщо концентрація цього продукту стає занадто високою, він зв'язується з репресором і подальший його синтез припиняється. Прикладом такої системи може служити триптофановий оперон.

Практичний блок

Підготовка та проведення полімеразної ланцюгової реакції ПЛР

Мета роботи. Проведення підготовчого етапу полімеразної ланцюгової реакції.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в реакційній суміші повинні бути присутніми наступні компоненти:

Розділ 1

1) праймери (“прямий” і “зворотний”) - штучно синтезовані олігонуклеотиди, що фланкують ділянку ампліфікації. Праймери мають, як правило, розмір від 15 до 30 пар основ, і ідентичні відповідним ділянкам ДНК-мішені.

2) термостійка ДНК-полімераза - термостабільний фермент, що забезпечує добування 3'-кінця другого ланцюга ДНК згідно з принципом комплементарності.

3) суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксцитозинтрифосфата (дЦТФ) і дезокситимідинтрифосфата (дТТФ) – “будівельний матеріал”, який використовується термостабільною полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК. Кінцева концентрація кожного дНТФ, як правило, 0,25 мМ;

4) 5-10 мМ трис-НСІ буферний розчин рН 8-9 (зазвичай додається до будь-якого комерційного препарату ДНК-полімерази і оптимізований для неї).

5) катіони Mg²⁺ як необхідний кофактор ДНК-полімерази (використовують розчин MgCl₂ в кінцевій концентрації 1,5-3 мМ, оптимальну концентрацію підбирають експериментально відповідно до застосовуваного типу ДНК-полімерази і числом продуктів, які одночасно ампліфікуються).

6) неіонний детергент Tween20 для запобігання адсорбції молекул ДНК-полімерази на стінках реакційного посуду (як правило, пробірки з поліетилену);

7) іноді додатково бичачий сироватковий альбумін (БСА), ді- та олігосахариди для стабілізації ДНК-полімерази, формаїд (для підвищення специфічності гібридизації праймерів з ДНК-матрицею) і ін.

8) зразок що аналізується – підготовлений до внесення в реакційну суміш препарат, який може містити ДНК, яку потрібно знайти, наприклад, ДНК мікроорганізмів, що служить мішенню для подальшого багаторазового копіювання.

Клітинна і молекулярна біологія

Розрахунок кількості праймерів для ПЛР-суміші. Для приготування реакційної суміші потрібно, як правило, 5-10 пкмоль кожного з пари праймерів. Виходячи з цієї величини і концентрації праймера, визначають обсяг вихідного розчину праймера, який необхідно додати в реакційну суміш, за формулою:

$$V = \frac{E}{Kp},$$

де V - обсяг розчину праймера, мкл,

E - необхідна кількість праймера, пкмоль,

Kp - концентрація праймера, пмоль / л.

Підготовка та проведення полімеразної ланцюгової реакції ПЛР

Мета роботи: Ознайомитися з методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Принцип методу*. Специфічна ампліфікація ДНК за допомогою полімерази, що здійснює виборчий синтез взаємно комплементарних ланцюгів ДНК, починаючи з двох праймерів (запалів)

* - принцип методу був розроблений Кері Мюллісом (фірма "Cetus", США) в 1983р.

Матеріали і обладнання:

1. Термоциклер (ДНК-ампліфікатор).
2. Мікроцентрифуга-вортекс (до 2000 г).
3. Термостат твердотільний з функцією охолодження для мікропробірок місткістю 0,5-1,5 мл.
4. УФ-бокс.
5. Автоматичні дозатори змінного обсягу з наконечниками.
6. Набір реагентів для ампліфікації ДНК: мікропробірки, що містять ліофілізовану ампліфікаційну суміш “ПЛР-ядро”; ПЛР-розчинник; суміш праймерів готують самостійно або вона входить до складу суміші; позитивний контроль (розчин стандартної ДНК) підбирається самостійно або входить до складу суміші; масло мінеральне.

Розділ 1

7. Розчини ДНК-матриці (зразки ДНК, виділені з прокариотів або еукаріот).

8. Вода дистильована.

9. Рукавички гумові або латексні, непудрені.

Хід роботи

Увага! Всі маніпуляції робити тільки в рукавичках! Наконечники для автоматичного дозатора необхідно використовувати одноразово!

1. Виймають з пакета необхідну кількість пробірок ПЛР-ядро (воно дорівнює числу аналізованих проб плюс позитивний і негативний контроль), розміщують їх у штативі і маркують.

2. Додають в кожную пробірку ПЛР-ядро по 10 мкл ПЛР-розчинника.

3. Додають в кожную пробірку ПЛР-ядро 5 мкл суміші прямого і зворотного праймерів. Аналогічно приготувати позитивний контроль, використовуючи розчин ДНК (20 50 нг / мкл), виділеної з рослинної або тваринної тканини будь-яким з наведених раніше способів.

4. Вміст пробірок перемішують, струшуючи на вортексі, до повного розчинення сухих компонентів суміші. Зазвичай для цього потрібно 5-10 хв.

5. Додають в пробірки з ампліфікаційних сумішшю:

- в пробірку з маркуванням К (негативний контроль) – 5 мкл ТЕ-буфера з комплекту, використаного для виділення ДНК;

- в пробірки з маркуванням № ... (досліджувані зразки) – по 5 мкл проби відповідної ДНК-матриці;

- в пробірку з маркуванням К + (позитивний контроль) – 5 мкл розчину стандартної ДНК.

6. Вміст всіх пробірок ще раз акуратно перемішують.

7. У всі пробірки додають по 20-25 мкл (дві краплі) мінерального масла, пробірки щільно закривають кришками.

8. Пробірки центрифугують 5-7 с при 2000 г. При цьому окремі краплі ПЛР-суміші, які опинилися при її перемішуванні на стінках і

Клітинна і молекулярна біологія

кришці пробірки, повинні бути скинуті на дно, а зверху рівно нашаровано мінеральне масло.

9. Пробірки з готовою ПЛР-сумішшю поміщують в ампліфікатор і запускають програму ампліфікації (контроль температури в термоблоці ампліфікатора повинен здійснюватися в режимі активного реагування температури): 94 ° С – 3 хв; 35 циклів, що включають: 94 ° С (денатурація) – 40 с, 58 ° С (відпал праймерів) – 30 с, 72 ° С (елонгація) – 40 с; 72 ° С 4 хв.

10. Після закінчення ампліфікації пробірки витягують з ампліфікатора, поміщають в штатив і переносять в зону для електрофорезу продуктів ПЛР. ПЛР-продукти (амплікони) можна використовувати в інших практичних роботах і зберігати протягом 1-2 тижнів при - 18 ° С.

11. Детекцію результатів ПЛР проводять за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

12. Отримані результати реєструють візуально або за допомогою відеосистеми.

Питання до самоконтролю:

1. Скільки хромосом містить прокариотична клітина?

1) 0

2) 1

3) 2

4) 3

2. Яка функція прокариотичної клітини є дуже обмеженою?

1) утворювати спори

2) реплікація ДНК

3) реплікація РНК

4) здатність виділяти і поглинати великі молекули

3. Від еукаріотів прокариоти відрізняються:

1) наявністю пластидів

2) меншими розмірами рибосом

3) наявністю клітинного ядра

4) подвійною клітинною оболонкою

4. Від еукаріотів прокариоти відрізняються:

Розділ 1

- 1) відсутністю хлоропластів
- 2) наявністю клітинного ядра
- 3) наявністю рибосом
- 4) відсутністю вакуолей

5. Від еукаріотів прокаріоти відрізняються:

- 1) відсутністю хромосом
- 2) відсутністю клітинної оболонки
- 3) відсутністю мітохондрій
- 4) відсутністю рибосом

6. Від еукаріотів прокаріоти відрізняються тим, що:

- 1) Організм може бути представлений однією клітиною
- 2) Організм може бути представлений лише однією клітиною
- 3) Клітини представлені різними формами
- 4) Клітинний цикл представлений як мітозом, так і мейозом

7. Від еукаріотів прокаріоти відрізняються тим, що:

- 1) клітинний цикл представлений лише мітозом
- 2) клітинний цикл представлений лише мейозом
- 3) організм може бути представлений однією клітиною
- 4) здатні виділяти і поглинати великі молекули

8. Який вигляд має молекула ДНК прокаріотів?

- 1) Суперспіралізована молекула
- 2) Має форму «конюшинового листка»
- 3) Видовженої палички
- 4) Безперервного кільцевого тяжа

9. Як називаються позахромосомні ДНК-вмісні елементи бактеріальної клітини?

- 1) сферосоми
- 2) плазміди
- 3) нуклеуси
- 4) пластиди

10. З яких сполук складається плазматична мембрана прокаріотичної клітини?

- 1) вуглеводи і мінеральні солі
- 2) вуглеводи і органічні солі

3) фосфоліпіди

4) ліпіди та білки

1.7. Структура геному еукаріотів



1.7.1. Характеристика генів еукаріотів. *Ген еукаріотів* – це сукупність сегментів ДНК, які утворюють одиницю, що експресується. В результаті експресії утворюється один або кілька функціональних генних продуктів – РНК або поліпептидів. Кожен ген містить один або кілька сегментів ДНК, що відповідають за регуляцію транскрипції, а значить і за регуляцію експресії генів та кодуючі ділянки, які кодують певний поліпептид, функціональну РНК або їхні складові. Ті сегменти ДНК, з яких не транскрибується ніякий генний продукт, називаються некодуючими. Одні некодуючі області (наприклад, регуляторні сигнали, вставні послідовності, які переривають ген) є складовими частинами генів. Інші ділянки, які мають відношення до реплікації ДНК або виконують якісь поки що невідомі функції, знаходяться між генами.

Здатність клітин вмикати (активувати) або вимикати (інгібувати) структурні гени вкрай важлива для підтримання клітинної специфічності та економної витрати енергетичних ресурсів.

Псевдогени – це ділянки геному, близькі в структурному відношенні до специфічних функціонально активних генів, але не є їх алельними формами і не кодують ніяких функціональних генних продуктів. У деяких псевдогенів у регуляторній або кодуючій області, або в обох наявні мутації. Інші псевдогени мають дефектні стоп-кодони або містять лише частину кодуючої та регуляторної областей.

Процесовані псевдогени – це підклас псевдогенів з певною локалізацією і

Розділ 1

структурою. Як правило, вони не зчеплені з відповідним функціонально активним геном, а розсіяні по всьому геному, в тому числі і по різних хромосомах. За своєю структурою вони більше схожі на ДНК копії мРНК, ніж на гени. Вони не містять вставних послідовностей, які є у функціонально активних генах.

Деякі особливі типи послідовностей

Прямі повтори – це повторювані послідовності, орієнтовані в однаковому напрямку в молекулі ДНК. Вони розміщені «голова до хвоста». Розмір їх від двох до тисяч пар основ.

Зворотні (інвертовані) повтори, або повтори розміщені «голова до голови» або «хвіст до хвоста» - це повторювані послідовності, зорієнтовані в протилежних напрямках.

Якщо інвертований повтор наявний в одному з ланцюгів дволанцюгової ДНК, то такий самий повтор, але в протилежному напрямку, є і в комплементарному ланцюгу.

Одноланцюгова ДНК або РНК, які містять зворотні повтори, розділені 3-4 основами, можуть утворювати внутрішньо-молекулярну дволанцюгову структуру. Якщо відстань між зворотніми повторами досить велика, то при утворенні дуплексу може сформуватися одноланцюгова петля.

Якщо ж повтори розділені незначною кількістю нуклеотидів, то одностричковий ланцюг ДНК утворює дволанцюгову структуру – шпильку.

Деколи повтори знаходяться в межах однієї структурної одиниці (напр., сайти впізнавання для рестриктаз), тоді відповідна послідовність називається **паліндромом**.

1.7.2. Гени, що кодують РНК. Гени рРНК. У більшості еукаріотичних геномів рибосомні гени присутні у вигляді протяжних тандемних повторів і характеризуються підвищеним вмістом СС-пар порівняно з геномом у цілому.

рРНК локалізується в певному місці хромосоми - ядерцевому організаторі. Тут

Клітинна і молекулярна біологія

відбувається транскрипція рДНК і процесинг пре-рРНК. Гени рРНК присутні в еукаріот у вигляді сотень копій, тоді як гени рибосомних білків - низькокопійні. В геномі міститься від 1 до 10 функціонально активних генів для кожного рибосомного білка; виявлені також процесовані псевдогени.

Як правило, кодуєчі області 188, 5,88 і 288 рРНК еукаріот згруповані в указаному порядку в одну транскрипційну одиницю. Всі три рРНК утворюються з одного довгого попередника в результаті процесингу, що включає розщеплення РНК ендонуклеазами і метилювання нуклеотидів і 2' - гідроксильних груп. Повна транскрипційна одиниця містить 2 некодуєчих спейсери, які розділяють три кодуєчі області, а також має некодуєчі ділянки перед першим геном 188 рРНК і за останнім 288 рРНК.

Гени 58 рРНК зчеплені з генами 188, 5,88 і 288 рРНК. Оскільки гени 58 рРНК транскрибує РНК-полімераза III, то частина їх внутрішніх кодуєчих послідовностей функціонує як регуляторний елемент. Гени 58 рРНК, довжина яких 120 нуклеотидів, не перериваються ніякими інтронами. Гени 58 рРНК багаторазово повторюються й утворюють родини довгих тандемних повторів.

Гени тРНК транскрибуються, як і 58 рРНК, РНК- полімеразою III. При цьому промотор теж розміщений всередині кодуєчої послідовності. Одні гени тРНК містять інтрони, інші - ні. Перервні і неперервні гени можуть бути в одного і того ж виду. Як правило, інтрони генів тРНК короткі, не більше 45 п.н. і завжди знаходяться з 3' -кінця від антикодонової послідовності.

Гени тРНК теж присутні у великій кількості копій. Але, на відміну від рДНК, вони не мають строгої впорядкованості у розташуванні і розміщені без особливого порядку. Вони можуть розміщуватись «по сусідству» або ні; розміщуватися в одному кластері, або в різних.

Всі еукаріотичні клітини містять багато коротких стабільних молекул РНК, більшість

Розділ 1

яких у складі РНП частинок присутні в ядрі або в цитоплазмі. Деякі з мРНК (Ш-Г17) відіграють ключову роль у процесингу пре-рРНК і пре-мРНК. Функції мцРНК, за винятком 75Б-РНК, яка є сигналом впізнання, невідомі. 75Б-РНК беруть участь у переносі новосинтезованих поліпептидів.

У геномі є гени, що кодують Ш, 112, Ш, 114, 115, 116, Ш- мРНК. Вони можуть бути дисперговані або згруповані переважно в тандемні повтори.

1.7.3. Гени, що кодують білки. Гени, що кодують білки, як правило, містять кодуючі області екзони і некодуючі – інтрони. Та деякі, наприклад, гістонові гени, не мають вставних послідовностей. Кількість таких послідовностей сильно варіює від гена до гена, а кількість ДНК, що припадає на долю інтронів, в багато разів перевищує кількість ДНК кодуючих ділянок у деяких організмів в десятки разів. Нуклеотидні послідовності екзонів консервативніші, ніж послідовності інтронів. Усі відомі гени, що кодують білки транскрибуються РНК-полімеразою II і тому часто мають подібні промотори і сигнали поліаденілювання. На відміну від генів, які кодують РНК, поліпептидні гени представлені в геномі в однині, однак при цьому геном часто містить сегменти, гомологічні до даного специфічного гена. Отже, однокільний ген може входити до складу родини близькоспоріднених послідовностей (наприклад, у родину генів гормону росту). Члени такої родини можуть кодувати незначно відмінні білки, наприклад ізозими. Проте вони можуть мати різні регуляторні сигнали, відповідальні за експресію генів у різних тканинах або на різних стадіях розвитку.

Одним з найважливіших висновків геномної організації є те, що родинні послідовності ДНК часто утворюють тандемні повтори. Геноми, як правило, містять багато **транспозонів**. Вперше ці елементи були виявлені в геномі кукурудзи. Найкраще вивчені

Клітинна і молекулярна біологія

транспозони у дрізофілі, тут їх виявлено =30 типів. Довжина цих транспозонів коливається від 2000 до 10 тис. нуклеотидних пар; більшість з них присутня в геномі в кількості 5-10 копій на диплоїдну клітину. Ці елементи можуть переміщуватись у геномі. Деякі елементи переміщуються в геномі у вигляді ДНК, але є такі, у яких цей процес включає утворення проміжного продукту (в його ролі виступає РНК). У будь-якому випадку транспозони здатні розмножуватися, вирізатися з якихось сайтів і вбудовуватися в інші; їх поведінку можна назвати паразитичною. На долю транспозонів припадає приблизно 10% геномної ДНК вищих еукаріот. Більшість цих елементів переміщується лише зрідка, та оскільки їх кількість у клітині велика, то вони суттєво впливають на різноманітність видів.

1.7.4. Організація генів еукаріотів. В еукаріотів для транскрипції використовуються три ДНК-залежних РНК-полімерази. Полімераза I локалізована в полісомі, де вона каталізує синтез рРНК у вигляді великого первинного транскрипту, що містить молекули рРНК 18S, 5,8S і 28S. Полімераза II знаходиться в нуклеоплазмі і, ймовірно, участі в синтезі первинного транскрипту мРНК. Полімераза III також локалізована в нуклеоплазмі і приймає участь в синтезі тРНК і 5S-рРНК.

Синтез РНК включає стадії ініціації, елонгації і термінації, але в цих процесах часто приймають участь інші ферменти і послідовності основ, ніж у прокаріот. Молекули мРНК зазвичай утворюються з великих за розміром молекул-попередників, які називаються гетерогенною ядерною РНК (гЯРНК). Для утворення зрілої мРНК ці молекули піддаються модифікації по 5'- і 3'-кінцями і сплайсингу. Після такої модифікації транскрипти переносяться з ядра в цитоплазму.

Сплайсинг гЯРНК – це видалення послідовностей РНК, відповідних інтронам ДНК, і з'єднання ділянок, які транскрибуються

Розділ 1

з кодуєть послідовностей (екзонів). Місце сплайсингу має бути визначено з високою точністю, оскільки помилка навіть в одну основу приведе до синтезу білка з неправильною амінокислотною послідовністю. Така специфічність сплайсингу забезпечується строго визначеною послідовністю основ в інтроні, що відповідає зазвичай основам GU або GA на початку відповідній РНК і основам AG – в кінці.

Модифікація 5'-кінця мРНК призводить до утворення особливої послідовності, званої кеп-структурою. При модифікації 3-кінця до нього приєднується послідовність poly (A) довжиною 150-200 нуклеотидів.

Процесинг тРНК у еукаріот відбувається по такому ж механізму, як і у прокаріотів. Функціонально активні молекули утворюються з довшого попередника, який піддається розщепленню і модифікації з включенням мінорних основ.

Процесинг рРНК також аналогічний відповідному процесу у прокаріот. Первинний транскрипт містить ділянки, що відповідають 18S-, 5,8S- і 28S-рРНК, розділені спейсерами. Як і у прокаріотів, ці три рРНК утворюються при розщепленні спейсерних послідовностей.

Трансляція в еукаріотів, що здійснюється в цитоплазмі, включає такі ж етапи, що і трансляція у прокаріот. Основною відмінністю тут є те, що першим залишком в зростаючого поліпептидного ланцюга є Met, а не fMet. Проте і в цьому випадку є два типи молекул тРНК, котрі що розпізнають кодон AUG: один – коли кодон ініціює, а інший – коли він кодує Met, який повинен бути приєднаний в середині зростаючої поліпептидного ланцюга. В ролі факторів ініціації і елонгації виступають різні білки. Ще одна істотна відмінність полягає в тому, що в цитоплазмі еукаріот рибосоми більш великі (80S).

У мітохондрій і хлоропластів трансляція здійснюється в самих цих органелах. Рибосоми, які вони містять, є 70S-частинки і схожі на

Клітинна і молекулярна біологія
рибосоми бактерій. При ініціації використовується fMet.

Клітини еукаріот влаштовані складніше, ніж клітини прокаріотів, і всі вони, за винятком гамет, містять дві абсолютно однакові копії геному; іншими словами, вони диплоїдні. Клітина нематоди містить ДНК приблизно в 40 разів, а клітина саламандри – в 40000 разів більше, ніж E. coli. У клітині людини ДНК приблизно в 700 разів більше, ніж в E. coli. Оскільки прийнято думати, що людина – це більш складний організм, ніж саламандра, доводиться зробити висновок, що на основі сумарного вмісту ДНК в клітині можна лише дуже приблизно судити про складність того чи іншого організму.

ДНК еукаріотів знаходяться в ядрі в вигляді набору окремих фрагментів, званих хромосом. Кожна хромосома може містити ДНК в кількості від 400 (дріжджі) до 28 000 т.п.н. (людина). Якби всю клітинну ДНК у формі простої подвійної спіралі витягнути в одну лінію, то вона мала б занадто велику довжину (1,74 м для клітини людини) і в такому вигляді не помістилася б в ядрі, тому хромосоми повинні представляти собою сильно конденсовані структури.

Віруси можуть містити як одно-, так і дволанцюгову ДНК, яка може бути як безперервною, так і складається з фрагментів. У деяких вірусів (наприклад, ВТМ, реовірус) генетичним матеріалом служить РНК, яка також може бути як одно-, так і дволанцюговою.

Число генів в різних організмах можна оцінити, виходячи з того, що середня довжина гена складає 1 т.п.н.

Упаковка ДНК в клітині включає в себе асоціацію свержспіральної ДНК з різними білками (гістонами), в результаті якої утворюється комплекс, званий хроматином. Хроматин в свою чергу утворює соленоїдоподібну структуру, з якою зв'язуються хромосомні структурні білки, комплекс, що вийшов в кінцевому рахунку називається хромосоною.

Розділ 1

Клітини еукаріотів використовують в якості генетичного матеріалу лише дволанцюгову ДНК. Структурні гени, функціонування яких тісно пов'язане зі специфічними послідовностями в молекулі ДНК, звані регуляторними ділянками, поділяються на незалежні гени, гени, що повторюються і кластери генів. В кодуючі послідовності цих генів можуть входити некуючі, що називаються **інтронами**. Крім того, між генами можуть перебувати ділянки ДНК з великим числом повторів (сателітної ДНК) і спейсерної ДНК, транскрибуємої або нетранскрибуємої.

Незалежні гени – це гени, транскрипція яких, як і у прокаріотів, не пов'язана з транскрипцією інших генів в рамках транскрипційної одиниці. Їх активність може, однак, регулюватися екзогенними речовинами, наприклад гормонами. Повторювані гени присутні в хромосомі у вигляді повторів одного гена. Ген рибосомної 5S-РНК повторюється багато сотень разів, причому повтори розташовуються тандемом, т. т. слідують впритул один за одним, без проміжків. Близькі до нього в функціональному відношенні гени 5,8S-, 18S- і 28S-рРНК також присутні у вигляді численних повторів, але локалізовані в ядерцеву ДНК.

Кластери генів – це локалізовані в певних ділянках (локусах) хромосоми групи різних генів з родинними функціями. кластери теж часто присутні в хромосомі у вигляді повторів. Наприклад, кластер гістонових генів повторюється в геномі людини 10-20 разів, утворюючи тандемну групу повторів.

Інтрони – це ділянки ДНК, що розбивають частину генів, яка експресує (кодує) на ділянки, названі екзонами. Вперше феномен існування переривчастих генів був відкритий при вивченні аденовірусу і підтвердився в 1977 р при дослідженні гена глобіну миші і рибосомних генів плодової мушки *Drosophila melanogaster*. В одному гені може перебувати досить багато інтронів; наприклад, ген яєчного альбуміну курки

Клітинна і молекулярна біологія

містить 8 інтронів, загальна довжина яких перевищує суму всіх послідовностей, що кодується в цьому гені. В процесі транскрипції РНК-полімераза знімає копію зі всього гена. Потім спеціальні сплайсинг-ферменти здійснюють «монтаж» (сплайсинг) транскрипта, т. е. вирізають інтрони і «склеюють» екзони один з одним, в результаті чого утворюється зріла, але ще немодифікована мРНК. Щоб подібний «монтаж» міг здійснитися, на межах інтронів з екзонами в ДНК повинні бути особливі нуклеотидні послідовності.

Сателітна ДНК складається з володіючих характерними особливостями нуклеотидних послідовностей (їх довжина може становити від 10 до 200 нуклеотидів), які розташовані тандемно і сотні раз повторюються. Функція цієї ДНК поки не виявлена.

1.7.5. Регуляція експресії генів. Еукаріотичні організми значною мірою представлені багатоклітинними формами з високою спеціалізацією клітин. Хоча у всіх клітинах людини міститься абсолютно однакова ДНК, в різних тканинах відбувається експресія далеко неоднакових наборів генів. Таким чином, повинні існувати якісь механізми, за участю яких одні гени працюють (т. т. експресуються), а інші ні. Для цієї мети використовується цілий ряд механізмів: регуляція на рівні транскрипції і на рівні трансляції, посттранскрипційна і посттрансляційна регуляція і регуляція за допомогою гормонів.

Регуляція на рівні транскрипції здійснюється при синтезі мРНК. Середні концентрації індивідуальних мРНК, що транскрибуються з різних генів, сильно відрізняються один від одного. Це обумовлено тим, наприклад, що мРНК-копії одних генів руйнуються швидше за інші, або тим, що їх синтез відбувається повільніше. Регуляція може здійснюватися за допомогою білків, здатних зв'язуватися з ДНК, і навіть за

Практичний блок**Аналіз ДНК методом електрофорезу в агарозному гелі**

Розділ 1
допомогою коротких фрагментів РНК, які зпарюються з ДНК, імовірно блокуючи місця прикріплення РНК-полімерази. Таким чином швидкість транскрипції може знижуватися або, навпаки, підвищуватися. Посттранскрипційна регуляція здійснюється на рівні процесингу мРНК. Навіть в тому випадку, якщо транскрипція двох різних генів проходить з однаковою швидкістю, подальший процесинг мРНК, що включає модифікацію 5'- і 3'- залишків і сплайсинг екзонів, може протікати по-різному у різних мРНК.

Регуляція на рівні трансляції здійснюється за рахунок того, що виключається можливість використання мРНК як матриці для синтезу білка, хоча вона і є присутньою в цитоплазмі. Лише після цього молекули мРНК піддаються модифікації, т. е. «набувають» шпильки на 5'-кінці (так званий кеп, або «шляпачку») і «шлейф» з poly (A) на 3'-кінці, і можуть далі включатися в нормальний трансляційний процес, який завершується побудовою молекули білка.

Посттрансляційна регуляція заснована на тому, що багато білків синтезуються в неактивній формі і повинні ще пройти стадію модифікації. Так, в р-клітинах підшлункової залози синтезується інсулін як такий, а його попередник, поліпептидний ланцюг якого довший за інсуліновий і тримає ще деяку додаткову послідовність амінокислотних залишків. Лише після того як ця послідовність вирізається протеолітичним ферментом, виходить власне гормон в своїй функціональній формі. Таким чином, виробництво активного гормону може регулюватися посттрансляційним шляхом через регуляцію активності протеолітичного ферменту.

Мета роботи. Ознайомитися з методом горизонтального електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

Принцип методу. Метод заснований на міграції зарядженої молекули ДНК під дією електричного поля.

Матеріали і обладнання:

1. Прилад для горизонтального електрофорезу.
2. Джерело постійного струму.
3. Електрична плитка або СВЧ-піч.
4. Гель документуюча відеосистема.
5. Автоматичні дозатори змінного обсягу з наконечниками.
6. Колба мірна місткістю 1 л.
7. Колба конічна місткістю 0,5 л.
8. Циліндр мірний місткістю 250 мл.
9. Кристалізатор.
10. Набір реагентів для електрофорезу включає: суміш для приготування електродного буфера; навішення агарози; розчин броміду етидія; розчин фарби-лідера (бромфеноловий синій).
11. Проба досліджуваної ДНК.
12. ДНК-маркер молекулярних мас.
13. Рукавички гумові або латексні непудрені.
14. Теплоізолююча рукавиця.
15. Вода дистильована.

Хід роботи

Приготування робочого буферного розчину для електрофорезу. Вміст пакету «Буфер для електрофорезу» повністю переносять в мірну колбу, розчиняють в 600-800 мл дистильованої води (для більш швидкого розчинення слід підігріти розчин до 40-45 °С при постійному помішуванні) і доводять обсяг отриманого розчину до 1 л дистильованою водою.

Підготовка приладу для електрофорезу до роботи. Користуючись вбудованими рівнями і

Розділ 1

гвинтовими ніжками, прилад встановлюють горизонтально. У робочу камеру наливають буфер для електрофорезу. Для формування гелевої пластини збирають кювету, в неї поміщають аплікатор (гребінку) для формування лунок в товщі гелю. Регульовану висоту аплікатора виставляють таким чином, щоб відстань від дна кювети до кожного з зубців становило 1-2 мм. Залежно від числа аналізованих проб одночасно можна встановити одну, дві або три гребінки.

Приготування агарозного гелю. Наважку агарози, необхідну для приготування 1% -ного гелю, повністю переносять в конічну скляну колбу місткістю 250-500 мл, додають 150 мл робочого розчину буфера для електрофорезу і перемішують. Суспензію агарози в колбі доводять до кипіння в СВЧ-печі або на електроплитці, періодично помішуючи (колбу тримати, тільки надівши на руку теплоізолюючу рукавицю). Продовжують нагрівання до тих пір, поки вміст колби не стане абсолютно прозорим (зазвичай ще 1 хв). Розплав охолоджують до 55-60 ° С, додають 10мкл розчину броміду етидія, перемішують (роботу проводять в латексних або гумових рукавичках) і наливають на столик для заливки гелю, не допускаючи утворення повітряних бульбашок, так, щоб товщина шару була не менше 5 мм, а зубці гребінки були занурені в гель не менше ніж на 4 мм. Гель повністю застигає через 15-20 хв.

Столик з готовим агарозним гелем і гребінками переносять в камеру для електрофорезу, в яку наливають робочий розчин буфера для електрофорезу так, щоб покрити гелеву пластину шаром в 2-3 мм. Витягають гребінки з агарозного гелю легким і плавним рухом вгору, намагаючись не пошкодити утворені лунки.

Проведення електрофорезу. В лунки застиглому агарозного гелю (під шар буфера!) Обережно вносять по 3 мл. розчину досліджуваних зразків ДНК. У сусідню лунку гелю вносять 3 мкл маркера молекулярних мас фрагментів ДНК. В одну або дві (по краях

Клітинна і молекулярна біологія

пластини гелю) вільні лунки вносять 2-3 мкл фарби-лідера. Закривають кришку приладу для електрофорезу і підключають його до джерела постійного струму, суворо дотримуючись полярності електродів і враховуючи, що рух фрагментів ДНК відбувається в напрямку від катода до анода (від «мінуса» до «плюса»). На вольтметрі джерела постійного струму встановлюють напругу 120-150 В. У такому режимі процес електрофорезу продовжують близько 30 хв, орієнтуючись на фронт пробігу фарби-лідера (приблизно на 3 см). Після закінчення електрофорезу джерело напруги відключають, знімають кришку приладу, пластину агарозного гелю обережно переносять на світлофільтр (оглядовий столик) УФ-трансілюмінатора для детекції (роботу проводять в рукавичках!). Включають трансілюмінатор. Зони ДНК, пофарбовані бромідом етидія, світяться при УФ-опроміненні.

Увага! Щоб уникнути пошкодження сітківки очей ультрафіолетовим випромінюванням спостерігати зони ДНК слід тільки через захисне скло з комплекту трансілюмінатора або захисні (скляні) окуляри.

Отримані результати реєструють візуально або з використанням геледокументувача відеосистеми, користуючись інструкцією до неї.

Питання до самоконтролю:

- Для якої групи організмів характерна мозаїчна будова кодуєчої частини генів (екзон - інтрон)?
 - 1) віруси
 - 2) прокаріоти
 - 3) археї
 - 4) еукаріоти
- Які гени мають назву унікальних?
 - 1) наявні в одній послідовності
 - 2) представлені в геномі єдиною копією
 - 3) зустрічаються лише в певних організмах
 - 4) містяться в різних парах хромосом

Розділ 1

3. Повторювані послідовності, орієнтовані в однаковому напрямку в молекулі ДНК мають назву:

- 1) паліндроми
- 2) інтрони
- 3) прямі повтори
- 4) псевдогени

4. Ділянки геному, близькі в структурному відношенні до специфічних генів, але не кодують ніяких функціональних генних продуктів, мають назву:

- 1) оперони
- 2) псевдогени
- 3) інтрони
- 4) екзони

5. Де вперше були виявлені транспозони?

- 1) у дрозоді
- 2) у кукурудзи
- 3) у гороху посівного
- 4) у пшениці

6. Яким є середній розмір інтрона?

- 1) 1000 пар основ
- 2) 2000 пар основ
- 3) 3400 пар основ
- 4) 5000 пар основ

7. Скільки білків кодує хлоропластний геном?

- 1) до ~100
- 2) до ~200
- 3) до ~1000
- 4) до ~5000

8. Що таке інтрони?

- 1) антикодонаві ділянки РНК
- 2) некодуючі ділянки генів
- 3) ділянки генів, що кодують білок
- 4) елементи, що можуть переміщуватись у геномі

9. Що таке цистрон?

- 1) нуклеотидна послідовність, що кодує лише один білковий ланцюг

Клітинна і молекулярна біологія

- 2) елемент клітини, здатний до самоподвоєння
- 3) нуклеотидна послідовність, що кодує декілька білкових ланцюгів
- 4) елемент геному, що складається з некодуючих послідовностей

10. Еукаріоти відрізняються від прокаріотів:

- 1) наявністю клітинної мембрани
- 2) наявністю пластид
- 3) наявністю хромосом
- 4) наявністю рибосом

Література

1. Рис Э., Стенберг М. Введение в молекулярную биологию. От клеток к атомам Москва : Мир, 2002. 142 с.

2. Карапетьян О.Ш., Вечканов Е.М., Сорокина А.И. Учебно-методическое пособие к проведению лабораторных работ и контроля самостоятельной работы студентов по молекулярной биологии. Ростов-на-Дону, 2015. 116 с.

3. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: підручник. К : Київський університет, 2008. 384 с.

4. Новак В.П., Мельниченко А.П. Цитологія, гістологія, ембріологія. Біла Церква : Білоцерківський державний аграрний університет, 2005. 250 с.

5. Новак В. П., Пилипенко М. Ю., Бичков Ю. П. Цитологія, гістологія, ембріологія. Київ : ВІРА-Р, 2001. 302 с.

6. Явоненко О. Ф., Яковенко Б. В. Біохімія : навч. посібн. Суми : Університетська книга, 2002. 383 с.

7. Біологічна хімія / Л. М. Вороніна та ін. Харків : «Основа», 2000. 608 с.

8. Марченко М. М., Копильчук Г. П. Біохімія інформаційних макромолекул. Чернівці : Рута, 2003. 344 с.

9. Хелдт Ганс-Вальтер Биохимия растений Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 473 с.

10. Огурцов А.Н. Основы молекулярной биологии: учебное пособие в двух частях. Часть 1: молекулярная биология клетки Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. 303 с.

11. Кандиба Н.М. Генетика: курс лекцій: навч. посібн. Суми : Університетська книга, 2013. 398 с.

12. Губський Ю. І. Біологічна хімія. Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. 508 с.

13. Гудзь С. П., Перетятко Т. Б., Павлова Ю. О. Загальна вірусологія. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 264 с.

Клітинна і молекулярна біологія

14. Біохімія. Сучасна термінологія (тлумачний словник) Д. О. Мельничук та ін. Київ : ЦП «КОМПРИНТ», 2011. 409 с.

15. Березин И. В., Савин Ю. В. Основы биохимии. Москва : Изд-во Московского университета, 1990. 256 с.

16. Keith Wilson, John Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Cambridge university press. 2009. 761 p.

17. Великов А.В. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов : Издательский центр «Наука». 2013. 85 с.

18. Титова Н.М. Биохимия и молекулярная биология. Красноярск : ИПК СФУ, 2008. 103 с.

19. 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 : ЛНУ ім. Івана Франка. 2005. 282 с.

20. Robert Schleif. Genetics and Molecular Biology. The Johns Hopkins University Press : Baltimore and London, 1993. 715 p.

21. Шлык-Кернер О.В. Основы генетической инженерии. Лабораторный практикум. Ижевск : «Удмуртский университет», 2012. 56 с.



2

Генетична інженерія



Генетична інженерія (грец. *genesis* — походження) - напрям науки на межі молекулярної біології, молекулярної генетики, біотехнології тощо, метою якого є створення організмів із новими комбінаціями спадкових ознак, у т.ч. і таких, які не виявляють у природі.

Це здійснюється шляхом спрямованого перенесення людиною конкретних генів або їх комплексів з одного організму в інший, закріплення цих генів у новому генетичному оточенні та забезпечення їх вираження у певній генетичній системі, хімічним синтезом гена шляхом поєднання нуклеотидів ДНК у певній послідовності; ферментативним синтезом ДНК на матрицях інформаційної РНК за допомогою зворотної транскриптази; фрагментуванням тотальної ДНК клітини і подальшим вибором фрагментів; одержанням або створенням векторних молекул - молекул ДНК, здатних приєднувати фрагменти молекул ДНК будь-якого походження, проникати у клітини і розмножуватися у них в автономному або інтегрованому стані. Генетична інженерія покликана вирішувати фундаментальні наукові завдання, пов'язані зі структурою та організацією геномів, а також з особливостями функціонування їх у різних організмах, і має **завдання** прикладного характеру: розроблення нових методів створення високопродуктивних штамів - продуцентів мікроорганізмів, сортів рослин і порід тварин, а в перспективі - гемотерапія спадкових захворювань людини.

Дослідження з генетичної інженерії почали інтенсивно розвиватися у 70-ті роки ХХ ст.

Серед **практичних досягнень** найважливішими є створення продуцентів біологічно активних білків - інсуліну, інтерферону, гормону росту тощо, а також

розроблення способів активізації ланцюгів обміну речовин, пов'язаних з утворенням низькомолекулярних БАС. Таким чином отримано продуценти деяких антибіотиків, амінокислот, вітамінів, що у багато разів ефективніші порівняно з виведеними за допомогою традиційних методів генетики і селекції. Генетична інженерія розробляє способи отримання суто білкових вакцин проти вірусів гепатиту, грипу, герпесу, ящура. Реалізована ідея використання для вакцинації комбінованого вірусу вісповакцини, в геном якого вбудовані гени, що кодують синтез білків інших вірусів (напр. вірусів гепатиту або грипу).

2.1.1. Загальна характеристика ферментів, їх класифікація. *Клітина* - цілісна система, складові частини якої структурно і функціонально взаємопов'язані. Ця залежність виражається, перш за все, у генетично обумовленому синтезі білкових молекул - ферментів.

У цитоплазмі знаходяться всі *ферменти гліколізу*, в матриксі мітохондрій - *ферменти циклу Кребса і Р- окиснення жирних кислот*, *ферменти окиснювального фосфорилування* - у внутрішній мембрані мітохондрій.

Ферменти складають основну масу клітинних білків. На частку одного фермента припадає від сотень часток відсотка (у деяких вірусів) до 10-15% (*E.coli*). У той же час хромосомна ДНК не є простою послідовністю багаточисельних генів.

Тому не слід вважати, що кількість хромосомної ДНК, наприклад, у представників еукаріотичних організмів пропорційна рівню їх еволюційного розвитку. Бо інакше нижчі тварини були б більш розвинуті, ніж людина, так як в них розмір геному досягає 10^{10} - 10^{11} пн, у ссавців же та людини - на 1-2 порядки нижче (10^9 - 10^{10} пн). Суть полягає в тому, що у високорозвинутих істот значна частина ДНК є мовчазною, тому що вона утворена не генними послідовностями (у людей до цього типу

Розділ 2

відноситься 80 - 90% всієї ДНК) або багаточисельними повторами ідентичних послідовностей, все це відображається на ферментному наборі в клітинах, органах і тканинах, як і на їх функціональній активності.

Ферменти давно є об'єктом біотехнології - їх індустрія зародилася на початку ХХ ст. й об'єми ферментного виробництва продовжують наростати.

Наука, яка вивчає ферменти - ензимологія.

До ферментів позаклітинного типу відносяться **мікробні амілази, ліпази і пептид-гідролази**, які каталізують реакції гідролізу відповідно крохмалю, ліпідів та білків. **Тваринна протеаза (пепсин)** умовно також може бути зарахована до розряду позаклітинних, тому що вона надходить із відповідних клітин (головних клітин слизової шлунку) в порожнину шлунку; це можна сказати і про ферменти підшлункової залози, які надходять у дванадцятипалій відділ тонкої кишки.

Молекулярні маси (ММ) ферментів досить великі та знаходяться в межах від 12 до декілька тисяч кілодальтон (кДа). Ферменти з ММ більше від 100 кДа представлені двома і більше субодинацями.

Згідно з класифікацією (КФ) ферменти діляться на шість головних класів, кожний із яких включає підкласи та під підкласи:

I. **Оксидоредуктази (КФ.1)** - каталізують окиснювально-відновні реакції;

II. **Трансферази (КФ.2)** - каталізують реакції; переносу функціональних груп (фосфатних, ацильних, глікозильних, альдегідних тощо);

III. **Гідролази (КФ.3)** - каталізують реакції гідролізу (перенос функціональних груп на молекулу води);

IV. **Ліази (КФ.4)** - каталізують реакції приєднання та відщеплення з відповідним насиченням та ненасиченням;

V. **Ізомерази (КФ.5)** - каталізують реакції ізомеризації, тобто перенос в середині молекулярних груп з утворенням ізомерних

форм;

VI. **Ліази (КФ.6)** - каталізують реакції утворення зв'язків С-С, С-S, С-О і С-N, спряжені з використанням енергії АТФ та інших нуклеотидтрифосфатів.

Підклас і під підклас ферментів відповідно позначають другими та третіми числами, порядковий номер фермента - четвертим числом у його підкласі.

Класифікація й номенклатура ферментів має універсальне значення, тобто вони застосовані для всіх ферментів, незалежно від джерела їх одержання.

Разом з тим, діапазон реакцій, які каталізує РНК, ще недостатньо великий, щоб вказане вище спростування прийняти на «конкурентний рахунок». На відміну від не біологічних каталізаторів ферменти високоспецифічні. Вони мають активні центри, значна частина їх проявляє свою активність у присутності коферментів небілкової природи.

Кінетичні характеристики ферментів, які визначають активність і тривалість роботи у різних умовах, є важливими показниками.

Слід відмітити, що *in vivo* інактивація й активація ферментів як і синтез їх *denovo* або *denuo* (від лат.- заново), регулюється самим організмом. Крім того, в організмі (клітинні, тканинні) є ще багато ферментів у зв'язаному стані. Очевидно, що при цьому їх конформації більшою чи меншою мірою змінюються, що важливо для клітини з функціональної точки зору.

Швидкість реакції залежить від концентрації субстратів. Коли фермент насичений субстратом, він не може функціонувати швидше - це і є максимальна швидкість реакції (*v_{max}*), тобто частка вільного ферменту виявляється гранично низькою.

Загальна швидкість ферментної реакції повинна бути пропорційною концентрації **фермент-субстратного комплексу ES** (E - ензим, S - субстрат). Залежність швидкості ферментної реакції від концентрації субстрату графічно виражається **гіперболічною кривою** (рис.2.1.2).

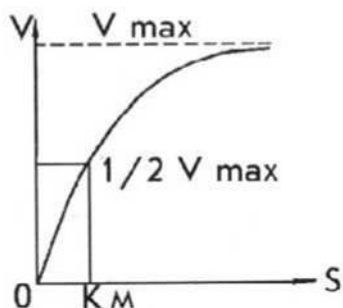


Рис. 2.1.1. Залежність швидкості (V) ферментної реакції від концентрації субстрату (S).

K_m на рисунку є **константа Міхаеліса - Ментена**, тобто концентрація специфічного субстрату, при якій конкретний фермент забезпечує швидкість реакції, яка дорівнює половині V_{max} .

Аналіз кінетики всіх ферментних реакцій проводиться на основі **математичного рівняння Міхаеліса-Ментена**:

$$V_0 = V_{max} [S] : K_m + [S],$$

де V_0 - початкова швидкість при концентрації S , v_{max} - максимальна швидкість і K_m - константа Міхаеліса-Ментена для даного фермента.

Часто рівняння Міхаеліса - Ментена модифікують у **рівняння зворотних величин Лайнуївера - Берна**:

$$1 : V_0 = (K_m : V_{max} \cdot 1 : [S]) + 1 : V_{max}$$

Згідно з цим рівнянням, на графіку, побудованому на осі зворотних координат, можна більш точно визначити V_{max} (рис. 2.1.2).

На основі взаємодії ферментів і специфічних їм субстратів, а також враховуючи багаточисельність ферментних реакцій у клітині або в організмі і, нарешті, беручи до уваги інші взаємодії в біосистемах (антиген - антитіла, токсини та їх рецептори тощо), можна говорити про **комплементарність** як основу біологічної специфічності.

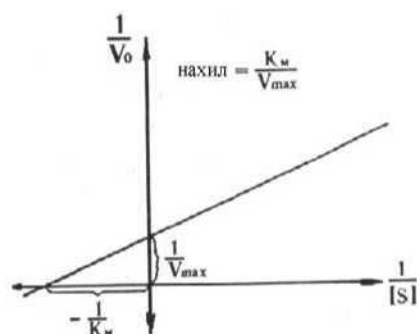


Рис. 2.1.2. Графік подвійних зворотних координат

У більшості випадків має місце **молекулярна комплементарність**. Такі взаємодії здійснюються за законами термодинаміки.

Відомі взаємодії ферментів з окремими речовинами, які викликають пониження або повне пригнічення активності біокаталізаторів. Речовини, які пригнічують ферментні реакції, називають **інгібіторами**. Вони вибірково взаємодіють з ферментами. Наприклад, **ціаніди, оксид карбону** інгібують окремі окиснювально-відновні ферменти; **йодацетатамід, арсенітні солі** блокують тіолові ферменти; **аміни, гідразиди** взаємодіють з карбонільною групою ферментів і, як наслідок, інгібують їх активність.

Всі інгібітори діляться на **зворотні** та **незворотні**. Серед зворотних виділяють **конкурентні й неконкурентні**.

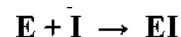
Зворотні інгібітори утворюють не міцні комплекси з ферментами $[EI]$, здатні розпадатися на вихідні компоненти:



Мірою інгібіції є та концентрація інгібітора, яка викликає пригнічення ферментної активності наполовину (I_{50}).

Чим більша величина I , тим сильніший інгібітор.

У випадку взаємодії **незворотних інгібіторів** комплекси $[EI]$ не розпадаються і реакція проходить лише вправо.



Конкурентний інгібітор зв'язується з активним центром фермента і, на відміну від фермент-субстратного комплексу, не піддається ферментній трансформації.

Розділ 2

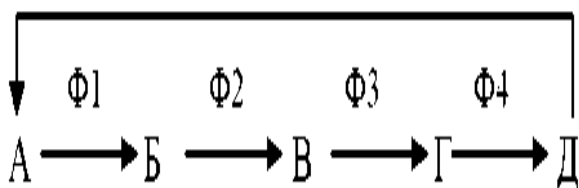
Таким чином конкурентний інгібітор виступає конкурентним субстратові за зв'язування з активним центром. Змінюючи концентрацію субстрата, можна витіснити із комплексу інгібітор. Прикладом конкурентного інгібітора сукцинат дегідрогенази є **малонат** (в нормі субстратом є сукцинат).

Неконкурентний інгібітор зв'язується не з активним центром, а в іншому місці білкової молекули. При цьому міняється конформація всієї молекули фермента, і, як наслідок, йде зворотна інактивація його каталітичного центра. Неконкурентні інгібітори взаємодіють із вільним ферментом та його фермент-субстратним комплексом:



Комплекси EI та ESI стають неактивними.

Отже, на роботу ферментів можуть впливати різні речовини, за допомогою яких регулюється їх біосинтез та активність. Каталітична активність і регуляція ферментів можуть проходити у формі **миттєвого зворотного зв'язку (Feedback inhibition)** з використанням **алостеричних ефекторів** невеликої молекулярної маси. Вони не мають подібності з субстратами чи коферментами і зв'язуються з алостеричними сайтами (неактивними центрами ферментів).



Це механізм грубого контролю регуляції активності ферментів. У наведеній схемі продукт Д здатний зв'язуватися з першим ферментом (Φ1) чи інгібувати його. Отже, Д - це **негативний алостеричний ефектор, або Feedback-інгібітор Φ1**. Наприклад, інгибування **триптофаном антранілсинтетази** у мікроорганізмів на шляху синтезу триптофану, де проміжним продуктом є **антранілова кислота**.

Розрізняють

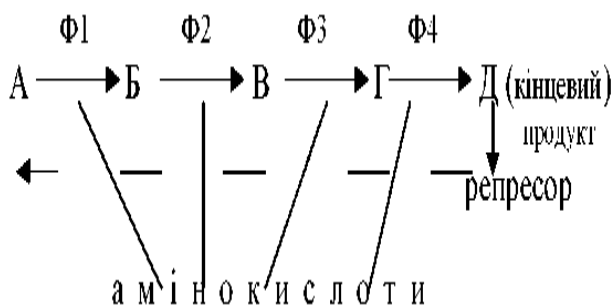
кумулятивну,

Генетична інженерія

мультивалентну й кооперативну Feedback-інгібіції.

У першому випадку два і більше кінцевих продукти інгібують адитивно один регуляторний фермент; у другому - два й більше кінцеві продукти є в надлишку і тільки за цих умов проходить повна інгібіція реакції; при кооперативній інгібіції єдиний кінцевий продукт (у надлишку) гальмує дію регуляторного ферменту.

На відміну від Feedback-інгібіції існує **Feedback-репресія**. Її суть полягає в тому, що похідне (**дериват**) кінцевого продукту (**репресор**) пригнічує утворення ферментів (але не впливає на їх активність) у даному метаболічному шляху:



В окремих випадках кінцевий або проміжний продукт використовується як активатор якого-небудь фермента. Це явище називається **алостеричною активацією, або Feedback-активацією**.

Поряд з грубою регуляцією активності ферментів за механізмом Feedback - інгібіції відомий тонкий контроль, в якому ферменти алостеричних білків містять не тільки каталітичні центри для зв'язування із субстратом, але й близько розташовані інші місця, з якими зв'язуються молекули ефекторів. Ефектор викликає конформаційні зміни у ферменті. При цьому спорідненість каталітичного центра ферменту до субстрату або зменшується - настає **алостерична інгібіція**, або, навпаки, зростає - настає **алостерична активація** (рис.2.1.3).

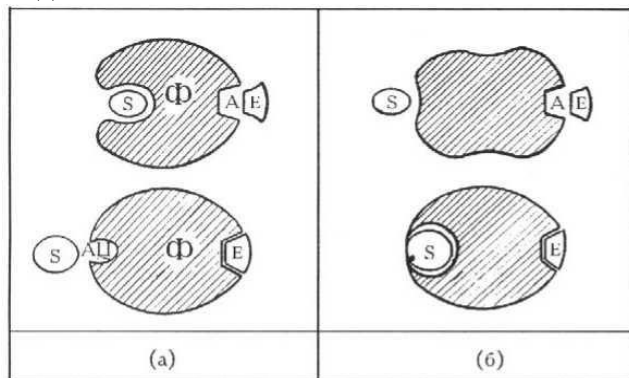


Рис. 2.1.3. Схематичне відображення модифікації активного центру (АЦ) ферменту (Ф) за допомогою ефектора (Е), що взаємодіє на алостеричному сайті (А); S- субстрат, а - алостеричне інгибування, б - алостерична активація.

Звичайно, для проведення генно-інженерних робіт з одержання того чи іншого матеріалу необхідно створити оптимальні умови ферментам рестрикції, модифікації, репарації.

2.1.2. Рестриктази, фактори модифікації та репарації. Характеристика і номенклатура рестриктаз. На початку 60-х років ХХ ст. в результаті досліджень Арбера відкриті та розшифровані явища рестрикції і модифікації ДНК. Арбер довів, що в клітинах бактерій, які обмежують розмноження фага X, синтезуються два ферменти. Один з них, позначений як *ендонуклеаза*, розщеплює чужорідну ДНК, що проникла в клітину. Другий, названий *метилазою*, яка модифікує прониклу ДНК шляхом метилювання декількох пар нуклеотидів, тим самим забезпечує стійкість ДНК до дії ендонуклеази. Арбер сформулював основні принципи *систем рестрикції - модифікації*, які, скоріш за все, утворилися в процесі еволюції для захисту від проникнення чужорідної ДНК. Досліди Арбера призвели до широкого пошуку ферментів рестрикції в інших бактерій та до розробки методів «нарізання» молекул ДНК на фрагменти, які відіграли вирішальну роль у розвитку генетичної інженерії.

Всі виявлені рестриктази були виділені із прокаріотичних мікроорганізмів. Однак, є

повідомлення про наявність цих ферментів також в еукаріотичних мікроорганізмів - дріжджів з роду *Saccharomycesma Pichia*.

Відомо більше 500 рестриктаз і для більшості з них визначені пізнавальні нуклеотидні послідовності. Ці ферменти є різновидністю *дезоксирибонуклеаз*, які гідролізують ДНК на довгі чи короткі відрізки і навіть на окремі нуклеотиди. *Рестриктази* здатні розпізнавати короткі нуклеотидні послідовності із 4-6 нуклеотидних пар (сайти пізнання) і розрізати міжнуклеотидні зв'язки тільки у чітко визначених ділянках молекули ДНК (рестриктах), індукуючи формування «тупих», або «липких» кінців.

Згідно з існуючою номенклатури, назва рестриктаз позначається літерами від родини мікроорганізму, з якого їх виділили та двох перших малих літер від назви виду продуцента ферменту. Наприклад, бактерія *Escherichia coli* записується скорочено Eco. Для ферментів, виділених із різних культур одного виду, в назву вводять літери позначення штаму та його номер: HgC, Vsu-1076 тощо.

У тих випадках, коли фермент кодується геном, розташованим у плазміді чи фазі, вказується ще символ хромосомного елемента, наприклад, назва EcoRI стосується ферменту, що кодується геном плазміді R1. Така рестриктаза розрізає нитку молекули ДНК між аденином та гуаніном у послідовності ГААТТ або ТТААГ; рестриктаза BamHI розрізає нитку ДНК в сайті ГГАТЦЦ. Якщо один штам містить декілька рестриктаз, які різняться за специфічністю, вони позначаються римськими цифрами: HinI, HinII, HinIII (табл.2.1.1).

Таблиця 2.1.1. Характеристика деяких рестриктаз

Назва фермента	Джерело одержання	Сайти пізнання у послідовностях ДНК
Aat II	Acetobacter aceti	5'-ГАЦГТ/Ц-3'
Acc I	Acinetobacter calcoaticus	5'-ГТ/(А,Ц) ¹ (Г,Т)-АЦ-3'
Alu I	Arthrobacter luteus	5'-АГ/ЦТ-3'
Ava I	Anabaena variabilis	5'-Ц/ПіЦГПу ² Г-3'
Ava II	Anabaena variabilis	5'-ГТ/(А,Т)ЦЦ-3'
Bal I	Brevibacterium flbidum	5'-ТТГ/ЦЦА-3'
Bam HI	Bac.ameloligutfaciens H	5'-Г/ТАТЦЦ-3'
Ban II	Bac.aneurinolyticus	5'-ГПуГЦПі/Ц-3'

Розділ 2

Bcl I	Bac.caldolyticus	5'-T/GATCT-3'
Bgl I	Bac.globigii	5'-THUNNN ³ /Nrr4-3'
Bgl II	Bac.globigii	5'-A/GATCG-3'
Bst EII	Bac.stearothermophilus ET	5'-Г/ШАЦЦ-3'
Cla I	Caryophanon latum L	5'-AT/ЦГАТ-3'
Dpn I	Diplococcus pneumoniae	5'-Г ^m A/ТЦ-3'
Dra I	Deinococcus radiophilus	5'-ТТТ/ААА-3'
Eco RI	E.coli, яка несе плазмиду	
(рекомбінант)	гіперпродукції Eco RI	5'-Г/ААТТЦ-3'
Eco RI	E.coli RY13	5'-Г/ААТТЦ-3'
Eco RV	E.coli	5'-ГАТ/АТЦ-3'

Примітки: 1) в дужках вказані альтернативні нуклеотиди; 2) Пу, Пі - довільна пуринова, піримідинова основа; N- довільний нуклеотид; Г^m - метильований гуанін; (N)_s- нуклеотид, який повторюється вісім разів.

Рестриктази спочатку поділили на 3 групи залежно від довжини пізнавальної нуклеотидної послідовності (сайтів пізнавання): I - пізнають **тетрануклеотиди** (AluI із *Arthobacter luteus*); II - пізнають **пентануклеотид** (EcoRI із *E.coli*); III - пізнають **гексануклеотиди** (EcoRIІ із *E.coli*). На тепер, рестриктази ділять на три класи з урахуванням RMS-системи, у якій виділяють RMS-білки рестрикції, модифікації (метилування) і посадки.

До перших із них відносять ті рестриктази, які гідролізують ДНК у довільних точках з утворенням різних фрагментів ДНК (для обох ланцюгів ДНК відомі системи R₂M₂S); до другого класу відносяться ферменти, для яких сайти рестрикції та посадки співпадають з RS і MS. Рестриктази цього класу, які об'єднують ферменти вищезазначених трьох груп, використовуються в практиці генетичної інженерії, тому що дозволяють проводити направлене маніпулювання з ДНК та її частинами (генами), здійснювати генетичне картування і конструювання *in vitro*. Рестриктази III класу (наприклад, із фагу P1, системи 2RMS) об'єднують всі інші рестрикційні ендонуклеази. Окремі з них, наприклад, не пізнають сайти посадки, тому і рідко використовуються на практиці.

Залежно від джерела ДНК, число сайтів розщеплення неоднакове. Наприклад, дії рестриктаз піддаються ДНК фагу X (індукує *E.coli* K-12), аденовірусу R й вірусу SV-40; в цьому випадку число сайтів розщеплення

Генетична інженерія

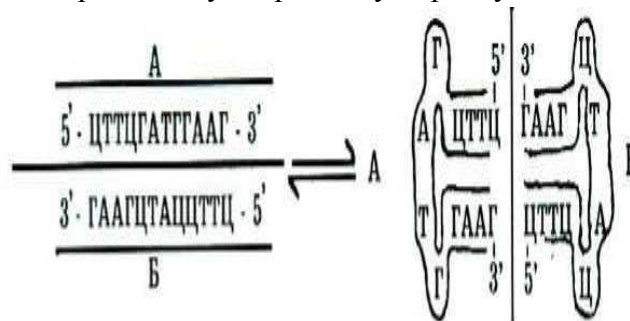
відповідно буде таким: для AluI - більше 50, 32; для BamHI- 5, 3, 1; для BalI- 15, 17, 0; для HindIII- :6, 11, 6; для MboI-50, 50, 6 тощо.

Розщеплення сайтів може проходити симетрично (AluI, BalI, DpnI та ін.) з утворенням «тупих» кінців у ДНК й асиметрично (AatII, AccI, AvaI, II, BamHI та ін.) з утворенням «липких» кінців (рис.2.1.4)



Рис. 2.1.4. Фрагменти ДНК з «липкими» кінцями

У ДНК різних організмів містяться так звані **поліндрони** (грецьк. palindrome- той, що вертається, перевертень) - послідовності, які повторюються у зворотному порядку:



У суперспіралізованому стані довгі поліндрони (10 і більше пар основ) утворюють хрестоподібні структури, які служать сигналами для пізнавання відповідних ділянок

Розділ 2

ДНК рестриктазами, метилазами і білками, що регулюють дію генів.

Все це дає можливість рестриктаз для фізичного картування ДНК, виділення фрагментів, визначення нуклеотидної послідовності й інших потреб генетичної інженерії.

2.1.3. ДНК і РНК полімерази та пов'язані з ними процеси реплікації, транскрипції і трансляції. Реплікація, або самоподвоєння, властиве ДНК і РНК як спосіб переносу генетичної інформації відповідно від ДНК до ДНК, або, наприклад, у ряді вірусів від РНК до РНК. Існує декілька механізмів реплікації. В більшості, реплікація здійснюється напівконсервативним способом, коли дволанцюгова ДНК деспіралізується і кожен ланцюг індукує синтез комплементарного собі ланцюга за участю ДНК- або РНК-полімерази.

У клітинах *E.coli* виявлені три різні ДНК - полімерази. Вони характеризуються однаковою спорідненістю щодо напрямку синтезу нових ланцюгів ДНК, але відрізняються за активністю. В цілому швидкість реплікації складає від 1000 нуклеотидів у хромосомах прокаріот до 100 нуклеотидів в еукаріот за секунду. Позначаються ДНК-полімерази відповідно I, II, і III. У 60-х роках ХХ століття *A. Корнберг* виділив із *E. coli* ДНК - полімеразу I, яка представляла собою поліпептидний ланцюг із 1000 амінокислотних залишків.

Згодом було встановлено, що ДНК-полімераза I не є основним ферментом реплікації хромосом, але володіє функцією корекції, видаляючи помилково включені в ланцюги ДНК окремі нуклеотиди. Найменше вивчена ДНК-полімераза II. Її активність низька і складає лише 5% від ДНК- полімерази I.

Головним ферментом реплікації ДНК бактеріальної хромосоми є ДНК-полімераза III. Молекула цього ферменту полімеризує більше 15 тисяч нуклеотидів за хвилину.

Генетична інженерія

Однак, ДНК-полімераза III, що складається з декількох поліпептидних ланцюгів не здатна ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль відіграє специфічна РНК-полімераза. В еукаріот ДНК- полімераза ділиться відповідно на α -, β - і γ -ДНК-полімерази. Характеристика ДНК-полімераз наведена в табл. 2.1.2.

Таблиця 2.1.2. Характеристика прокаріотичних та еукаріотичних ДНК-полімераз

Днк-полімераза	Розмір, кДа	Склад	Ферментна активність
<i>ДНК-полімераза із клітини E.coli</i>			
I	109	Одноланцюгова	а) елонгація в напрямку 5'—3' від 3'-ОН-затравки; б) 3'-5'-екзонуклеаза; в) 5'-3'-екзонуклеаза
II	120		3'^5'-екзонуклеаза;
III	250	Гетеромуль-тимер	а) елонгація в напрямку 5'—3' від 3'-ОН-затравки; б) 3'-5'-екзонуклеаза;
<i>ДНК-полімераза із клітин ссавців</i>			
α	110-120	Декілька субодиниць	Реплікований синтез ядерної ДНК (ядерна ДНК- репліказа)-80%
β	45	1 субодиниця	Репарація сегментів пошкодженої ДНК
γ	60		Реплікативний синтез мітохондріальної ДНК - 2-15%

Геноми бактерій і фагів реплікуються як єдине ціле, тобто як організовані одиниці реплікації, або **реплікони**. Кожний реплікон містить місце (точку) **ініціації Ori** (англ. origin-pочаток) - орієнтований напрям реплікації, наприклад, OriC в *E.coli* (рис.2.1.5).

Впродовж однократного ділення прокаріотичної чи еукаріотичної клітини, незалежно від числа хромосом в ній, весь геном її реплікується також один раз. Подвоєний геном **сегрегуюється** (лат. segregation - відокремлення) порівну в кожен дочірню клітину.

Одиницею сегрегації є хромосома, одиницею ж реплікації - **реплікон**. Крім того, Ori в репліконі є місце зупинки реплікації.

Одиниці сегрегації та реплікації у бактеріальній хромосомі співпадають, тому що вона містить один реплікон.

Розділ 2

В еукаріотичній клітині є велике число репліконів.

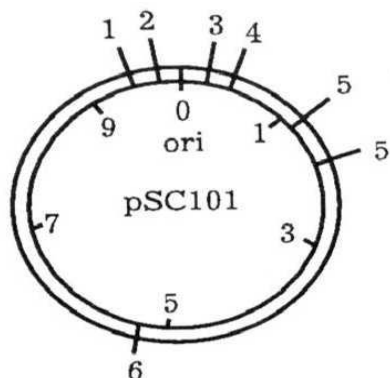


Рис.2.1.5. Ori- сайти в плазміді pSC101 *E.coli* (цифри на внутрішньому крузі 1-6 показують місця дії різних ферментів-рестриктаз).

Репліковані відрізки нуклеотидних послідовностей 1000 - 2000 п.н. називають **фрагментами Оказакі**.

Питання до самоконтролю:

1. Ім'я вченого, який запропонував термін «каталіз»:

- а) Вавілов
- б) Крік
- в) Берцеліус
- г) Корана

2. Наука, яка вивчає ферменти, називається:

- а) генетика
- б) генетична інженерія
- в) ензимологія
- г) вірусологія

3. Скільки виділяють класів ферментів згідно класифікації?

- а) 4
- б) 8
- в) 6
- г) 10

4. Існують такі типи ферментів:

- а) клітинні
- б) *in vivo*
- в) позаклітинні
- г) *in vitro*

Генетична інженерія

5. Ферменти, що каталізують реакції гідролізу:

- а) оксидоредуктази
- б) гідролази
- в) трансферази
- г) ізомерази

6. Ферменти, що каталізують реакції приєднання та відщеплення з відповідним насиченням та ненасиченням:

- а) оксидоредуктази
- б) гідролази
- в) ліази
- г) ізомерази

7. Ферменти, що каталізують реакції ізомеризації, тобто перенос в середині молекулярних груп з утворенням ізомерних форм:

- а) оксидоредуктази
- б) гідролази
- в) ліази
- г) ізомерази

8. Важливі показники, які визначають активність і тривалість роботи ферментів у різних умовах:

- а) адаптивні характеристики ферментів
- б) кінетичні характеристики ферментів
- в) звичайні характеристики ферментів
- г) каталізуючі характеристики ферментів

9. Речовини, які пригнічують ферментні реакції, називають :

- а) супресори
- б) каталізатори
- в) ліази
- г) інгібітори

10. Головним ферментом реплікації ДНК бактеріальної хромосоми є:

- а) ДНК-полімераза I
- б) ДНК-полімераза II
- в) ДНК-полімераза III
- г) ДНК-полімераза IV



2.2.1. Ендонуклеази. Всі рестрикційні *ендонуклеази* (*рестриктази*) бактерій впізнають специфічні, досить короткі послідовності ДНК і зв'язуються з ними. Цей процес супроводжується розрізанням молекули ДНК або в самому сайті впізнавання, або в якомусь іншому, що визначається типом ферменту. Поряд з рестрикційною активністю бактеріальний штам має здатність метилірованої ДНК; для цього процесу характерна така ж специфічність відносно послідовностей ДНК, як і для рестрикції. Метилаза додає метильні групи до аденинових або цитозинових залишків в тому ж сайті, в якому зв'язується рестрикційний фермент. В результаті метилування сайт стає стійким до рестрикції. Отже, метилування захищає ДНК від розрізання.

Розрізняють 3 основні класи рестриктаз. Все рестриктази впізнають на ДНК строго певні послідовності, але *рестриктази 1-го класу* здійснюють розриви в довільних точках молекули ДНК, а *рестриктази 2-го і 3-го класів* дізнаються і розщеплюють ДНК в суворо визначених точках всередині сайтів впізнавання або на фіксованому від них расстоянні.

Ферменти типів 1 і 3 мають складну субодиничну структуру і володіють двома типами активності - модифікуюча і АТФ-залежна ендонуклеаза.

Ферменти другого класу складаються з двох окремих білків: ендонуклеази і модифікуючої метилази. Тому в генній інженерії використовуються виключно ферменти 2-го класу. Вони потребують іони магнію в якості *кофакторів*.

Рестриктази, поряд з їх значимістю для наукових експериментів, мають величезне практичне значення, оскільки є незамінним

інструментом молекулярних генетиків при виконанні діагностичних досліджень.

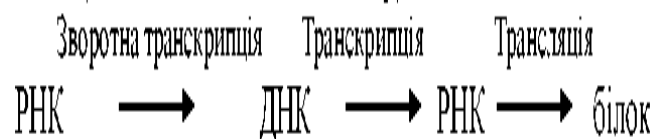
Завдяки своїм властивостям, кожна рестриктаза дізнається свій строго специфічний сайт. У медичній генодіагностиці ендонуклеази рестрикції часто використовуються для гідролізу продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Крім того, важливим сферою застосування рестриктаз є *клонування*. Таким чином отримують геномні бібліотеки, які можуть бути використані в різних цілях.

2.2.2. Зворотні транскриптази (ревертази).

На початку 70-х років у структурі онкогенних вірусів виявлено білок - фермент *зворотної транскриптази*, або ревертази. За допомогою цього ферменту в клітинах може проходити синтез ДНК на РНК. Це був принципово новий, невідомий раніше шлях передачі спадкової інформації.

Біологічна роль ревертази полягає у синтезі копій ДНК (кДНК) з геномів РНК деяких РНК - вмісних вірусів, здатних синтезувати на матриці РНК комплементарний до неї ланцюг ДНК. У подальшому проходить експресія гена, тобто транскрипція з ДНК на РНК і трансляція, в ході якої синтезуються білки онкогенних вірусів.



Відкриття зворотної транскриптази відіграло принципово важливу роль для вирішення фундаментальних питань сучасної молекулярної генетики, молекулярної біології та знайшло застосування в генетичній інженерії як інструмент при синтезі кДНК. Вона необхідна для клонування і при одержанні гібридаційних зондів, тобто часткових копій генів.

У 1976 році вдалося здійснити ферментний (за допомогою ревертази) синтез

Розділ 2

гена, відповідального за структуру тваринного глобіну.

2.2.3. Нуклеази. *Нуклеази - велика група ферментів, що гідролізують зв'язки між ланками нуклеїнових кислот, руйнуючи у них послідовність азотистих основ.*

Наявні в усіх еукаріотів і прокаріотів. Нуклеази беруть участь у внутрішньоклітинних процесах на кшталт деградації РНК у цитоплазмі, репарації ДНК у ядрі тощо. Також, можуть виконувати захисну функцію, руйнуючи мобільні елементи ДНК (плазміді, епісоми, віруси, фаги, транспозони та інші).

Розрізняють декілька типів нуклеаз, залежно від їх специфічності: *екзонуклеази і ендонуклеази, рибонуклеази і дезоксирибонуклеази, рестриктази і деякі інші.*

Ряд нуклеаз є неспецифічними до типу нуклеїнових кислот.

За механізмом дії нуклеази поділяють на три основні групи:

- **фосфодіестерази** (полінуклеотидази) - розщеплюють нуклеїнові кислоти з утворенням мононуклеотидів
- **фосфомоноестерази** (нуклеотидази) - розщеплюють мононуклеотиди з утворенням нуклеозидів і фосфорної кислоти
- **нуклеозидази** - розщеплюють нуклеозиди на пуринову або піримідинову основу та вуглевод

Нуклеази беруть участь у різних процесах, пов'язаних з реплікацією, транскрипцією ДНК, у дозріванні РНК-транскриптів, у процесах, пов'язаних з трансляцією, рекомбінацією, репарацією нуклеїнових кислот, а також у захисті клітин від чужорідних нуклеїнових кислот.

За специфічністю розрізняють нуклеази:

а) діють на ДНК (дезоксирибонуклеази) чи на РНК (рибонуклеази), або на обидві кислоти;

Генетична інженерія

б) руйнують одно- і/або дволанцюгові нуклеїнові кислоти;

в) упізнають 3'- або 5'-кінці;

г) розрізняють пуринові або піримідинові основи;

д) упізнають певні нуклеотидні послідовності.

Суттєва різниця існує між ендонуклеазами, дія яких спрямована на внутрішньоланцюгові дієфірні зв'язки лінійних і кільцевих молекул ДНК з утворенням фрагментів різної довжини, та екзонуклеазами, які діють тільки на кінцеві дієфірні зв'язки - з 5'-, або з 3'-кінця молекул ДНК і послідовно здійснюють гідроліз фосфодієфірних зв'язків і відщеплюють один за одним нуклеозидмонофосфати.

Нуклеази різняться також за дією на фосфодієфірний зв'язок:

- одні нуклеази каталізують розрив між фосфатом і 3'-ОН групою з утворенням 5'-фосфомоноєфірних кінців (рис. 2.2.1, А);

- інші - між фосфатом і 5'-ОН групою, внаслідок чого утворюються продукти з 3'-фосфомоноєфірними кінцями (рис.2.2.1, Б).

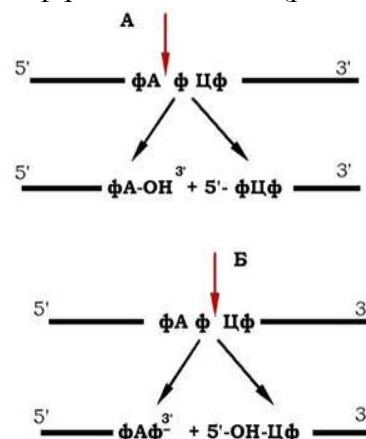


Рис. 2.2.1. Два можливі способи гідролізу фосфодієфірних зв'язків нуклеїнової кислоти нуклеазами

Серед нуклеаз на особливу увагу заслуговують **ендонуклеази рестрикції рестриктази**. Ці ферменти впізнають у дволанцюгових молекулах ДНК не окремі нуклеотидні залишки, а нуклеотидні послідовності із 4-6 нуклеотидів і тому, розщеплюють будь-яку ДНК на порівняно невелику кількість фрагментів. Крім того, існує

Розділ 2

велика кількість різних ендонуклеаз рестрикції, кожна з яких упізнає специфічну послідовність.

Назву рестриктази отримали у зв'язку з тим, що присутність їх у бактеріальній клітині обмежує ріст бактеріальних вірусів (бактеріофагів).

Рестриктази прийнято іменувати за назвою бактерій, з яких їх виділяють.

Так, назва Bam HI свідчить, що цей фермент виділений із *Bacillus amiloliquefaciens*. Перша з трьох літер аббревіатури відповідає першій літері назви роду (B); наступні дві літери є початковими літерами видової назви (am), літера H означає штам, з якого виділений фермент, і нарешті, римська цифра відповідає порядковому номеру рестриктази в ряді аналогічних ферментів, виділених із цього мікроорганізму.

Унаслідок високої специфічності до певних нуклеотидних послідовностей ендонуклеази рестрикції використовують для секвенування та молекулярного клонування. **Секвенування геному** (лат. sequentia - послідовність) - метод визначення сайтів рестрикції вздовж молекули ДНК; установаження взаємного розташування цих сайтів (фізичне картування ДНК).

2.2.4. ДНК-лігази, їх будова та функції. Лігази - клас ферментів (КФ б), здатних каталізувати з'єднання двох молекул з утворенням нового хімічного зв'язку (лігування).

При цьому зазвичай відбувається гідроліз невеликої хімічної групи від однієї з молекул. Зазвичай реакція має вигляд: $Ab + C \rightarrow A-C + b$ або інколи: $Ab + cD \rightarrow A-D + b + c$, де малі літери позначають невеликі хімічні групи, що відщеплюються лігазою.

Зазвичай назви лігаз включаються в себе слово «лігаза» (наприклад, ДНК-лігаза) або слово «синтетаза» (наприклад, аміноацил-тРНК-синтетаза).

Через те, що деякі лігази додають вуглекислоту до молекули, вони мають назву карбоксилаз. Відмітьте, не слід плутати назви

Генетична інженерія

«синтетаза» і «синтаза», остання каталізує синтез молекул без відщеплення малої групи і згідно з класифікацією ферментів групується разом з ліазами.

У класифікації міжнародної комісії з ферментів, лігази класифікуються як КФ б та поділяються на 6 підгруп:

- **КФ 6.1** включає лігази, що формують зв'язки вуглець-кисень
- **КФ 6.2** включає лігази, що формують зв'язки вуглець-сірка
- **КФ 6.3** включає лігази, що формують зв'язки вуглець-азот (включаючи аргінінсуццинат-синтетазу)
- **КФ 6.4** включає лігази, що формують зв'язки вуглець-вуглець
- **КФ 6.5** включає лігази, що формують фосфодіестерні зв'язки
- **КФ 6.6** включає лігази, що формують зв'язки азот-метал

ДНК-лігази - ферменти, що каталізують репарацію одноланцюгового розриву, який зазвичай виникає під впливом ендонуклеаз. Тому ДНК-лігази називають ще й, **зшивачами ферментів**.

Лігази виявлені в самих різних клітинах, в тому числі і в клітинах, заражених вірусами. Під впливом цих ферментів утворюються фосфодіестерні зв'язки між вільним 5-фосфатним кінцем оліго - або полінуклеотида і 3-гідроксильною групою сусіднього оліго - або полінуклеотида.

Питання до самоконтролю:

1. Існує така основна кількість рестриктаз:
 - а) 6
 - б) 5
 - в) 4
 - г) 3
2. Зворотня транскриптаза, або :
 - а) лігаза
 - б) ревертаза
 - в) ізомераза
 - г) лігаза

Розділ 2

3. Велика група ферментів, що гідролізують зв'язки між ланками нуклеїнових кислот, руйнуючи у них послідовність азотистих основ, це є:

- а) ревертази
- б) ендонуклеази
- в) нуклеази
- г) ДНК- полімерази

4. За механізмом дії нуклеази поділяють на таку кількість груп:

- а) 3
- б) 4
- в) 5
- г) 6

5. Метод визначення сайтів рестрикції вздовж молекули ДНК та встановлення взаємного розташування цих сайтів, це є :

- а) секвенування
- б) моделювання
- в) картування
- г) ферментування

6. Метод, який дозволяє включати, виділяти та ампліфікувати окремі гени в реципієнтних, про- або еукаріотичних клітинах, це є:

- а) ампліфікація
- б) картування
- в) секвенування
- г) молекулярне клонування

7. Клас ферментів, які здатні каталізувати поєднання двох молекул з утворенням нового хімічного зв'язку (лігування):

- а) ревертази
- б) полімерази
- в) ізомерази
- г) лігази

8. Синонимом синтетази, яка визначає можливість синтезу складних сполук із простих є:

- а) ліаза
- б) лігаза
- в) гідролаза

г) трансфераза

9. Рестриктази прийнято іменувати за назвою того, з чого їх виділяють:

- а) бактерій
- б) ДНК
- в) РНК
- г) вірусів

10. Нуклеотидази розщеплюють мононуклеотиди з утворенням нуклеозидів і фосфорної кислоти, це є:

- а) фосфодіестерази
- б) полінуклеотидази
- в) фосфомоноестерази
- г) нуклеозидази

Тема 2.3. Вектори генетичної інженерії



2.3.1. Вимоги до векторних молекул.
Вектори - молекули ДНК, які використовуються для введення чужої генетичної інтеграції і забезпечують там її ампліфікацію або інтеграцію в геном.

Для виконання біологічних та генетичних функцій вектори повинні володіти відповідними властивостями: а) здатністю до автономії (позахромосомної) реплікації і мати ділянку клонування для введення в реципієнтну клітину чужорідної ДНК, щоби стабільно підтримувати в клітині господаря чужу генетичну інформацію. Вектор повинен мати лиш один сайт рестрикції та бути репліконом; б) мати відповідні маркери (наприклад, стійкість до антибіотиків), які дозволяють легко виявити трансформовані клітини; в) введення чужої ДНК не повинно перевищувати суттєвих функцій вектора.

На відміну від багатьох біологічних молекул, які характеризуються широким генетичним поліформізмом, вектор, як правило,

Розділ 2

відрізняється вузькою спеціалізацією, що дозволяє використовувати його для вирішення спеціалізованих завдань. У генетичній інженерії застосовують в якості векторів плазмиди, бактеріофаг X, ниткоподібні бактеріофаги та косміди.

2.3.2. Векторні молекули і їх класифікація.

На сьогодні практично будь-яка послідовність ДНК може бути клонованою в бактеріальних клітинах. Переважно для маніпуляцій з рекомбінантними ДНК використовуються клітини E.coli.

Клонувальний вектор – фаг або плазида, що забезпечує «перенесення» і реплікацію чужорідної ДНК у вигляді інертної частини свого генома в реципієнтній клітині. Клонування ДНК у прокаріотичних клітинах можливе завдяки властивості бактеріальних плазмид і бактеріофагів функціонувати після вбудовування в їх геном додаткової чужорідної послідовності ДНК. Такі *гібридні*, чи *хімерні*, плазмиди або фаги реплікуються в бактеріальних клітинах так само, як вихідні, і можуть накопичуватися у великій кількості. Копії чужорідних фрагментів ДНК згодом можуть бути виділені в чистому вигляді. Класифікацію векторів можна проводити за різними ознаками.

1. За застосуванням розрізняють вектори:

- **клонувальні** – використовуються для клонування будь-яких фрагментів ДНК;
- **експресійні** – використовуються для синтезу мРНК і білків;
- **спеціалізовані** – використовуються для секвенування і мутування генів, дослідження особливостей регуляції клонованих генів, ідентифікації в клонувальній ДНК регуляторних ділянок, зокрема промоторів тощо.

2. За походженням вектори поділяють на:

- **плазмідні** – здатні існувати в клітині і поза її межами у вигляді ДНК;
- **фагові (вірусні)** – можуть існувати у вигляді ДНК і віріонів;

Генетична інженерія

- **гібридні** – поєднують окремі властивості плазмид і вірусів.

3. За структурою розрізняють:

- **кільцеві вектори;**

- **лінійні вектори.**

4. За способом підтримання в клітині вектори поділяють на:

- **автономні** – реплікуються самостійно;

- **інтегративні** – реплікуються в складі клітинного генома.

5. За кількістю молекул у клітині:

- **однокопійні та низькокопійні** – представлені в клітині 1 - 4 (до 10) копіями;

- **висококопійні (мультикопійні)** – представлені в клітині 10-100 копіями.

6. За кількістю реплікаторів у векторній молекулі їх поділяють на:

- **монорепліконні** – містять один сайт ініціації реплікації;

- **бірепліконні** – містять більше одного сайту ініціації реплікації.

Вибір певного вектора, плазмідного чи фагового, залежить від мети й умов проведення експерименту.

2.3.3. Фагові вектори. У генетичній інженерії, крім плазмідних векторів, для переносу бактеріальних генів у реципієнтні клітини використовують також інші вектори (найчастіше - фаги бактерій). Віруси бактерій називають **бактеріофагами**, або скорочено **фагами**.

Відомо декілька типів фагів, які заражають бактерії E.coli. Форми фагів різноманітні, але завжди вони мають головку та хвіст. Об'єм частинок фага складає біля 0,001% об'єму клітини E.coli.

Фаги зручні для вивчення генетичних комбінацій. Це обумовлено тим, що геном містить лише одну невелику за розміром хромосому, а життєвий цикл їх короткий. Встановлено, що при проникненні фага в бактерію в клітині проходить реплікація фагової ДНК, в результаті чого утворюється фонд хромосом фагів. *H. Вісконті* та *Д. Дельбрук*

Розділ 2

у 1953 р. сформулювали теорію генетичних рекомбінацій у фагів. Згідно з цією теорією геном фагів складає внутріклітинний схрещувальний фонд.

Після створення фонду проходить синтез білкових компонентів, які об'єднуються з молекулами ДНК фага, і на цій основі утворюється *нове покоління фагових частин*.

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

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

2.3.4. Косміди і ниткоподібні фаги. Для клонування великих фрагментів ДНК і конструювання геномних бібліотек в якості векторів використовують **косміди**. Це плазміди, які містять вбудовану *cos*-ділянку фага *X*, внаслідок чого плазмідна ДНК може бути упакована *invitro* оболонку фага. Косміди суміщають позитивні властивості плазмід і фагів, володіючи здатністю, як і плазміди, довгий час автономно реплікуватися в клітині й упаковувати власну ДНК у головки фатів, якщо їх розмір не перевищує 93 тисяч нуклеотидних пар.

Основними компонентами космідного вектора є: 1) плазмідний реплікон; 2) маркер резистентності до антибіотика; 3) фрагмент ДНК фага *X*, який містить *cos*-ділянку.

Генетична інженерія

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

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

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

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

Звичайно, для успішного вирішення завдань, які постають перед генетичною інженерією, необхідно володіти адекватним арсеналом методичних засобів.

Для кожного організму вимагається конструювання своїх векторних систем.

При цьому необхідно дотримуватися таких умов: а) стабільна реплікація в клітині вектора і його рекомбінантних похідних; б) функціональна активність генів, які вводяться в клітину; в) клітини, що містять вектор або його похідні, повинні легко ідентифікуватися, на відміну від вихідних, за допомогою тест-систем, заснованих на

Розділ 2

фенотиповому прояві ДНК, що вводиться в клітину; г) векторна ДНК та її рекомбінантні похідні в процесі ділення клітин зберігають свою структуру.

Питання до самоконтролю:

1. Молекули ДНК, які використовуються для введення чужої генетичної інтеграції і забезпечують там її ампліфікацію або інтеграцію в геном, це:

- а) геном
- б) вектор
- в) хромосома
- г) ген

2. Статевий фактор F, що зумовлює при кон'югації перенос генів є:

- а) фактор стійкості
- б) фактор плазмід
- в) фактор бактерій
- г) фактор генетичного переносу

3. Фактори, що контролюють синтез ферментів, які надають бактеріям стійкість до антибіотиків, сульфамідних препаратів та інших ліків, шляхом їх гідролізу або модифікації (ацетилюванням, аденілюванням, фосфорилуванням) це:

- а) фактор стійкості
- б) фактор плазмід
- в) R- фактор
- г) фактор генетичного переносу

4. Міграційні генетичні елементи прокариот, які кодують стійкість до відповідних хімічних сполук, це:

- а) транспозони
- б) косміди
- в) бактеріофаги
- г) плазміди

5. Фактор, що містить гени, які викликають синтез особливих білкових речовин – коліцинів, це :

- а) клону вальний фактор
- б) коліциногенний фактор

Генетична інженерія

в) експресійний фактор

г) специфічний фактор

6. За походженням вектори поділяють на:

- а) плазмідні
- б) фагові (вірусні)
- в) гібридні
- г) векторні

7. За застосуванням розрізняють такі вектори:

- а) клонувальні
- б) експресійні
- в) спеціалізовані
- г) регуляторні

8. За структурою розрізняють такі вектори:

- а) кільцеві вектори
- б) лінійні вектори
- в) паралельні вектори
- г) антипаралельні вектори

9. За способом підтримання в клітині вектори поділяють на:

- а) автономні
- б) інтегративні
- в) напівавтономні
- г) напівінтегративні

10. За кількістю реплікаторів у векторній молекулі вектори поділяють на:

- а) монореplikонні
- б) біреplikонні
- в) тетрареplikонні
- г) поліреplikонні

Тема 2.4. Гібридизація нуклеїнових кислот

2.4.1. Методи гібридизації нуклеїнових кислот (НК). Гібридизація НК - об'єднання одностаницюгових молекул нуклеїнових кислот в одну молекулу.

Розділ 2

Метод використовується для виявлення фітопатогенних бактерій, вірусів і віроїдів, а також для ідентифікації та картування штамів грибів.

Існує кілька варіантів методу гібридизації: *на фільтрах, точкова гібридизація, блот-, сендвіч-, in situ, пряма в гелі* та ін.

Точкова гібридизація дає змогу одночасно використовувати багато клінічних проб. На стандартні фільтри наносять виділені з проб ДНК і РНК. Якщо наявні двонитчасті структури, їх денатурують і після цього додають зонд. Метод використовують для виявлення вірусів цитомегалії, гепатиту В, рота-, ентеро-, вірусів герпесу, грипу тощо.

Блот-гібридизація (от англ. blot – пляма) – метод виявлення фрагментів ДНК, розділених шляхом електрофорезу в агарозі. При цьому виділену з тканин та очищену ДНК нарізують рестрикційними ендонуклеазами на фрагменти. Після електрофорезу ці фрагменти переносять з агарози на нітроцелюлозні фільтри, на які наносять мічений зонд. Метод дозволяє визначити кількість вірусспецифічних послідовностей у ДНК виділених з клітин. Застосовується він і для виявлення в пухлинній тканині геномів вірусів інфекційного моноклеозу, Епштейна-Барр, папіломи людини тощо.

Аналогічний метод можна застосовувати і для виявлення фрагментів РНК, проте його рідко використовують в діагностичній вірусології.

Сендвіч-гібридизація ґрунтується на використанні двох клонованих неідентичних фрагментів ДНК, один з яких імобілізований на фільтрі, а другий є зондом. Наявна у пробі комплементарна нитка гібридується з обома нитками ДНК і зв'язує зонд з фільтром. Цей високочутливий метод дає змогу використовувати пробу без попередньої обробки. Його використовують для виявлення вірусів у виділеннях з носової частини глотки, вірусу цитомегалії в сечі тощо.

Генетична інженерія

Гібридизацію in situ в заражених

тканинах використовують для вивчення персистентних інфекцій та злоякісних пухлину разі інфекцій, спричинених вірусами гепатиту В, простого герпесу, інфекційного моноклеозу тощо. При цьому використовують заморожені зрізи тканини, одержаної під час біопсії, та інші матеріали.

Реакція молекулярної гібридизації є високочутливою, вона дає змогу в оптимальних умовах виявити нуклеїнові кислоти у таких низьких концентраціях, як 1-10 пн. Проте чутливість методу часто недостатня для виявлення вірусних послідовностей, якщо заражено небагато клітин в організмі. Наприклад, за умови ВІЛ-інфекції провірус звичайно знаходять лише в одному з 10^5 - 10^6 Т-лімфоцитів. У такому разі проводять попередню ампліфікацію вірусних нуклеїнових кислот шляхом додавання РНК затравки, комплементарної певним ділянкам обох ниток ДНК у консервативній ділянці молекули, і потім ідентифікують ДНК за допомогою зонда.

2.4.2. Гібридизація нуклеїнових кислот in situ. Флуоресцентна гібридизація in situ, або метод FISH (англ. Fluorescence in situ hybridization - FISH) - *цитогенетичний метод, який застосовують для детекції та визначення положення специфічної послідовності ДНК на метафазних хромосомах або в інтерфазних ядрах in situ.*

Крім того, FISH використовують для виявлення специфічних мРНК в зразку тканини. В останньому випадку метод FISH дозволяє встановити просторово-часові особливості експресії генів в клітинах і тканинах.

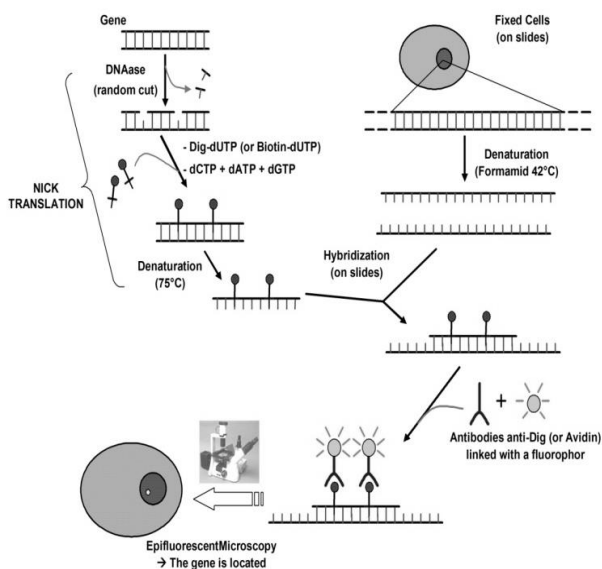
Метод FISH використовують в предімплантаційній, пренатальній та постнатальній генетичній діагностики, в діагностиці онкологічних захворювань, в ретроспективної біологічної дозиметрії.

При флуоресцентної гібридизації in situ використовують ДНК-зонди (ДНК-проби), які

Розділ 2

зв'язуються з комплементарними мішенями в зразку. До складу ДНК-зондів входять нуклеозиди, мічені флюорофорами (пряме мічення) або такими кон'югатами, як біотин або дігюксігенін (не пряме мічення). При прямому меченні зв'язався з мішенню ДНК-зонд можна спостерігати за допомогою флуоресцентного мікроскопа відразу по завершенні гібридизації. У разі непрямого мічення необхідна додаткова процедура фарбування, в ході якої біотин виявляють за допомогою флуоресцентно-міченого авідіна або стептавідіна, а дігюксігенін - за допомогою флуоресцентно-мічених антитіл. Хоча не прямий варіант мічення ДНК-проб вимагає додаткових реактивів і тимчасових витрат, цей спосіб дозволяє домогтися зазвичай більш високого рівня сигналу за рахунок присутності на молекулі антитіла або авідіна 3-4 молекул флюорохромами. Крім того, в разі непрямого мічення можливо каскадне посилення сигналу.

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



Для створення ДНК проб використовують клоновані послідовності ДНК, геномної ДНК, продукти ПЛР-реакції, мічені олігонуклеотиди, а також ДНК, отриману за допомогою мікродісекції.

Мічення зонда може здійснюватися різними способами, наприклад, шляхом нік-трансляції або за допомогою ПЛР з міченими нуклеотидами.

Генетична інженерія

На першому етапі відбувається конструювання зондів. Розмір зонда повинен бути досить великим для того, щоб гібридизація відбувалася за специфічним сайту, але і не дуже великий (не більше 1 тис П.О), щоб не перешкоджати процесу гібридизації. При виявленні специфічних локусів або при фарбуванні цілих хромосом треба заблокувати гібридизацію ДНК-проб з не унікальними повторюваними ДНК-послідовностями шляхом додавання в гібридизаційний суміш не мічених ДНК повторів (наприклад, Cot-1 DNA). Якщо ДНК-зонд являє собою дволацюгову ДНК, то перед гібридизацією її необхідно денатурувати.

На наступному етапі готують препарати інтерфазних ядер або метафазних хромосом. Клітини фіксують на субстраті, як правило, на предметному склі, потім проводять денатурацію ДНК. Для збереження морфології хромосом або ядер денатурацію проводять в присутності формаміду, що дозволяє знизити температуру денатурації до 70 °С.

Далі до препарату додають зонди і здійснюють гібридизацію близько 12 годин. Потім проводять кілька стадій відмивання для видалення всіх не гібридних зондів.

Візуалізацію ДНК-зондів проводять за допомогою флуоресцентного мікроскопу. Інтенсивність флуоресцентного сигналу залежить від багатьох факторів - ефективності мічення зондом, типу зонду і типу флуоресцентного барвника.

Питання до самоконтролю:

- Об'єднання одноланцюгових молекул нуклеїнових кислот в одну молекулу:
 - гібридизація нуклеїнових кислот
 - сегментація нуклеїнових кислот
 - секвенування нуклеїнових кислот
 - термінація нуклеїнових кислот
- Під час нагрівання при температурі 100°C або обробки лугом водного розчину ДНК водневі зв'язки руйнуються, і подвійна спіраль дисоціює на два окремих ланцюжки, це є:

Розділ 2

- а) денатурація
- б) репарація
- в) ренатурація
- г) реплікація

3. Процес при якому одноланцюгові ДНК можуть легко утворити дволанцюгову спіраль, ідентичну вихідній при температурі 65°C називається:

- а) денатурація
- б) репарація
- в) ренатурація
- г) реплікація

4. Зонди мітять радіоактивними попередниками (звичайно радіоактивним фосфором) у реакції, що називається:

- а) транскрипцією
- б) трансляцією
- в) нік-трансляцією
- г) експозицією

5. Скільки існує основних варіантів методу гібридизації нуклеїнових кислот:

- а) 3
- б) 5
- в) 7
- г) 9

6. Метод виявлення фрагментів ДНК, розділених шляхом електрофорезу в агарозі, це:

- а) точкова гібридизація
- б) блот-гібридизація
- в) сендвіч-гібридизація
- г) гібридизація *in situ*

7. Гібридизація нуклеїнових кислот, що ґрунтується на використанні двох клонованих неідентичних фрагментів ДНК, один з яких імобілізований на фільтрі, а другий є зондом, це:

- а) точкова гібридизація
- б) блот-гібридизація
- в) сендвіч-гібридизація
- г) гібридизація *in situ*

Генетична інженерія

8. Варіант гібридизації нуклеїнових кислот, який використовують для вивчення персистентних інфекцій та злоякісних пухлин разі інфекцій, спричинених вірусами гепатиту В, простого герпесу, інфекційного мононуклеозу, це:

- а) точкова гібридизація
- б) блот-гібридизація
- в) сендвіч-гібридизація
- г) гібридизація *in situ*

9. Цитогенетичний метод, який застосовують для детекції та визначення положення специфічної послідовності ДНК на метафазних хромосомах або в інтерфазних ядрах *in situ*, це :

- а) метод блот
- б) метод сендвіч
- в) метод FISH
- г) метод дробовика

10. Мічення зонда може здійснюватися різними способами, наприклад:

- а) шляхом нік-трансляції
- б) ПЛР
- в) ПЛР з міченими нуклеотидами
- г) шляхом трансляції

Тема 2.5. Секвенування нуклеїнових кислот



2.5.1. Методи визначення нуклеотидної послідовності. Бактеріальна хромосома, довжина якої дорівнює приблизно 1 мм, являє собою молекулу ДНК, що складається приблизно з 5 млн пар нуклеотидів; у клітині вона компактно укладена, скоротившись у декілька тисяч разів, менш як до 1 мкм у діаметрі. У соматичних клітинах людини ДНК організована в структурах 46 хромосом; кожна з цих хромосом містить молекулу ДНК завдовжки біля 4 см, а повне число нуклеотидів у ній наближається до 3 млрд п.н.. Вже саме

Розділ 2

лише застосування рестриктаз дає змогу отримати орієнтовні фізичні карти молекул ДНК, однак пряме визначення нуклеотидної послідовності (*сіквенс* від англ. sequence) дає дослідникові повну послідовність з точністю до одного нуклеотида. Саме така точність необхідна в генетичній інженерії. Високоєфективні методи визначення нуклеотидної послідовності (секвенування) ДНК виникли як результат об'єднання ряду методичних досягнень. Вирішальну роль при цьому відіграла розробка методів електрофорезу, що дають змогу з високою точністю розділяти олігомери, що відрізняються за довжиною лише на один нуклеотид. Важливе значення мали також методи специфічної хімічної модифікації азотистих основ у складі молекул ДНК й наступного вищеплювання їх, способи радіоактивного і флуоресцентного мічення тощо.

Клонований або *ампліфікований* фрагмент ДНК можна дослідити різними способами, однак найвичерпнішу інформацію дає встановлення нуклеотидної послідовності (sequence) фрагмента – секвенування. На рис.2.5.1 показано схему найбільш популярного сьогодні *методу Сангера (Frederick Sanger)*.

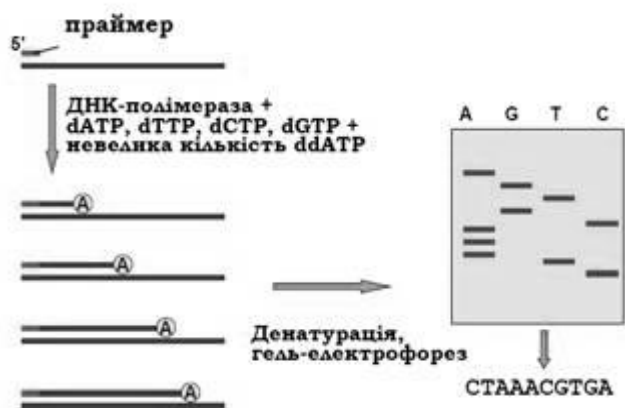


Рис.2.5.1. Секвенування ДНК за Сангером: схема синтезу ДНК у присутності дидезокси-АТФ (ліворуч).

До одноланцюгової ДНК-матриці додається *радіоактивно-мічений праймер*, повний набір *дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP)*, *ДНК-полімераза* та невелика кількість *дидезоксинуклеозидтрифосфату* одного із

Генетична інженерія

чотирьох типів (наприклад, ddATP). *Дидезоксинуклеотид* відрізняється тим, що містить атом Н замість ОН-групи не тільки при 2', а також і при 3' атомі пентози. Включення такого нуклеотиду в ланцюг, що синтезується, приведе до зупинки подальшого зростання ланцюга внаслідок відсутності 3' ОН-групи на його кінці. Оскільки ddATP присутній у невеликій кількості, така подія буде відбуватися в різних точках ланцюга – в усіх, де аденін розташований напроти тиміну в складі матриці.

Шляхом денатурації продуктів реакції отримаємо набір мічених одноланцюгових фрагментів від праймера до кінцевого аденіну. Довжина цих фрагментів у нуклеотидах визначить порядковий номер аденіну в складі ланцюга.

З метою визначення довжини фрагментів проводять *гель-електрофорез* у денатуруючих умовах, на сусідні лунки гелю наносять також продукти синтезу у присутності інших дидезоксинуклеотидів.

Як показано на рис.2.5.1, після електрофорезу та візуалізації смуг із такого гелю можна прочитати нуклеотидну послідовність.

Шляхом аналогічної процедури для інших трьох дидезоксинуклеотидів отримуємо набір одноланцюгових фрагментів, що аналізуються за допомогою гелю-електрофорезу в денатуруючих умовах (праворуч) – розподіл смуг дозволяє прочитати послідовність (праворуч унизу).

Метод Сангера - із застосуванням ферментативного підходу. У цьому методі використовують синтетичні 2'3'-дидезоксирибонуклеозид-трифосфати. Як відомо, ДНК - це полімер, цукрофосфатна основа якого складається з 3',5'-дидезоксирибонуклеотидів. Тому, за допомогою ДНК-полімерази згадані синтетичні аналоги нормально включаються в ланцюг ДНК, що росте, через свої 5'-фосфатні групи. Проте вони не утворюють фосфодієфірного зв'язку із наступним нуклеотидом, внаслідок чого ріст

Розділ 2

такого ланцюга припиняється. Через таку властивість 2',3'-дидезоксирибонуклеозид-трифосфати у цьому випадку отримали назву **термінаторів транскрипції**.

Щоб провести секвенування за Сангером, беруть чотири 2',3'-дидезоксирибонуклеотиди для кожної з чотирьох основ. До *реакційної суміші* в цьому разі входять: 1) одностричковий ланцюг ДНК, нуклеотидну послідовність якого мають визначити; 2) найкоротший фрагмент міченої ДНК, комплементарний кінцевій ділянці цього ланцюга (його називають затравкою); 3) один синтетичний дидезоксинуклеотид та відповідний нормальний дезоксинуклеотид у точно визначеному співвідношенні; 4) три інших дезоксинуклеотиди.

Коли до такої реакційної суміші додають ДНК-полімеразу, відбувається нормальна полімеризація нових ланцюгів ДНК, комплементарних присутньому у суміші, починаючи з затравки.

Однак при включенні 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів ріст даного ланцюга припиняється. Якщо співвідношення 2',3'-дидезоксирибонуклеотид/дезоксирибознуклеотид підбрано правильно, утворюється набір мічених молекул, довжина яких дорівнюють відстаням від залишків даного нуклеотиду до кінця ДНК ланцюга.

Загалом, щоб просеквенувати за методом Сангера молекулу ДНК, послідовність якої хочуть визначити, у присутності міченої затравки її інкубують окремо у чотирьох реакційних сумішах для ДНК-полімеразної реакції, кожна з яких містить один з чотирьох 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів.

Отримані в результаті реакції мічені фрагменти розділяють за розмірами у поліакриламідному гелі, радіоавтографують і за картиною розподілу фрагментів встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК.

Зараз цей метод трохи вдосконалено завдяки використанню флуоресцентномічених 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів як термінаторів транскрипції. При цьому такі мічені молекули,

Генетична інженерія

відповідно до основи, яку вони містять, розрізняються за квантовим виходом флуоресценції. Це значно спрощує процедуру секвенування, оскільки замість чотирьох реакцій копіювання тепер достатньо провести одну з додаванням всього набору 2',3'-дидезоксирибонуклеотидів.

Використання флуоресцентних міток в секвенуванні дало змогу автоматизувати процедуру аналізу й визначати первинну структуру ДНК безпосередньо в процесі електрофоретичного розділення мічених фрагментів. Коли фрагменти ДНК проходять крізь зону сканування, лазерний пристрій «зчитує» сигнал специфічної мітки, потім комп'ютер автоматично обробляє отриману інформацію й буде послідовність нуклеотидів.

Таким чином, **основа методу** - отримання повного (статистичного) набору фрагментів ДНК, що закінчуються на кожному з чотирьох нуклеотидів.

В іншому **методі секвенування** – **методі Максама-Гілберта** (Allan M. Maxam, Walter Gilbert) замість ферментативного синтезу застосовують хімічне розрізання ланцюга на нуклеотиди певного типу. Отримані фрагменти різної довжини так само розділяють за допомогою електрофорезу. Згідно з цим методом, кінці фрагмента, одержаного раніше після дії рестриктази на ДНК, мітять за допомогою ізотопу фосфору ^{32}P . Радіоактивна мітка вводиться фосфорилуванням за допомогою у- ^{32}P -АТФ та Т4-полінуклеотидкінази. Отримані фрагменти ДНК мають стандартну довжину, оскільки їх взято з єдиної електрофоретичної фракції. Препарат міченої ДНК ділять на чотири порції, і кожну з них обробляють хімічним реагентом, що специфічно модифікує одну або дві з чотирьох азотистих основ ДНК. *Специфічне руйнування* (модифікація) пуринових основ відбувається за допомогою диметилсульфату. При цьому відбувається метилювання аденінових залишків по азоту в положенні 3, гуанінових - по азоту в положенні 7. Обробка зразків ДНК соляною кислотою при 0°C

Розділ 2

призводить до вищеплення метиладеніну. Наступна інкубація при температурі 90°C у лужному середовищі викликає розрив цукрофосфатного ланцюга ДНК у місцях вищеплення основ. Піримідинові основи модифікуються гідразином. Якщо реакцію вести у безсольовому середовищі, то модифікуються як цитозин, так і тимідин; якщо обробку вести у присутності 2 М NaCl, то модифікується лише цитозин. Вказані реакції вибіркової модифікації по кожному типу гетероциклічних основ проводяться таким чином, щоб у кожній молекулі ДНК у середньому модифікувалося лише одна ланка даного типу. Оскільки всі ланки даного типу у складі молекули еквівалентні і реагують з модифікаційним агентом з однаковими швидкостями, то в сумі кожна ланка цього типу виявиться частково модифікованою. Далі, коли ці пошкоджені молекули обробляються піперидином, у ДНК утворюється розрив у тому місці, де знаходилась зруйнована основа. У результаті одержують набір мічених фрагментів, довжини яких визначаються відстанню від зруйнованої основи до кінця молекули. Наприклад, якщо основи G розміщені на відстані 5, 11, 15 та 22 нуклеотидів від міченого кінця, обробка такого ланцюга ДНК реагентом, що руйнує G, призводить до утворення мічених фрагментів завдовжки 5, 11, 15 та 22 нуклеотиди. При цьому, природно, утворюються й фрагменти завдовжки 6, 4 та 7 нуклеотидів (внутрішні фрагменти), але вони не будуть міченими. Набори мічених фрагментів, утворюваних після кожної з чотирьох реакцій, піддають електрофорезу на сусідніх доріжках поліакриламідного гелю, внаслідок чого фрагменти ДНК розділяються відповідно до своїх розмірів. Потім радіоавтографують гель. Набір смуг, реєстрованих на рентгенівській плівці «читають», визначаючи таким чином нуклеотидну послідовність ДНК.

Метод Максама-Гілберта, опрацьований для аналізу первинної структури достатньо довгих молекул ДНК, використовується і для коротких (8-16-ланкових) олігодезоксирибо-

Генетична інженерія

нуклеотидів. Однак у цьому випадку реакції хімічної модифікації проводять у більш жорстких умовах (збільшуючи час та температуру реакції), щоб підвищити ступінь модифікації.

Набір реакцій, що використовується для розщеплення ДНК за мономерними ланками певного типу, достатньо великий і постійно поповнюється.

У даний час широко використовують *два основних варіанти секвенування за Максамом-Гілбертом*.

У *першому* з них реакцію хімічної модифікації ДНК проводять у розчині, а в другому ДНК попередньо іммобілізують на твердому носії (наприклад, ДЕАЕ-целюлозі). Перший метод більш традиційний, його численні модифікації з успіхом використовувалися для секвенування фрагментів ДНК різних розмірів, у тому числі й олігонуклеотидів.

У той же час, *другий метод* має ряд переваг. Він вимагає менших затрат праці й часу, простий у засвоєнні і дає змогу обійтися мінімальним набором обладнання.

У цілому обидва методи забезпечують отримання цілком задовільних результатів, а вибір якогось з них визначається конкретними умовами лабораторії.

Інший сучасний підхід у секвенуванні геномів (так зване *піросеквенування*), який реалізується на автоматизованих секвенаторах, дозволяє визначити послідовність значно швидше, дешевше і при цьому не потребує а ні клонування ДНК, а ні електрофорезу. Одноланцюгові фрагменти, отримані з невеликої кількості геномної ДНК, пришивають 5'-кінцями до мікрокульок (один фрагмент на кульку) та ампліфікують за допомогою ПЛР. Кожну кульку із «пришитими» до неї ампліфікованими ідентичними фрагментами розміщують у мікрореакторі, де здійснюється *ДНК-полімеразна реакція*.

Нуклеозидтрифосфати подаються в реакційну суміш імпульсно один за одним.

Розділ 2

Якщо нуклеотид певного типу виявляється комплементарним матриці та включається у зростаючий ланцюг, пірофосфат, що при цьому звільняється, залучається до низки хімічних реакцій, де остання реакція супроводжується випромінюванням світла (*хемілюмінесценція*). Світловий сигнал фіксується оптичною системою, і послідовність таких сигналів читається як нуклеотидна послідовність. Реакція здійснюється паралельно у 200 тис. Мікрореакторів (для 200 тис. фрагментів, які перекриваються), що дозволяє встановити послідовність приблизно 200 млн пар основ за 4,5 години.

Останнім часом з'явилася нова перспектива *секвенування ДНК* у процесі протягування молекули *через нанопору*. Спеціалісти із Університету Бостона розробили метод підготовки зразка ДНК до секвенування геному, що є значно швидшим і точнішим від існуючих. Окрім того, новий метод дозволяє значно зменшити кількість ДНК, необхідну для аналізу і позбутися дорогого і тривалого етапу ампліфікації ДНК.

Дослідницька група Хаміта Меллера повідомляє про революційну роботу з детекції молекул ДНК, що проходять через нанопори в кремнії. Для продавлювання довгих ниток ДНК через пори (ширина яких становить до 4 нм) дослідники використовують електричне поле. Вимірювання дозволяють фіксувати проходження через нанопору поодинокі молекули нуклеїнової кислоти.

Результати дослідження демонструють можливість визначення і аналізу менших кількостей ДНК, ніж це було можливо до даного часу. Причому, секвенування або профілювання геному з допомогою нанопор дозволить зменшити кількість ДНК, необхідну для аналізу.

У даний час перед секвенуванням ДНК необхідно провести ампліфікацію нуклеїнової кислоти для отримання мільярдів копій, необхідних для процедури розшифрування послідовності пар азотистих основ. Окрім того, що для ампліфікації потрібні додаткові час і

Генетична інженерія

ресурси, процес ампліфікації може призводити до спотворення структури продуктів копіювання нуклеїнової кислоти.

Таким чином, було вирішено використовувати електричні поля, локалізовані біля «вихідних отворів» нанопор для впливу на довгі негативно заряджені нитки ДНК і протягування їх через нанопори, після проходження яких молекула ДНК може бути вивчена детальніше. Такий підхід дозволяє використовувати меншу кількість копій ДНК для подальшого аналізу.

Для розробки нового методу дослідники вивчили електрофізичні явища, що проходять на нанорівні, на якому неможливо повноцінно використовувати принципи макроскопічної фізики. У процесі дослідження було виявлено, що нитки ДНК із великою довжиною проходять через пори із більшою швидкістю. Ця обставина дозволяє говорити про те, що система із нанопор може бути оптимізована для детекції довгих ниток ДНК, що складаються із десятків тисяч і навіть більшої кількості пар азотистих основ. Ця обставина може призвести до істотного прискорення процедури аналізу геному, дозволяючи безпосередньо аналізувати довгі ланцюги ДНК, замість того щоб нарізати їх і відновлювати структуру за фрагментами коротких відрізків.

Оскільки існуючі технології ампліфікації ДНК обмежують розміри аналізованої ДНК тисячою парою основ, то новий метод дозволяє позбутися від процедури ампліфікації, він не лише знижує вартість, часові затрати і рівень помилок, характерні для аналізу ДНК попередніми методами, але й дозволяє вивчати нитки ДНК, значно довші, ніж це можливо внаслідок обмежень, характерних для існуючих методів.

2.5.2. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). *Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - експериментальний метод біохімії, що дозволяє домогтися значного збільшення малих концентрацій певних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі.*

Розділ 2

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

На початку 1970-х р. норвежському вченому *Хьєллу Кленне* із лабораторії нобелівського лауреата Х. Корані прийшла в голову думка, що можна ампліфікувати ДНК за допомогою пари коротких одноланцюгових молекул ДНК – синтетичних праймерів.

У той час ця ідея залишилася без уваги. Зате в 1983 році вона була успішно реалізована *Кері Малліс*. Його метою було створення методу, який би дозволив ампліфікувати ДНК в ході багаторазових послідовностей молекули ДНК за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Через 7 років після опублікування результатів своїх досліджень, у 1993 р, Малліс отримав за створення методу ПЛР Нобелівську премію.

В основі методу ПЛР лежить природний процес - комплементарна добудова ДНК матриці, яке здійснюється за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Ця реакція носить назву *реплікації* (процес самоподвоєння) ДНК. Природна реплікація ДНК включає в себе кілька стадій:

- 1) Денатурація ДНК (розплітання подвійної спіралі ДНК);
- 2) Утворення коротких двохланцюгових ділянок ДНК (затравок, які необхідні для ініціації синтезу ДНК);
- 3) Синтез нового ланцюга ДНК (комплементарна добудова обох ниток).

Кері Малліс довів, що даний процес можна застосувати для отримання копій коротких ділянок ДНК, специфічних для конкретних організмів, тобто здійснювати цілеспрямований пошук таких специфічних ділянок.

Щоб провести денатурацію молекули ДНК, її нагрівають. На початку використання

Генетична інженерія

методу після кожного циклу нагрівання - охолодження доводилося додавати в реакційну суміш нову порцію ДНК-полімерази, так як вона швидко інактивувалася при високій температурі, необхідній для поділу ланцюгів спіралі ДНК. Процедура була дуже неефективною, вимагала багато часу і ферменту.

У 1986р. метод полімеразної ланцюгової реакції було істотно покращено. Було запропоновано використовувати ДНК-полімерази з термофільних бактерій. Ці ферменти виявилися термостабільними і були здатні витримувати безліч циклів реакції. Їх використання дозволило спростити і автоматизувати проведення ПЛР. Одна з перших термостабільних ДНК-полімераз була виділена з бактерій *Thermus aquaticus* і названа Таq-полімераза. Недолік цієї полімерази полягає в тому, що ймовірність внесення помилкового нуклеотиду у неї досить висока, так як у цього ферменту відсутні механізми виправлення помилок (3' → 5' екзонуклеазна активність).

Полімерази Pfu і Pwo, виділені з архей, мають такий механізм, їх використання значно зменшує число мутацій в ДНК, але їх швидкість нижче, ніж у Таq. Зараз застосовують суміші Таq і Pfu, щоб домогтися одночасно високої швидкості полімеризації і високої точності копіювання.

У момент винаходу методу Малліс працював в компанії Цетус (en: Cetus Corporation), яка і запатентувала метод ПЛР. В 1992 р. Цетус продала права на метод і патент на використання Таq-полімерази компанії Хофман - Ла Рош за 300 млн. доларів. Однак виявилось, що Таq-полімераза була охарактеризована російським біохіміком *Олексієм Каледіним* в 1980 році, в зв'язку з чим компанія Промега (Promega) намагалася в судовому порядку змусити Рош відмовитися від виняткових прав на цей фермент. Американський патент на метод ПЛР закінчився в березні 2005 р.

Розділ 2

Проведення ПЛР. Метод заснований на багаторазовому виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів в штучних умовах (*in vitro*). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і тільки в тому випадку, якщо він присутній в досліджуваному зразку. На відміну від ампліфікації ДНК в живих організмах, за допомогою ПЛР ампліфікують відносно короткі ділянки ДНК. При звичайному ПЛР - процесі довжина копійованих ДНК-ділянок становить не більше 3000 пар основ (3 kbp). За допомогою суміші різних полімераз, з використанням добавок і при певних умовах довжина ПЛР-фрагмента може досягати 20-40 тисяч пар нуклеотидів. Це все одно значно менше довжини ДНК еукаріотичної клітини. Наприклад, геном людини складається приблизно з 3 млрд. пар основ.

Суть методу полягає у специфічній ампліфікації ДНК за допомогою полімерази, що здійснює виборчий синтез взаємно комплементарних ланцюгів ДНК, починаючи з двох праймерів (затравок). Праймери комплементарні протилежним ланцюгам ДНК в ділянках, що обмежують обрану область ДНК, і орієнтовані 3'-кінцями назустріч один одному і в бік тієї послідовності, яку необхідно ампліфікувати. Довжина фрагмента визначається відстанню між праймерами. Використовуючи в якості матриці будь-які зразки ДНК, що містять ампліфіціруемого послідовність, можна збільшити кількість копій досліджуваного фрагмента ДНК в сотні мільйонів разів. Таке збільшення, що дозволяє візуалізувати заданий фрагмент ДНК на електрофореграмі, а також використовувати продукт ампліфікації для подальшого вивчення за допомогою інших методів, можна вважати головною перевагою методу ПЛР. Основний недолік цього методу - необхідність знання ДНК-послідовностей, що фланкують досліджуваний ген, для створення праймерів.

Для проведення ПЛР в найпростішому варіанті потрібні такі *компоненти*:

Генетична інженерія

ДНК-матриця, що містить ту ділянку ДНК, яку потрібно ампліфікувати.

Два праймери (затравки, необхідні для ініціації синтезу ДНК), комплементарні протилежним кінцям різних ланцюгів необхідного фрагменту ДНК.

Термостабільна ДНК-полімераза - фермент, який каталізує реакцію полімеризації ДНК. Полімераза для використання в ПЛР повинна зберігати активність при високій температурі тривалий час, тому використовують ферменти, виділені з Термофіли - *Thermus aquaticus* (Taq-полімераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полімераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полімераза) та інші.

Дезоксинуклеозидтрифосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Іони Mg²⁺, необхідні для роботи полімерази.

Буферний розчин, що забезпечує необхідні умови реакції - рН, іонну силу розчину та містить солі, альбумін.

Щоб уникнути випаровування реакційної суміші, в пробірку додають висококиплячу олію, наприклад, вазелінову. Якщо використовується ампліфікатор з кришкою, що підігривається, то цього робити не потрібно.

Додавання пірофосфатази може збільшити вихід ПЛР - реакції. Цей фермент каталізує гідроліз пірофосфату, побічного продукту приєднання нуклеозидтрифосфатів до ланцюга ДНК, що росте, до ортофосфата. Пірофосфат може пригнічувати ПЛР-реакцію.

Праймери. Специфічність ПЛР заснована на утворенні комплементарних комплексів між матрицею і праймерами, короткими синтетичними олігонуклеотидами довжиною 18-30 основ. Кожен з праймерів комплементарний одному із ланцюгів двохланцюгової матриці і обмежує початок і кінець ампліфікуемого фрагмента. Після гібридизації матриці з праймером (відпал), останній служить затравкою для ДНК-полімерази при синтезі комплементарного ланцюжка матриці.

Розділ 2

Найважливіша характеристика праймерів – є температура плавлення (T_m) комплексу праймер-матриця.

T_m - температура, при якій половина ДНК-матриць утворює комплекс з олігонуклеотидним праймером. Температуру плавлення можна приблизно визначити за формулою,

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C),$$

де n_X - кількість нуклеотидів X в праймері.

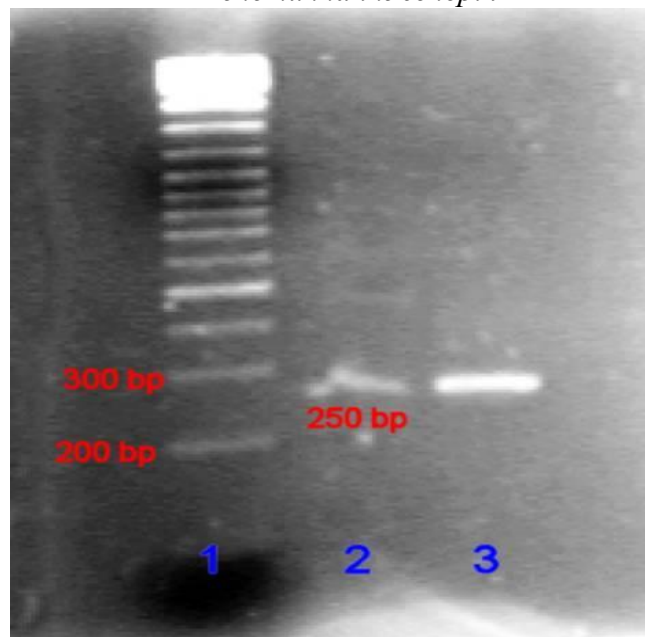
У разі неправильного вибору довжини і нуклеотидного складу праймеру або температури відпалу можливе утворення частково комплементарних комплексів з іншими ділянками матричної ДНК, що може привести до появи неспецифічних продуктів. Верхня межа температури плавлення обмежена оптимальною температурою дії полімерази, активність якої падає при температурах вище 80°C .

При виборі праймерів бажано дотримуватися наступних критеріїв: GC - складу $\sim 40-60\%$; близькі T_m праймерів (відмінності не більше, ніж на 5°C); відсутність неспецифічних вторинних структур - шпильок і димерів; бажано, щоб на 5'-кінці був гуанін або цитозин, оскільки вони утворюють три водневі зв'язки з молекулою матриці, роблячи гібридизацію більш стабільною.

ПЛР проводять в ампліфікаторі - приладі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання пробірок, зазвичай з точністю не менше $0,1^\circ\text{C}$. Сучасні ампліфікатори дозволяють задавати складні програми, в тому числі з можливістю подальшого зберігання ампліфікованих молекул при 4°C . Існують також прилади з автоматичною кришкою і відділенням для мікропланшетів, що дозволяє вбудовувати їх в автоматизовані системи.

Для візуалізації заданого фрагмента ДНК часто використовують *гель-електрофорез*.

Генетична інженерія



Фотографія гелю, що містить маркерну ДНК (1) і продукти ПЛР-реакції (2,3). Цифрами показано довжина фрагментів ДНК в парах нуклеотидів.

Зазвичай при проведенні ПЛР виконується 20-35 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій (рис.2.5.2):

1. **Денатурація.** Двохланцюгову ДНК-матрицю нагрівають до $94-96^\circ\text{C}$ (або до 98°C , якщо використовується особливо термостабільна полімераза) впродовж 0,5-2 хв., щоб ланцюга ДНК розійшлися. Ця стадія називається денатурацією, так як руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК. Іноді перед першим циклом (до додавання полімерази) проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2-5 хв. для повної денатурації матриці і праймерів. Такий прийом називається **гарячим стартом** і дозволяє знизити кількість неспецифічних продуктів реакції.

2. **Відпал.** Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею. Ця стадія називається **відпалом**. Температура відпалу залежить від складу праймерів і зазвичай становить на $4-5^\circ\text{C}$ нижче їх температури плавлення. Час стадії - 0,5-2 хв. Неправильний вибір температури відпалу призводить або до поганого зв'язування праймерів із матрицею (при підвищеній температурі), або до зв'язування в невірному

Розділ 2

місці і появи неспецифічних продуктів (при зниженій температурі).

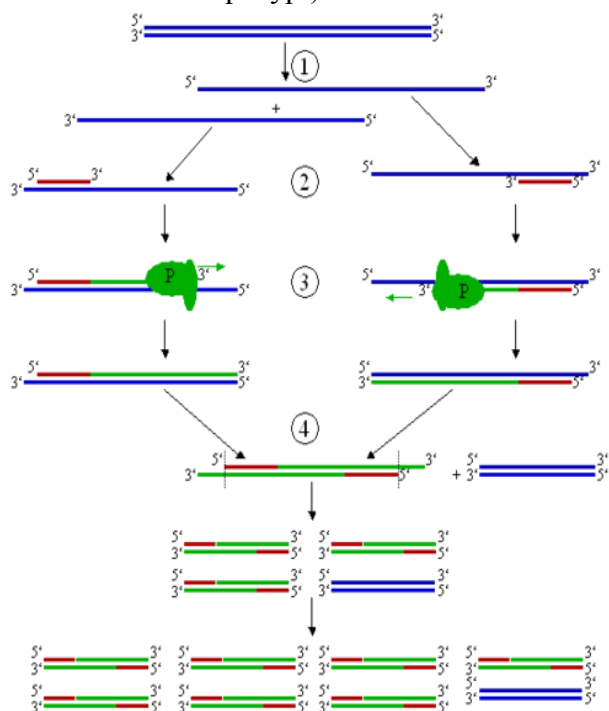


Рис. 2.5.2: Схематичне зображення першого циклу ПЛР. (1) Денатурація при 94-96°C. (2) Відпал при 68 °C (наприклад). (3) Елонгація при 72°C (P = полімераза). (4) Закінчено перший цикл.

3. **Елонгація.** ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як затравку. Це - стадія елонгації. Полімераза починає синтез другого ланцюга від 3'-кінця праймера, який зв'язався з матрицею, і рухається уздовж матриці в напрямку від 3' до 5'. *Температура елонгації* залежить від полімерази. Полімерази Taq і Pfu, що частіше використовуються, найбільш активні при 72°C. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікуемого фрагмента. Зазвичай час елонгації приймають рівним одній хвилині на кожен тисячу пар основ.

Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб побудувати всі одно ланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 7-10 хв.

Два отримані ДНК-ланцюга служать матрицею для наступного циклу, тому кількість заданого фрагмента (амплікона) ДНК в ході кожного циклу подвоюється.

Генетична інженерія

Кількість специфічного продукту реакції (обмежене праймерами) теоретично зростає пропорційно 2^n , де n - число циклів реакції. Насправді ефективність кожного циклу може бути менше 100%, тому в дійсності

$$P \sim (1 + E)^n,$$

де P - кількість продукту, E - середня ефективність циклу.

Число «довгих» копій ДНК теж зростає, але лінійно, тому в продуктах реакції домінує специфічний фрагмент. Зростання необхідного продукту в геометричній прогресії обмежено кількістю реагентів, наявністю інгібіторів, утворенням побічних продуктів. На останніх циклах реакції зростання сповільнюється, це називають «*ефектом плато*».

Різновиди ПЛР. «Вкладена» ПЛР (*Nested PCR (англ.)*) - застосовується для зменшення числа побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК всередині продукту першої реакції.

- «Інвертована» ПЛР (*Inverse PCR (англ.)*) - використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка всередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити сусідні послідовності після вставки ДНК в геном. Для здійснення інвертованою ПЛР проводять ряд розрізання ДНК рестриктазами із подальшим з'єднанням фрагментів (лігування). В результаті відомі фрагменти виявляються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити ПЛР, як зазвичай.

- ПЛР зі зворотною транскрипцією (*Reverse Transcription PCR, RT-PCR (англ.)*) - використовується для ампліфікації, виділення або ідентифікації відомої послідовності з бібліотеки РНК. Перед звичайною ПЛР проводять на матриці мРНК синтез одноланцюгової молекули ДНК і за допомогою ревертази отримують одно ланцюгову кДНК, яка використовується в якості матриці для ПЛР. Цим методом часто визначають, де і коли експресуються данні гени.

Розділ 2

- **Асиметрична ПЛР (англ. Asymmetric PCR)** - проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно один з ланцюгів вихідної ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридизації. ПЛР проводиться як зазвичай, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку.

- **Кількісна ПЛР (Quantitative PCR, Q-PCR (англ.))** - використовується для швидкого вимірювання кількості певної ДНК, кДНК або РНК у пробі.

- **Кількісна ПЛР в реальному часі (Quantitative real-time PCR)** - використовують флуоресцентно мічені реагенти для точного вимірювання кількості продукту реакції по мірі його накопичення.

- **Touchdown (Stepdown) ПЛР (Touchdown PCR (англ.))** - за допомогою цього методу зменшують вплив неспецифічного зв'язування праймерів на утворення продукту. Перші цикли проводять при температурі вище температури відпалу, потім кожні кілька циклів температуру знижують. При певній температурі система пройде через смугу оптимальної специфічності праймерів до ДНК.

- **Метод молекулярних колоній (ПЛР в гелі, англ. Colony - PCR Colony)** - акриламідний гель полімеризують із усіма компонентами ПЛР на поверхні і проводять ПЛР. У точках, що містять аналізовану ДНК, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній.

- **ПЛР з швидкою ампліфікацією решти кДНК (англ. Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR)**

- **ПЛР довгих фрагментів (англ. Long-range PCR)** - модифікація ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10 тисяч підстав і більше). Використовують дві полімерази, одна з яких - Таq-полімераза з високою здатністю (тобто, здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга - ДНК полімераза з 3'-5' ендонуклеазної активністю. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені першою.

Генетична інженерія

- **RAPD PCR (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA PCR)**, ПЛР з випадковою ампліфікацією поліморфної ДНК - використовується тоді, коли потрібно розрізнити близькі по генетичній послідовності організми, наприклад, різні сорти культурних рослин, породи собак або близькоспоріднені мікроорганізми. В цьому методі зазвичай використовують один праймер невеликого розміру (20 - 25 пар основ). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру та ін.), вдається домогтися отримання відмінностей ПЛР для двох організмів.

- **PCR з використанням гарячого старту (англ. Hot-start PCR)** - модифікація ПЛР з використанням парафіну для поділу верхньої (містить буферний розчин, полімераза, матрицю і, якщо необхідно, деіонізованої воду) і нижньої (містить деіонізованої воду, праймери і дезоксирибонуклеотиди) сумішей з метою не допущення раннього змішування компонентів реакції. До початку реакції ампліфікатор необхідно прогріти до температури плавлення парафіну (60-80°C).

Питання до самоконтролю:

1. Методи визначення нуклеотидної послідовності ДНК називаються:

- а) секвенування
- б) зондування
- в) клонування
- г) розрізання

2. Вибіркове збільшення числа копій окремих генів носить назву:

- а) поліплоїдія
- б) ампліфікація
- в) кросинговер
- г) стигматизація

Розділ 2

3. Як векторні молекули можуть бути використанні у генній інженерії:

- а) плазміди
- б) дріжджі
- в) косміди
- г) хромосоми

4. Під час кон'югації бактерій двох штамів А і В було встановлено, що на 3-й хвилині кон'югації ген Str перейшов, а на 5-й хвилині-ген Vas, і на 9-й хвилині-ген Ins. Це свідчить про:

- а) екзон-інтронну організацію геному
- б) мозаїчність нуклеїду у бактерій
- в) лінійне розміщення генів
- г) наявність процесів репарації

5. Під час експериментального дослідження процесу реплікації геному *E. coli* були виявлені невеликі фрагменти синтезованої ДНК. За допомогою якого ферменту утворюється полінуклеотидний тяж?

- а) ДНК-полімерази
- б) ДНКаз
- в) ДНК-залежної РНК-полімерази
- г) нуклеотидази

6. F-плазміди кодують синтез:

- а) білкових речовин, що викликають загибель бактерій того самого виду
- б) статевих ворсинок для перенесення генетичної інформації
- в) ферментів, що викликають інактивацію лікарських препаратів або зменшують проникність клітинної стінки для антибіотиків
- г) ферменту, який руйнує мембрани еритроцитів

7. Метод секвенування при якому замість ферментативного синтезу застосовують хімічне розрізання ланцюга на нуклеотиди певного типу це:

- а) метод Сегнера
- б) метод Максама-Гілберта
- в) метод специфічного руйнування

Генетична інженерія

г) метод піросеквенування

8. Експериментальний метод біохімії, що дозволяє значно збільшити малі концентрації певних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі, це:

- а) полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)
- б) метод полімеразного копіювання
- в) хімічний метод
- г) фізичний метод

9. Для проведення ПЛР в найпростішому випадку скільки потрібно компонентів для реакції:

- а) 2
- б) 4
- в) 6
- г) 8

10. Для візуалізації заданого фрагмента ДНК часто використовують:

- а) дезоксинуклеозидтрифосфати
- б) буферний розчин
- в) термостабільну ДНК-полімераза
- г) гель-електрофорез

Тема 2.6. Технологія рекомбінантних ДНК



2.6.1 Технологія створення рекомбінантних молекул. Рекомбінантна ДНК (recombinant DNA, rDNA) — молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії (молекулярне клонування).

В технології рекомбінантної ДНК загалом використовують паліндромну послідовність, яка після відповідних маніпуляцій має тупі та липкі кінці. За допомогою технології рекомбінантної ДНК можливо привнести в геном одного організму певний ген, виділений з геному іншого організму, створюючи таким чином генетично

Розділ 2
модифікований організм. *Технологія рекомбінантної ДНК і генетична рекомбінація є різними поняттями.*

Білки, синтезовані в результаті експресії рекомбінантної ДНК називаються рекомбінантними білками. Інколи, під час присутності привнесеної молекули ДНК в геномі, експресія протеїну не відбувається. В цьому випадку вимагається використання специфічних векторних систем та певної структури ДНК конструкції (присутність специфічних промоторів, термінаторів та ін.)

Вперше ідея про створення рекомбінантної ДНК виникла у *Пітера Лоббана*, аспіранта професора *Дейла Кайзера* з факультету біохімії при медичній школі Стенфордського університету. Перші публікації про створення та вдале використання рекомбінантної ДНК датовані 1972 та 1973рр. Після цього, Стенфордський університет у 1974р. подав заявку на патент за темою «Рекомбінантна ДНК» за згодою інвесторів *Стенлі Коена* та *Герберта Боєра*. Патент був затверджений у 1980р.

Першим продуктом, отриманим з використанням технології рекомбінантних ДНК був людський інсулін, створений компанією *Genetech* та ліцензованим *Eli Lilly and Company*.

Технологія створення рекомбінантної ДНК. Для створення молекули рекомбінантної ДНК необхідно пройти декілька етапів:

- виділення потрібного (цільового) гена
- вбудова гена в специфічну ДНК послідовність (вектор), здатну до реплікації в клітині-хазяєві
- введення вектора в організм-реципієнта
- визначення (скринінг) та відбір клітин, в геномі яких виявлена присутність гена

Створення рекомбінантної ДНК відбувається завдяки *методу молекулярного клонування*. Це є неосновний метод, але найбільш поширений.

Спочатку за допомогою рестриктаз отримують різного роду фрагменти ДНК, в

Генетична інженерія

тому числі й послідовності, що кодують гени. Фрагменти ДНК можуть мати як тупі так і липкі кінці. В результаті, різноманітні фрагменти ДНК можливо комбінувати між собою за допомогою різноманітних методів, наприклад *методом рестрикційно - лігазного методу*, *методом Гібсона (Gibson assembly)* та ін.

Після введення чужорідної ДНК у геном організму-господаря, рекомбінантна ДНК-конструкція може експресуватись. В деяких випадках експресія не відбувається.

Подібним чином підготовлюють і вектор (наприклад плазмиду рBR322). Таку плазмиду розрізають за унікальним сайтом розщеплення рестриктазою PstI, добудовують до 3'-кінців отриманої лінійної форми плазмиди гомополімерні олігодезоксинуклеотидні послідовності, комплементарні 3'-кінцям гена. Молекули гена і вектора змішують і проводять «відпал», тобто створюють умови, при яких ген і вектор поєднуються один з одним за допомогою комплементарних зв'язків між липкими кінцями.

2.5.2. Способи та методи введення рекомбінантного гена в клітину. Будь-яка система клонування має містити два взаємопов'язані компоненти - вектор і реципієнтні клітини. У генно-інженерних експериментах реципієнтні клітини відіграють подвійну роль.

На першому етапі після маніпуляцій з молекулами ДНК *in vitro* вони слугують для виділення із суміші рекомбінантних молекул потрібного типу. Потім їх використовують для ампліфікації клонованих генів, отримання продукту тощо. Плазмідні вектори вводять у реципієнтні клітини методом трансформації. Ефективність трансформації бактерій залежить від їх здатності пропускати ДНК крізь клітинну стінку. Для деяких видів бактерій, наприклад *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, трансформація природна. Але такі клітини, як *E.coli*,

Розділ 2

гідролізують лінійну трансформуючу ДНК. Тому їх трансформація відбувається тільки у окремих штамів, де порушена система деградації ДНК.

Придатним для трансформації клітин *E.coli* виявився метод, що ґрунтується на здатності Х ДНК проходити у ці бактерії після обробки їх на холоді хлористим кальцієм. Це явище було відкрито *М. Манделем* та *А. Хіга* у 1970 р. Метод виявився придатним і для трансформації клітин *E.coli* плазмідами. Так, ефективність трансформації клітин *E. coli* плазмідною рBR322 за цим методом досягає 10⁸ трансформантів на 1 мкг ДНК. Універсальним методом підготовки бактеріальних клітин до трансформації є обробка їх поліетиленгліколем. При цьому кількість трансформантів досягає 10⁷ на 1 мкг плазмиди рBR322. Клітини бактерій, що втратили свою стінку частково (сферопласти) або повністю (протопласти), але зберегли цитоплазматичну мембрану, також можна використовувати для трансформації.

Проте на грамнегативні бактерії цей метод не поширився через складність будови їх клітинної стінки. Як реципієнтні клітини здебільшого використовують штами, мутантні за системою рестрикції, попереджаючи тим самим розщеплення трансформуючої ДНК в ід дії рестриктази *EcoR* I.

Якщо під час клонування генів треба дотримуватися заходів безпеки, використовують спеціальний штам *E.coli* з множинними мутаціями. Вони утворюють міні-клітини (клітини, що не містять ДНК) і життєздатні лише в лабораторних умовах, оскільки розмножуються тільки на штучних субстратах. У природних екосистемах вони гинуть.

Трансформацію протопластів *B.subtilis* готазмідною ДНК вперше здійснили *А. Чанг* і *С. Коен* у 1979 р. Як виявилось, протопласти *B.subtilis* ефективно трансформуються плазмідною ДНК будь-якої форми, включаючи й мономерні молекули. Це вказує на відмінність механізмів проникнення ДНК у клітину при трансформації бактерій та їх

Генетична інженерія

протопластів. Щодо клітин *Pseudomonas*, то їх, так саме як і клітини *E.coli*, трансформують після обробки на холоді хлористим кальцієм.

Однак ефективність їх трансформації на порядок нижча за *E.coli*. Клітини *Streptomyces* трансформують на протопластах. Ефективність цього процесу підвищується у присутності поліетиленгліколю. Фагові вектори і створені на їх основі рекомбінантні ДНК вводять у клітини *E.coli* за допомогою трансформацією, що у даному разі називається **трансфекцією**, а також інфікуванням реципієнтних клітин реконструйованими *in vitro* фагами, що містять рекомбінантну ДНК. Генетичні маркери селекції відіграють важливу роль у проведенні генно-інженерних робіт.

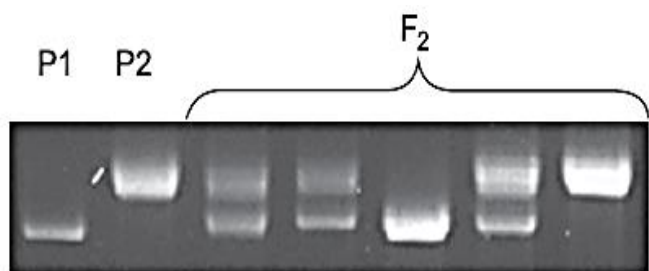
2.5.2. Групи маркерних генів, їх характеристика. *Генетичний маркер (genetic marker):* мутантний ген, або поліморфна унікальна ділянка геному, що використовується для генетичного картування з метою локалізації положення інших генів.

Класичний генетичний маркер відповідає гену, алелі якого мають чітко виражені відмінності на рівні фенотипу.

Біохімічний маркер (білковий маркер) відповідає гену, алелі якого мають відмінності (різну молекулярну масу) на рівні білкового продукту.

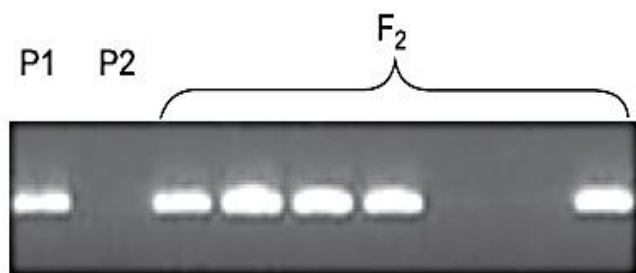
ДНК-маркер відповідає гену або некодуєчій ділянці геному, різні варіанти (алелі) якого відрізняються на рівні ДНК. ДНК-маркери або молекулярно-генетичні маркери, поліморфна ознака, що виявляється методами молекулярної біології на рівні нуклеотидної послідовності ДНК, для певного гена або для будь-якої іншої ділянки хромосоми при порівнянні різних генотипів, особин, порід, сортів, ліній.

Кодомінантний тип успадкування маркера - метод аналізу маркера дозволяє виявити обидва алелі.



Домінантний тип спадкування маркера

- метод аналізу маркера дозволяє виявити лише одну алель.

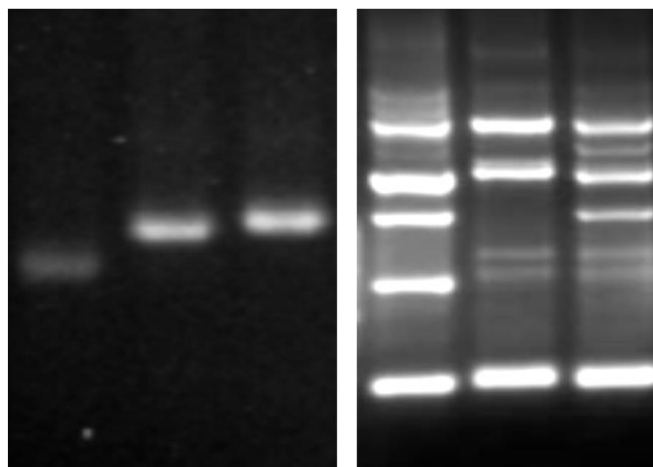


В даний час налічується кілька десятків типів молекулярних маркерів. Їх поділяють на три групи, згідно основного методу аналізу:

	Монолокусні	Мультилокусні
Блот - гібридизація	RFLP ₁₉₈₀	мінісателіти 1985
Полімеразно - ланцюгова реакція (ПЛР)	SSR ₁₉₈₉ STS ₁₉₈₉ SSCP ₁₉₈₉ CAPS ₁₉₉₃ SCAR ₁₉₉₃	RAPD ₁₉₉₀ ISSR ₁₉₉₄ AFLP ₁₉₉₅ SSAP ₁₉₉₇ IRAP ₂₀₀₆
ДНК - чипи	SNP ₁₉₉₈	DArT ₂₀₀₁

Відмінності на рівні ДНК (поліморфізм ДНК) можуть бути виявлені: - за допомогою гібридизації з відомими нуклеотидними послідовностями; при секвенуванні нуклеотидної послідовності; при порівнянні довжини фрагментів, отриманих за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); в результаті обробки ДНК ендонуклеазами рестрикції.

Розрізняють маркери з відомою локалізацією і маркери, про локалізацію яких нічого не відомо (як правило, це *мультилокусні маркери*).



Приклади монолокусного (ліворуч) SSR-маркера та мультилокусного (праворуч) RAPD-маркера.

Молекулярні маркери з невідомою локалізацією не можна використовувати для маркування певного гена або хромосоми;

Їх успішно застосовують в філогенетичних дослідженнях, для паспортизації сортів рослин і порід тварин

Найважливіше полягає в тому, що результати, засновані на аналізі одного генного локусу, являють собою дані про еволюцію тільки цього локусу і можуть не співпадати з даними для іншої послідовності того ж генома і слабо відображати історію виду в цілому.

Переваги мультилокусних маркерів полягають в аналізі значно більшої і різної у функціональному плані частини геному.

Монолокусні маркери: складання молекулярних карт хромосом і геномів; картування генів і QTL (Quantitative trait locus); маркування генів, хромосом і геномів; порівняльна генетика і геноміка; відбір за допомогою ДНК-маркерів в селекції; геномна селекція (тільки SNP-маркери); молекулярна паспортизація сортів /порід; діагностика захворювань; екологічний моніторинг; дослідження генетичного різноманіття; філогенетичні дослідження; генетика популяції.

Розділ 2

Мультилокусні маркери: складання молекулярних карт хромосом і геномів (тільки AFLP- і DArT-маркери); картування генів і QTL (тільки AFLP- і DArT-маркери); геномна селекція (DArT-маркери); молекулярна паспортизація сортів / порід; екологічний моніторинг; дослідження генетичного різноманіття; філогенетичні дослідження; генетика популяції.

На вибір ДНК-маркерів відповідного типу для вирішення конкретного завдання впливають і такі характеристики, як рівень внутрішньовидового поліморфізму і можливість автоматизації процесу аналізу поліморфізму ДНК.

Методи мультилокусних маркерів ДНК:

1. Молекулярна гібридизація ДНК - це метод, що дозволяє оцінити ступінь загальної подібності ДНК у різних організмів при попарному порівнянні. На молекулярній гібридизації всієї геномної ДНК або окремих її фракцій засновані самі перші роботи по геносистематиці. У сучасних порівняльно-молекулярних дослідженнях більш популярний метод гібридизації по Саузерну.

2. Рестрикційний аналіз виявляє зміни у довжині фрагментів геномної ДНК, що виникають при розщепленні специфічними ферментами рестрикції, тому цей метод називають ще **методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ)**. До втрати ділянок впізнавання рестриктаз призводять варіації в послідовності геномної ДНК, викликані точковими нуклеотидними замінами, а також інверсіями, делеціями і інсерціями.

3. Метод RAPD-PCR дозволяє різноспрямовано в кожному ланцюзі ампліфікувати ділянки ДНК, обмежені послідовністю, комплементарною випадковому праймеру - штучно синтезованій олігонуклеотидній послідовності (Williams et al. 1990; Welsh, McClelland, 1990; Welsh, McClelland, 1991).

Генетична інженерія

Методи мультилокусного аналізу ДНК зручні, але мають певні технічні та концептуальні обмеження.

Використання маркерів RAPD, AFLP, IS-PCR та ISSR-PCR в філогенетичному аналізі припускає, що продукти ампліфікації гомологічні, незалежні і варіабельні. Але: 1) різні фрагменти однакового розміру при електрофоретичному аналізі можуть займати однакове положення на гелі; 2) деякі фрагменти можуть ампліфікуватися до рівня нижчого роздільної здатності, отже, не будуть виявлені (Smith et al., 1994); 3) можливі артефактні смуги, що з'являються через неспецифічність праймерів, гетеродуплексів та інших помилок.

Єдина ознака, яка може бути визначена з цих маркерів без додаткового дослідження, - це присутність / відсутність ампліфікованого фрагмента ДНК. Можна відрізнити домінуючу гомозиготу від гетерозиготи і рецесивну гомозиготу від неампліфікованої послідовності. Підрахувати частоти алелей в типовому випадку неможливо, в той час як монолокусні маркери аналізують саме алелі з частотами.

I. RAPD маркери – маркери отримані за результатами випадкової ампліфікації ДНК (Williams et al, 1990). RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA – поліморфізм випадково ампліфікованих фрагментів

- Проведення полімеразної ланцюгової реакції з використанням одного декануклеотидного праймера з довільною нуклеотидною послідовністю.

- Продукти RAPD аналізу утворюються в результаті ампліфікації фрагмента геномної ДНК, що фланкується інвертованою послідовністю даного праймера.

- Послідовність праймерів не абсолютно будь-яка, а обмежена в межах 40-70% вмісту GC і 50-100% лінгвістичної складності нуклеотидної послідовності.

- У RAPD використовують як поодинокий праймер, так і декілька RAPD праймерів.

Як правило, праймер, що виявляє високий поліморфізм для одного виду, буде також ефективний і для інших видів

Розділ 2

Властивості: Висока чутливість до змін умов реакцій; досить низька температура відпалу (37°C) - (збільшена ймовірність утворення продуктів ампліфікації з великою кількістю не парних основ); RAPD маркери поведуться як домінуючі і їх гетерозиготний стан не відрізняється від гомозиготного, тому знижується точність оцінки при аналізі популяцій і при ідентифікації генетичних ресурсів у порівнянні з кодомінуючими маркерами; низька відтворюваність результатів ПЛР; для підвищення достовірності необхідна велика вибірка; RAPD аналіз може служити своєрідним експрес - методом виявлення генетичного поліморфізму, що особливо актуально для маловивчених таксономічних груп, а також як джерело унікальних локус - специфічних маркерів.

Діагностичні можливості RAPD-технології успішно проілюстровані на численних прикладах опису генетичної різноманітності мікроорганізмів, вищих рослин, безхребетних і хребетних тварин.

RAPD аналіз може слугувати своєрідним експрес - методом виявлення генетичного поліморфізму, що особливо актуально для маловивчених таксономічних груп, а також як джерело унікальних локус - специфічних маркерів.

II. ISSR маркери - маркери засновані на міжмікросателітних послідовностях (Zietkiewiczetal., 1994) ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat*).

- Використовується один або кілька праймерів довжиною 15-24 нуклеотидів.

- Праймери комплементарні повторюваним ділянкам геному, таким як мікросателіти.

- Мікросателітна ДНК - ДНК з коротких тандемних повторів довжиною від 1 до 6 пар основ.

- Використовуються у визначенні спорідненості, приналежності до конкретної популяції, для дослідження гібридизації.

- Мікросателіти характеризуються високою швидкістю зміни послідовностей, обумовленої

Генетична інженерія

«проковзуванням» при реплікації ДНК і точковими мутаціями.

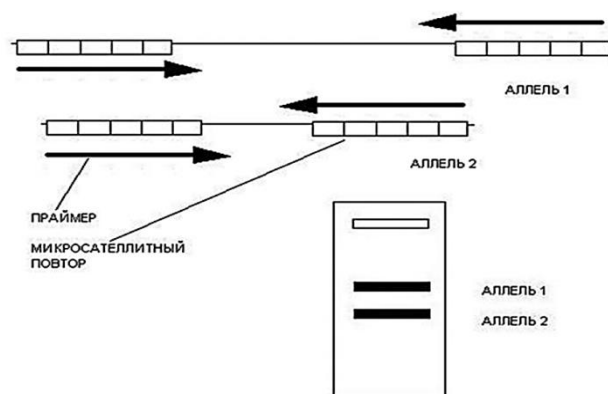


Схема ISSR аналізу (Zietkiewiczetal., 1994; Guptaetal., 1994; Bornet, Branchard, 2001)

Властивості: домінуючий тип успадкування; відносно висока точність і покращена відтворюваність в порівнянні з RAPD у зв'язку з більшою довжиною праймера і більше високою температурою відпалу; однак локалізація в геномі продуктів ампліфікації, так само як і функція, залишаються невідомими .

У геномах рослин і тварин кількість мікросателітних повторів дуже велика, що робить цей метод зручним для генетичного аналізу. Мікросателітні послідовності оточують багато генів і можуть використовуватися як базові послідовності до цих генів.

III. AFLP маркери – маркери поліморфізму довжин ампліфікованих фрагментів ДНК (Vosetal., 1995). AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AFLP аналіз - складний метод аналізу, що складається з декількох етапів. При аналізі використовується праймер із штучно доданої послідовністю.

- Геномна ДНК піддається рестрикції двома рестриктазами (EcoRI і MseI) з утворенням фрагментів з виступаючими 3'-кінцями.

- Рестрикційна геномна ДНК лігується з адаптером, що містить «липкі» кінці для даних рестрикційних сайтів.

- Далі проводяться дві послідовні ПЛР: У першій ПЛР використовуються праймери повністю комплементарні адаптерам EcoRI і

Розділ 2

MseI, в результаті чого утворюється велика кількість продуктів ампліфікації між адаптерами EcoRI і MseI, які неможливо диференціювати з допомогою електрофорезу. Тому в другій ПЛР праймери з адаптерами EcoRI і MseI містять на 3'-наприкінці додаткові та некомплементарні адаптерам основи (від 1 до 3) для селективної ампліфікації.

- Розподіл фрагментів ДНК проводять у поліакриламідному гелі з радіоактивною або з флуоресцентною міткою.

Одержуваний фінгенпринт ДНК зазвичай високо поліморфний і як правило добре відтворюваний

- Поліморфізм AFLP вище, ніж RAPD та ISSR.
- Метод дозволяє визначати генетичні зміни, викликані точковими мутаціями в сайтах рестрикції або в ділянках відпалу праймерів (присутність або відсутність продукту ампліфікації в спектрі) і невеликими вставками і (або) делеціями всередині рестрикційного фрагмента (зміна розміру смуги в спектрі).

- Молекулярно-генетичні маркери легко картуються на хромосомах.

IV. SSAP маркери - маркери поліморфізму специфічно ампліфікованих послідовностей SSAP – Sequence Specific Amplification Polymorphism

- Є модифікацією методу AFLP, для виявлення поліморфізму як за сайтом рестрикції, так і за вставкою в геномну ДНК транспозону або ретротранспозону;

- Геномна ДНК досліджуваних зразків розщеплюється рестриктазами PstI і MseI, виходять фрагменти з виступаючими 3'-кінцями.

- Рестрикційна ДНК лігується з PstI і MseI адаптерами.

- Перша ПЛР (преампліфікація) проводиться з праймерами від PstI і MseI адапторів, тобто ампліфікуються всі можливі комбінації поєднання цих адаптерів в рестриційованій геномній ДНК.

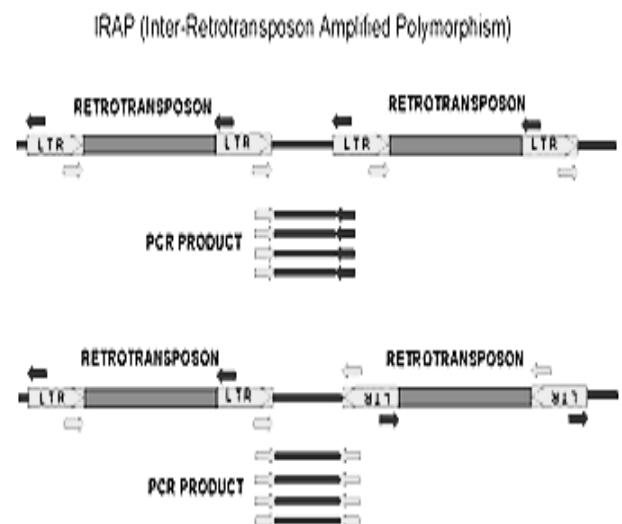
Генетична інженерія

- Після першої ПЛР утворюється велика кількість продуктів ампліфікації фрагментів ДНК, локалізованих між праймерами і адаптерами.

- Друга ПЛР проводиться з міченим праймером до LTR і будь-яким праймером адапторів, або з PstI або MseI. Можна використовувати праймери до адапторів з додатковими нуклеотидами на 3'-кінці, що не комплементарні адаптору.

Продукти ампліфікації утворюються в результаті ампліфікації фрагменту ДНК між послідовністю LTR ретротранспозону і адаптором.

V. IRAP маркери - маркери поліморфізму ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонів (Shulman, 2006). IRAP – Inter Retrotransposone Amplified Polymorphism



- Полімеразна ланцюгова реакція між праймерами, комплементарними послідовностям двох поруч розташованих LTR ретротранспозонів.

- Продукт ПЛР-ампліфікації геномної ДНК є стабільним генетичним IRAP-маркером. Поліморфізм в даному випадку обумовлений або мутацією в ділянці зв'язування праймера, або унікальним біологічним процесом – ретротранспозицією, в результаті вбудовування ретротранспозону в нову ділянку геномної ДНК без втрати первинної ділянки.

Розділ 2

Генетична інженерія

Питання до самоконтролю:

1. Молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії (молекулярне клонування), це:

- а) термінальна ДНК
- б) репараційна ДНК
- в) реплікативна ДНК
- г) рекомбінантна ДНК

2. Які етапи передбачає технологія створення рекомбінантної ДНК:

- а) виділення потрібного (цільового) гена
- б) вбудова гена в специфічну ДНК послідовність (вектор), здатну до реплікації в клітині-господарі
- в) введення вектора в організм-реципієнта
- г) визначення (скринінг) та відбір клітин, в геномі яких виявлена присутність гена

3. Одно- або дволанцюгові олігонуклеотиди, призначені для поєднання молекул з несумісними кінцями, це :

- а) лінкери
- б) адаптери
- в) сайти рестрикції
- г) рибозими

4. Молекули РНК, які мають ферментативну активність (як правило, якості автокаталізу), це:

- а) лінкери
- б) адаптери
- в) сайти рестрикції
- г) рибозими

5. Мутантний ген, або поліморфна унікальна ділянка геному, що використовується для генетичного картування з метою локалізації положення інших генів, це є:

- а) мутон
- б) маркер
- в) реплікон
- г) цистрон

6. Як називається маркер, який відповідає гену, алелі якого мають чітко виражені відмінності на рівні фенотипу:

- а) біохімічний маркер
- б) ДНК - маркер
- в) класичний генетичний маркер
- г) фізіологічний маркер

7. Як називається маркер, який відповідає гену, алелі якого мають відмінності (різну молекулярну масу) на рівні білкового продукту:

- а) біохімічний маркер
- б) ДНК - маркер
- в) класичний генетичний маркер
- г) фізіологічний маркер

8. Як називається маркер, який відповідає гену або некодуючій ділянці геному, різні варіанти (алелі) якого відрізняються на рівні ДНК:

- а) біохімічний маркер
- б) ДНК - маркер
- в) класичний генетичний маркер
- г) фізіологічний маркер

9. Які існують типи успадкування маркерів:

- а) домінантний тип
- б) рецесивний тип
- в) кодомінантний тип
- г) наддомінантний тип

10. В даний час налічується кілька десятків типів молекулярних маркерів. На скільки груп їх поділяють, згідно основного методу аналізу:

- а) 2
- б) 3
- в) 4
- г) 5

Тема 2. 7. Створення геномних бібліотек та

клонотек генів



2.7.1. Типи бібліотек ДНК. Отримання бібліотеки ДНК за допомогою вірусних або плазмідних векторів. Якщо геном будь-якого організму розрізати, вставити в плазмідні або вірусні вектори і ввести в клітину, то в такому вигляді його можна зберегти. При розрізанні плазмідної або фагової ДНК ймовірність випадання цілих і не змінених ділянок геному досить висока. Такий спосіб отримання геномної бібліотеки отримав назву *«метод дробовика»*, так як геном в даному випадку представлений окремими фрагментами. Принципи створення плазмідних та вірусних векторів загальні, тому розглянемо їх на прикладі плазмідних. Слід зазначити, що з вірусних ДНК краще використовувати ДНК фаги, тому що вони мають велику ємність і дозволяють вставляти більші фрагменти геному. Очищені кільцеві молекули ДНК обробляють рестриктазою, отримуючи лінійну ДНК. Клітинну ДНК обробляють тією ж рестриктазою, додають до плазмідної і додають лігазу.

Таким чином, отримують рекомбінантну плазмідну ДНК, яку вводять в бактеріальні або дріжджові клітини. Плазмідна реплікується з утворенням багатьох копій. Багато плазмід несуть ген стійкості до антибіотиків, і якщо у рекомбінантної плазміди є такий ген, то ці клітини легко виявляти, вирощуючи в середовищі з антибіотиком.

Кожна така колонія являє собою клон або потомство однієї клітини. Плазмідні однієї колонії містять клон геномної ДНК, а *сукупність плазмід можна назвати бібліотекою геномної ДНК.*

Недолік такого методу в тому, що фрагменти ДНК утворюються у величезній кількості. Розрізання геномної ДНК

визначається випадком, тому лише частина фрагментів містять повноцінні гени. Деякі фрагменти можуть містити тільки частину гена або ж інтронні послідовності.

Отримання бібліотек кДНК з відібраних популяцій мРНК. Створення кДНК починається з синтезу на матриці РНК за допомогою зворотної транскриптази комплементарної нитки ДНК. Потім створюють лужні умови, які руйнують ланцюг РНК на нуклеотиди, після чого за допомогою ДНК-полімерази синтезують комплементарний ланцюг ДНК. При цьому утворюється фрагмент ДНК з тупими кінцями. Таку ДНК вбудовують в плазмідні і вводять в клітину бактерій. При ампліфікації плазмідні утворюється клон комплементарної копії ДНК (кДНК). Переваги клонів ДНК перед клонами геномної ДНК в тому, що вона кодує білок нуклеотидних послідовностей гена і не переривається. Гени еукаріот містять інтрони, які повинні вилучатися з транскрипційної РНК перед перетворенням її в матричну, після чого слідує сплайсинг. Бактеріальні клітини не можуть здійснювати таку модифікацію РНК, що утворилася шляхом транскрипції гена еукаріотичної клітини. Тому, якщо бажають отримання білка шляхом експресії клонованого гена, то краще використовувати банк кДНК, отриманий на основі матричної РНК.

Потрібну нуклеотидну послідовність в зразку ДНК можна виявити за допомогою ДНК-зонда. Для цього, ДНК спочатку переводять в одноланцюгову форму, піддавши її тепловій обробці або впливу лугом. У цих умовах водневі зв'язки розриваються і ланцюги розходяться. Цей метод широко застосовується для локалізації радіоактивного матеріалу в клітині, зрізі тканини або на пластині гелю після електрофорезу суміші макромолекул. Для реєстрації радіоактивних зон на досліджуваний зразок накладають рентгенівську плівку, в якій під дією радіоактивного випромінювання з броміду срібла утворюється металеве срібло. «Засвічені» ділянки, відповідні радіоактивним зонам, спостерігаються візуально після

Розділ 2

проявлення плівки. Одним з варіантів радіоавтографії є флюорографія. Метод заснований на тому, що низькоенергетичні Р-частинки, що утворюються при розпаді ізотопу (наприклад, тритію), взаємодіють з молекулами сцинтилятора, при цьому енергія радіоактивного розпаду перетворюється в світлову енергію, яка і реєструється рентгенівською плівкою, чутливої до синьої області спектра. Всі операції при радіоавтографії необхідно проводити в темряві, щоб не засвітити плівку.

Дуже важливою частиною застосування радіоавтографії є виявлення радіоактивного ДНК-зонду після його гібридизації з препаратом ДНК, підданим електрофоретичному розділенню. На жаль, провести гібридизацію в самому гелі неможливо, оскільки зонд не може в нього проникнути. Тому ДНК після електрофорезу переносять на нітроцелюлозний або нейлоновий фільтр за методом Саузерн (Саузерн-блоттінг). Розташування молекул ДНК на фільтрі в точності відповідає співвідношенню у гелі. Перенесену на фільтр ДНК піддають денатурації і фіксують, а потім проводять гібридизацію з радіоактивним ДНК-зондом. Гібридозаційний сигнал реєструють радіоавтографічними методами. Як не радіоізотопну мітку часто використовують біотин, який приєднують до одного з чотирьох dNTP. Для виявлення зонду на фільтр наносять кон'югат стрептавідину з відповідним ферментом (наприклад, лужною фосфатазою). Стрептавідин утворює комплекс з біотином, який видно хоча б з того, що під дією ферменту утворюється забарвлена або люмінесцентна речовина - продукт перетворення нанесеного на фільтр субстрату.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

- її сутність описана в темі 2.5 (2.5.2.)

Методи секвенування ДНК.

Секвенування ДНК за Сангером: «плюс-мінус» метод. Першим методом прямого ферментативного секвенування ДНК став метод, запропонований Ф. Сангер і Д. Коулсон

Генетична інженерія

в 1975р. В якості матриці в реакції полімеразного копіювання використовувався одноланцюговий фрагмент ДНК, як праймери - синтетичні олігонуклеотиди або природні субфрагменти, які одержують при гідролізі рестрикційними ендонуклеазами, а в якості ферменту - фрагмент ДНК полімерази I (PolI) з *E.coli*. Метод включає два етапи. Спочатку в обмежених умовах проводять полімеразну реакцію в присутності всіх чотирьох типів dNTP (один з них був мічений по альфа-положенню фосфату), отримуючи на виході набір продуктів не повного копіювання матричного фрагмента. Суміш очищають від не зв'язаних дезоксинуклеозидтрифосфатів і ділять на вісім частин. Після чого в «плюс» системі проводять чотири реакції в присутності кожного з чотирьох типів нуклеотидів, а в «мінус» системі - без будь-якого з них. В результаті, в «мінус» системі термінація відбувається перед dNTP даного типу, а в «плюс» системі - після нього. Отримані таким чином вісім зразків ділять за допомогою електрофорезу, «зчитують» сигнал і визначають послідовність вихідної ДНК. Цим способом була секвенована коротка ДНК фага φX174, що складається з 5386 нуклеотидних пар.

Секвенування ДНК за Сангер: метод «термінаторів». У 1977р. автор «плюс-мінус» методу запропонував ще один спосіб ферментативного секвенування, який отримав назву **методу термінуючого аналогу трифосфатів**. Більш потужний і більш технологічний, цей спосіб дещо модифікований і застосовується до теперішнього часу. В основі методу - ферментативне копіювання за допомогою фрагмента ДНК полімерази I з *E.coli*. Як праймери використовують синтетичні олігонуклеотиди. Специфічну термінацію синтезу забезпечують додаванням в реакційну суміш окрім чотирьох типів dNTP (один з яких був радіоактивно мічений за альфа розташуванню фосфату) ще й одного з 2', 3'-дідезоксинуклеозидтрифосфатів (ddATP, ddTTP, ddCTP або ddGTP), який здатний включатися в

Розділ 2

зростаючий ланцюг ДНК, але не здатний забезпечувати подальше копіювання через відсутність 3'-ОН групи. Співвідношення концентрацій dNTP / ddNTP автори підбирали експериментально, так щоб в результаті отримати набір копій ДНК різної довжини.

Таким чином, для визначення первинної структури досліджуваного фрагмента ДНК необхідно провести чотири реакції копіювання: за одним типом термінаторів у кожній з реакцій. Після цього отримані продукти «розгонялися» в поліакриламідному гелі на сусідніх доріжках і за розташуванням смуг визначалася послідовність нуклеотидів.

Секвенування ДНК за Максом і Гілбертом: метод хімічної деградації. У 1976р. А. Максом і У. Гілбертом був розроблений метод секвенування, заснований на специфічній хімічній деградації фрагмента ДНК радіоактивно міченого з одного кінця. Препарат міченої ДНК розділяли на чотири аліквоти і кожен обробляли реагентом. А. Максом і У. Гілберт запропонували модифікувати пуринові підстави диметилсульфатом. При цьому відбувається метилювання аденінових залишків за азотом в положенні 3, а гуанінових – за азотом в положенні 7. Обробка зразка ДНК соляною кислотою при 0°C призводить до вищеплення метіладеніну. Подальша інкубація при температурі 90°C в лужному середовищі викликає розрив цукрово-фосфатного ланцюга ДНК у місцях вищеплення основ. Обробка піперидином призводить до гідролізу зразка за залишками метілгуаніна. Піримідинові основи модифікують гідразинном. Якщо реакцію вести в солоному середовищі, то модифікуються як цитозин, так і тимідин, а якщо обробку вести в присутності 2М NaCl, то модифікується лише цитозин. Розщеплення ланцюга ДНК на фрагменти і в цьому випадку здійснюється піперидином. Умови реакцій автори підбирали таким чином, щоб в результаті отримати повний набір субфрагментів різної довжини. Подальший електрофорез в поліакриламідному

Генетична інженерія

гелі дозволяє відновити повну структуру досліджуваного фрагменту.

Автоматичне секвенування ДНК. В основі автоматичного секвенування лежить вже згаданий вище метод ферментативного секвенування з використанням термінуючого ddNTP. Як і класичний варіант Сангера, автоматичне секвенування включає дві стадії: проведення термінуючої реакції і поділ продуктів цих реакцій за допомогою електрофорезу. Як правило, автоматизована лише друга стадія, тобто поділ мічених фрагментів ДНК, отримання спектра емісії флуорофорів і подальша обробка зібраних даних. Таким чином, автоматичне секвенування ідеологічно відрізняється від сучасного йому ручного секвенування тільки за типом використовуваної мітки. Флуоресцентну мітку включають або в праймер, або в термінатор транскрипції згідно з такими схемами: мічений праймер (чотири різних барвника) і не мічених терм.

Регуляція рівня синтезу білка в існуючих експресійних системах досягається за рахунок використання промоторів, рівень активності яких (тобто кількість актів ініціації синтезу мРНК за одиницю часу) може бути штучно змінено, і / або шляхом зміни числа копій вектора, що визначається ділянкою, що є відповідальна за реплікацію.

Регульовані промотори. Більшість промоторів, що використовуються для експресії генів в Е. coli отримані з грамположитивних бактерій і бактеріофагів. Класичним прикладом регуляції експресії генів у прокариот в природі є лактозний оперон, тому саме його компоненти використовуються в багатьох регульованих промоторах. Сам lac промотор, як і схожий з ним lacUV5, є досить слабким і рідко використовується для вискоєфективного синтезу продукту (Yanisch-Perron et al., 1985). Синтетичні промотори tac і trc, що включають (-35) район trp промотора і (-10) район lac промотора, є значно сильнішими і забезпечують рівні експресії до 15-30% загального клітинного білка (de Boer et al.,

Розділ 2

1983; Brosius et al., 1985). Такі промотори контролюються репресором лактозного оперону: синтез продукту досягається внесенням в середовище аналога лактози IPTG. Подібну структуру і регуляцію має гібридний промотор T5 у векторах серії pQE фірми Qiagen. Однією з альтернатив регуляції експресії є використання пізнього промотора фага T7 (Tabor and Richardson, 1985; вектори серії PET фірми Novagen), який специфічно транскрибується РНК-полімеразою фага. При цьому ген T7 РНК-полімерази клонується *in trans* під контролем промотора lacUV5, індукціруемого IPTG. Хоча ця система забезпечує рівні експресії до 30-50% загального білка (Vaneux, 1999), вона не позбавлена недоліків. Наприклад, високі рівні мРНК можуть викликати деградацію рибосом, а базовий рівень експресії T7 РНК-полімерази - призводити до нестабільності плазміди (Miroux and Walker, 1996). Більш того, навіть «порожні» PET вектори можуть бути токсичні для клітини в присутності IPTG (Miroux and Walker, 1996).

Загальним недоліком всіх похідних lac промотора слід вважати досить високий базовий рівень експресії, що перешкоджає високоефективній експресії білків, які можуть бути токсичними для клітини. Так, діапазон регулювання Plac промотора становить всього 80-100 разів, що обумовлює досить високий рівень його активності за відсутності індуктора (Guzman et al., 1995, Yanisch-Perron et al., 1985). Ця проблема зберігається і для векторів серії PET, оскільки ген T7 РНК-полімерази в цих системах клонується під контролем і має досить високий базовий рівень експресії промотора lacUV5, індукціруемого IPTG. Іншим регульованим промотором, що використовується є araBAD - промотор арабінозного оперону E. coli, який комерціалізуваний фірмою Introgen. Цей промотор володіє широким діапазоном регулювання, проте він є менш ефективним, ніж, наприклад, тас промотор (Guzman et al., 1995). Крім того, недоліком цієї системи є гетерогенність клітинної популяції в умовах

Генетична інженерія

неповної індукції промотора, коли в деяких клітинах спостерігається повна індукція, в той час як в інших - її відсутність (Siegele and Hu, 1997).

Поряд з бактеріальними промоторами для регульованої експресії використовуються також РНК-полімерази клітини-господаря промотори фагів, зокрема PL промотор фага лямбда. Репресія цього промотора досягається за рахунок експресії температуро чутливого мутанта лямбда-репресора CI857, індукція відбувається при підвищенні температури з 30°C до 42°C (Elvin et al., 1990). Основним недоліком цієї системи експресії також є високий базовий рівень експресії, обумовлений як не повною репресією мутанта CI білком, так і тим що PL промотор є не активно індукованим (Giladi et al., 1995).

Експресія білків з використанням регульованих елементів фага лямбда. Як приклад розглянемо дві системи. В одному випадку для контролю експресії клонованих генів використовують систему регуляторних елементів лактозного оперона, в іншому - систему промотор-репресор-оператор фага лямбда. Принцип регуляції експресії рекомбінантних генів в обох випадках такий самий. В векторні молекули вводяться регуляторні послідовності фага лямбда або lac-оперону, за якими слідує послідовності нуклеотидів полілінкера з декількома унікальними сайтами рестрикції, за якими проводиться клонування досліджуваного гена. Одночасно в той же вектор вводиться ген-регулятор, який кодує білок-репресор. За відсутності індукує вплив молекули репресора, ген якого експресується конститутивно, зв'язуються з оператором, перешкоджаючи взаємодії РНК-полімерази з промотором, під контролем якого перебуває клонований рекомбінантний ген. Це призводить до різкого зниження рівня транскрипції клонованого гена.

Електрофорез білків - спосіб поділу суміші білків на фракції або індивідуальні білки, заснований на русі заряджених білкових макромолекул різної молекулярної ваги у

Розділ 2

стаціонарному електричному полі.

Електрофорез білків застосовують як для аналізу компонентів суміші білків, так і для отримання гомогенного білка. Найбільш поширеним варіантом електрофоретичного аналізу білків є електрофорез білків у поліакриламідному гелі з Леммлі.

Існує безліч різновидів і модифікацій даного методу, які використовуються (або використовувалися в певні періоди розвитку біохімії і молекулярної біології) в різних галузях:

- Електрофорез у вільному середовищі (без підтримуючого середовища).
- Електрофорез з рухомою межею.
- Зональний електрофорез без підтримуючого середовища.
- Зональний електрофорез у підтримуючому середовищі з капілярною структурою.
- Електрофорез білків у крохмальному гелі.
- Електрофорез білків у поліакриламідному гелі (ПААГ).
- Електрофорез білків в агарозному гелі.
- Електрофорез на фільтрувальному папері.
- Електрофорез білків на ацетат-целюлозній мембрані.
- Електрофорез в колонках і блоках гранульованого підтримуючого середовища - капілярний електрофорез.

Електрофорез білків розділяється на: одновимірний і двовимірний (2D) електрофорез, препаративний і аналітичний, а також електрофорез нативних білків і електрофорез в присутності детергенту (в денатуруючих умовах).

Різновидом методу електрофорезу є **ізотахофорез**.

У разі використання імунологічних методів для виявлення розділених білків - **імуноелектрофорез**.

Залежно від конструкції електрофоретичного апарату розрізняють **горизонтальний** і **вертикальний електрофорез білків**.

У загальному значенні під **імуноблотингом** розуміють аналіз суміші

Генетична інженерія

білків, перенесених на тверду підложку - мембрану, з якої вони зв'язуються ковалентними зв'язками, з подальшою імунодетекцією.

Аналізувати можна суміш білків, безпосередньо нанесену на підложку - **дот-блот аналіз** - або після її попереднього фракціонування методами електрофокусовки, диск-електрофорезу або двовимірного електрофорезу - **вестерн-блот аналіз** (*Western blotting*).

Така методологія застосовується також для відбору клонів бактерій, фагів або вірусів, що експресують продукти клонованих генів. Перенесення білків на мембрану здійснюється або пасивно, або з використанням апаратури для електропереносу. На ефективність переносу білків на мембрану впливає безліч факторів, таких як молекулярна маса білків, пористість гелю, час перенесення і склад буферного розчину (транс-буфера). Залежно від завдань і умов проведення експерименту підбирають умови перенесення, щоб забезпечити найкращі результати.

В якості підложки зазвичай використовують нітроцелюлозні, полівінілідендіфлуорідні (ПВДФ) або позитивно заряджені нейлонові мембрани. Нітроцелюлоза може пов'язувати до 80-100 мкг білка на 1 см². Низькомолекулярні білки (з молекулярною масою менше 20 кДа) можуть бути загублені в результаті промивок після електропереносу, що знижує чутливість, однак використання глутарового альдегіду для фіксації білків або нітроцелюлози з дрібними порами (0,2 мкм) значно знижує ці втрати. Великі білки (більше 100 кДа), денатуровані в розчині додецилсульфату натрію (SDS), можуть слабо переноситися на мембрану, якщо в транс-буфері присутній етанол. Спирт значно покращує перенесення білків з SDS-поліакриламідного гелю, але звужує пори в гелі, що і призводить до затримки великих білків. Мембрана ПВДФ оптимізована для проведення імунодетекції і здатна утримувати специфічно зв'язалися білки до 160 мкг/см² при дуже

Розділ 2

низькому рівні неспецифічного зв'язування. Важлива властивість цієї мембрани - можливість її багаторазового використання. Нейлонові мембрани Zeta-Probe ефективно пов'язують SDS-білки за відсутності спирту, причому це зв'язування є стійким до подальшої обробки. Низькомолекулярні білки також утримуються ефективно. Завдяки високому об'єднанню - близько 480 мкг білка на 1см² - мембрани Zeta-Probe дозволяють виявляти остаточну кількість білка в аналізованих сумішах. Після того, як антиген виявляється імобілізованим на мембрані, центри зв'язування, що залишилися блокують розчинами желатину, або альбуміну, або знежиреного молока. Потім мембрану інкубують в розчині поліклональних або моноклональних антитіл до досліджуваного антигену. Після відмивання незв'язаних антитіл мембрану інкубують в розчині вторинних антитіл, які являють собою кон'югат ферментів лужної фосфатази (alkaline phosphatase, AP) або пероксидази (horseradish peroxidase, HRP) з антивидовими антитілами (козячі антитіла до імуноглобулінів кроля, миші або людини) або білками А.

Методика трансформації клітин *E. coli* плазмідної ДНК. Трансформація *E. coli* за допомогою плазмідної і бактеріальної ДНК відрізняється деякими особливостями адсорбції і поглинання ДНК у порівнянні з трансформацією у інших бактерій і може бути здійснена тільки в лабораторних умовах. Мабуть, трансформуюча ДНК при цьому на початкових стадіях зазнає набагато менші зміни, ніж у тих бактерій, для яких трансформація є природним процесом; вона майже не фрагментується і не утворює одностикових молекул. Однак, всередині клітини лінійна ДНК значною мірою руйнується АТФ-залежною - ДНКазою. Цим, мабуть, пояснюється та обставина, що трансформація за допомогою хромосомної ДНК успішно проходить лише в клітинах, позбавлених цього ферменту (*recBC sbcB*). Крім того, в таких клітинах відсутня і

Генетична інженерія

активність екзонуклеази I. Таке поєднання мутацій повертає клітині здатність до рекомбінації. Вважається, що рекомбінація при цьому проходить йде за рахунок інших механізмів, ніж у клітинах вихідного генотипу - шлях *recF*.

Використовують також інший клас мутантів - *recBC sbcA*. У ньому відсутня активність АТФ-залежної ДНКазы, але з'являється активність іншої екзонуклеази - так званої екзонуклеази VIII. Молекулярні механізми рекомбінації повністю не з'ясовані, але шлях, за яким у мутанта *recBC sbcA* відбувається рекомбінація, називається **шляхом *recE***. Реципієнтні клітини в більшості випадків використовують штами C600*hsdR-hsdM-* і HB101*hsdR-endA-recA-*. Мутація *hsdR*, блокуючи клітинну систему рестрикції, зберігає тим самим клонучі фрагменти від дії рестриктази *EcoK*. Мутації *endA-* і *RecA-* запобігають розщепленню трансформуючої ДНК клітинними нуклеазами. Після проникнення ДНК (інфекційної фагової або плазмідної) в клітину немає подальшого включення цієї ДНК в хромосому. ДНК більших за розмірами плазмід має гіршу здатність до трансформації, ніж ДНК дрібних плазмід. Одночасне додавання до клітин будь-яких інших ДНК знижує вихід трансформантів незалежно від походження конкуруючої ДНК і її розмірів. Якщо для трансформації брали мономірну лінійну ДНК плазмиди pBR322, попередньо перетворену в лінійну, то кількість трансформантів у порівнянні з суперзкрученою формою в клітинах штаму з непорушеною здатністю до рекомбінації зменшилося в 100-1000 разів. Якщо в якості реципієнтів використовували мутанти *recA*, *recBC* і *recF*, то кількість трансформантів за допомогою суперзкрученості ДНК залишалось без зміни, а ефективність трансформації за допомогою лінійної ДНК зменшувалася ще більше, ніж в клітинах вихідного генотипу (додатково в 10-40 разів). Ймовірно, в клітини кишкової групи бактерій, що стали компетентними після обробки хлористим кальцієм, може проникати

Розділ 2

кільцева плазмідна ДНК, зазнаючи розривів (на відміну від грам позитивних мікроорганізмів). Якщо ДНК штучно перетворювали в лінійну, то вона з достатньою низькою частотою реціркуляризувалася в клітині (як у бацил, пневмококів та стрептококів). При цьому перетворення лінійної форми в кільцеву відбувалося за рахунок внутрішньомолекулярної рекомбінації між прямими повторами. Для цього процесу необхідні рекомбінаційні системи клітини (зокрема, в наявності АТФ-залежної ДНК-ази, утворення якої у кишкової палички детермінується генами *recBC*) і було полегшено у димеризованих форм плазмід. Застосування так званих *tonB*-мутантів, у яких змінена структура клітинної стінки, на додаток до мутацій *recBC sbcAB* дозволяє підвищити частоту утворення трансформантів. Культура кишкової палички має різну здатність до трансформації після обробки хлористим кальцієм в різні періоди зростання. На самому початку і кінці зростання культури трансформантів майже не виникає. Найбільше їх число утворюється, якщо беруть клітини в середині-початку логарифмічної фази зростання. Цікаво, що саме на цей період припадає максимальне зниження числа життєздатних клітин після відповідних обробок і спостерігається найбільше «витікання» ферментів, розташованих в периплазмі з клітин у навколишнє середовище. Таким чином, у *E. coli* є стадія зростання, на якій може бути повідомлена компетентність при трансформації, і в цей період клітини найбільш «тендітні». Оптимальне значення рН для трансформації за кальцієвою методикою є 7-8. Насичують концентрації ДНК при трансформації кишкової палички трохи вище, ніж у більшості мікроорганізмів - близько 10 мкг/мл. Залежність кількості трансформантів від концентрації ДНК при ненасичених концентраціях близька до лінійної. Частота появи трансформантів, число компетентних клітин у культурі за кальцієвою методикою становить лише незначну частину популяції.

Найбільше трансформантів утворюється, якщо використовувати ДНК з молекулярною вагою 10-30 мегадальтон. Є непрямі дані, які свідчать про те, що трансформуюча ДНК кишкової палички проникає в клітину маючи двох ланцюгову структуру і в подальшому не утворює одониткових структур.

Трансформація за допомогою плазмідної ДНК може здійснюватися і за допомогою методу заморожування-відтавання клітин. Ефективність трансформації була не нижче, ніж при вживанні кальцієвого методу. Методика зводиться до нетривалого заморожування бактеріальних клітин спільно з ДНК при -70°C і подальшого відтавання при 37°C . Поглинання ДНК відбувається дуже швидко.

У момент відтавання, менш, ніж за хвилину; обробка ДНКазою від талої суспензії вже не перешкоджає трансформації. Судячи по швидкості поглинання ДНК тут відбувається поглинання ДНК не протопластоподібними структурами, а інтактними клітинами. За кальцієвою методикою застосовується комбінація таких впливів як витримування клітин в холоді і їх обробка хлористим кальцієм. Хлористий кальцій може бути замінений хлористим барієм або хлористим рубідієм. Інкубація при 37°C обов'язкове для генетичної трансформації. Іони кальцію діють лише при 37°C , тобто на заключних етапах обробки клітин.

Механізми проникнення ДНК різняться залежно від застосування тієї чи іншої методики і мало вивчені. У разі виникнення компетентності при заморожуванні - відтаванні клітин *E. coli* ДНК поглинали протопласти, а інтактні клітини, у яких через відповідну обробку різко змінюється проникність для макромолекул. Сам молекулярний механізм такого поглинання невідомий. Існують різні гіпотези щодо ролі хлористого кальцію при застосуванні кальцієвого способу отримання компетентних клітин *E. coli*. Іонам кальцію приписувалася певна роль в нейтралізації негативних зарядів клітинної поверхні, що може сприяти адсорбції також негативно

Розділ 2

заряджених макромолекул ДНК. Припускали, що хлористий кальцій може денатурувати певні білки на поверхні клітини, що також сприяти адсорбції і проникненню ДНК в клітину, або діяти на ліпіди клітинної стінки. Є припущення про активацію їм ферментів - фосфоліпаз, що впливають на проникність, або гіпотетичних у *E. coli* ферментів, які беруть участь в активному транспорті ДНК. У всякому разі, ця обробка скорочує кількість життєздатних клітин, можливо, пошкоджуючи їх клітинні стінки; є зворотна залежність між виживанням клітин і частотою генетичної трансформації після кальцієвої обробки.

Головний етап в молекулярному клонуванні - введення рекомбінантних ДНК в бактеріальні клітини. В основі більшості методів бактеріальної трансформації лежить спостереження, згідно з яким обробка бактерій хлористим кальцієм збільшує ефективність поглинання ними молекул ДНК. Вихід трансформантів в більшості випадків становить 105-107 на 1 мкг інтактної ДНК бактерії. Модифікаціями основного методу намагалися збільшити ефективність трансформації у різних штамів бактерій. Можна підібрати умови, в яких штами бактерій відтворюють 107-108 трансформантів на 1 мкг інтактної ДНК. Слід враховувати, що компетентна, тобто здатна поглинати плазмідну ДНК, є тільки невелика фракція клітин (в трансформації бере участь лише 1 з 10000 молекул ДНК).

Після проникнення в бактерію відбувається реплікація плазмідної ДНК і починається експресія маркерів стійкості до лікарських препаратів, в результаті чого трансформанти набувають стійкості до антибіотика. Бактерії здатні поглинати ДНК протягом короткого періоду часу, але в результаті витримування з агентами, що підвищують ефективність трансформації, більшість бактеріальних штамів набуває здатність зберігати стан компетентності протягом 1-2 днів. Компетентні клітини можна приготувати в великих кількостях, перевірити і зберігати замороженими.

Генетична інженерія

Головний етап в молекулярному клонуванні - введення рекомбінантних ДНК в бактеріальні клітини. В основі більшості методів бактеріальної трансформації лежить спостереження, згідно з яким обробка бактерій хлористим кальцієм збільшує ефективність поглинання ними молекул ДНК. Вихід трансформантів в більшості випадків становить 105-107 на 1 мкг інтактної ДНК бактерії. Модифікаціями основного методу намагалися збільшити ефективність трансформації у різних штамів бактерій. Можна підібрати умови, в яких штами бактерій відтворено дають 107-108 трансформантів на 1 мкг інтактної ДНК. Слід враховувати, що компетентна, тобто здатна поглинати плазмідну ДНК, є тільки невелика фракція клітин (в трансформації бере участь лише 1 з 10000 молекул ДНК). Після проникнення в бактерію відбувається реплікація плазмідної ДНК і починається експресія маркерів стійкості до лікарських препаратів, в результаті чого трансформанти набувають стійкості до антибіотика. Бактерії здатні поглинати ДНК протягом короткого періоду часу.

2.7.2. Методи скринингу бібліотек та клонотек ДНК з метою виявлення певних генів. Раніше було розглянуто принципи клонування фрагмента ДНК. Але звідки береться цей фрагмент? Для того, щоб працювати з певною ділянкою ДНК (наприклад, певним геном) спочатку здійснюють клонування великої кількості різноманітних фрагментів геному створюють бібліотеку клонів, серед яких уже шукають потрібний.

Стандартна процедура створення бібліотеки – **метод дробовика** – розпочинається з часткової (протягом обмеженого часу) обробки всієї геномної ДНК певною рестриктазою – для того, щоб отримати набір різноманітних фрагментів, які перекриваються, причому, середня довжина цих фрагментів становить ~20 тис. пар основ

Розділ 2

(рис. 2.7.1). Усі такі фрагменти вбудовують у вектори, і здійснюють трансформацію. Бактерії висівають на тверде середовище таким чином, що б кожна колонія походить від однієї клітини. Отже, **набір колоній** – це набір різноманітних клонів, кожен з яких містить один із фрагментів геному. Аналогічно створюють бібліотеки клонів **кДНК** (комплементарна ДНК-копія молекули мРНК).

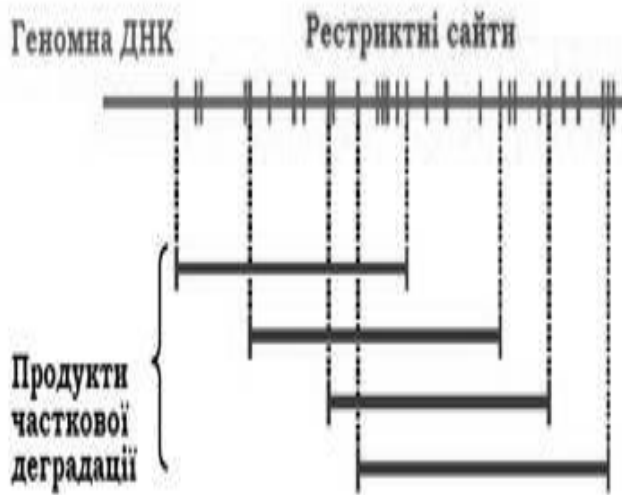


Рис.2.7.1. Метод дробовика.

Для цього спочатку виділяють сумарну мРНК із клітин певного типу. Використовуючи зворотну транскриптазу та оліго(dT), які є комплементарними 3' -кінцевим polyA-хвостам мРНК, як праймери, на цих мРНК синтезують комплементарні ланцюги ДНК. Видаляють ланцюг РНК РНК-азою і добудовують другий ланцюг ДНК за допомогою фрагмента Кленова ДНК-полімерази I. Далі отримані молекули кДНК піддають клонуванню. На відміну від геномної бібліотеки, бібліотека клонів кДНК містить тільки кодуючі послідовності (екзони) генів і тільки таких, котрі є активними в клітинах даного типу.

Потрібну нуклеотидну послідовність серед бібліотеки клонів можна знайти за допомогою гібридизації клонованої ДНК із

Генетична інженерія

радіоактивно міченим ДНК-зондом (рис. 2.7.2).

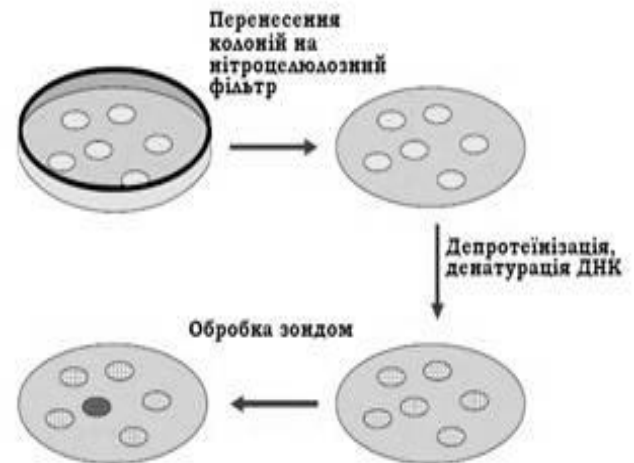


Рис. 2.7.2. Гібридизація клонованої ДНК із радіоактивним зондом на нітроцелюлозному фільтрі

Колонії бактерій з чаші Петрі переносять на нітроцелюлозний фільтр – створюють своєрідну репліку. Здійснюється лізис клітин, депротейнізація та денатурація ДНК у лужному розчині. Після висушування фільтра одноланцюгова ДНК необоротно фіксується на ньому. Фільтр обробляють радіоактивно міченою ДНК певної послідовності – зондом. Якщо зонд є комплементарним ДНК-клону, відбувається гібридизація – ренатурація дволанцюгової ДНК. Детектування цього факту за допомогою авторадіографії дозволяє ідентифікувати розшукуваний клон.

Зрозуміло, що описаний скринінг бібліотеки клонів залежить від наявності зонда. Одна з можливостей приготувати зонд базується на відомостях про амінокислотну послідовність білка того гена, клон якого потрібно відшукати (або білка-гомолога іншого організму). Хімічний синтез короткого олігонуклеотиду (~20 нуклеотидів) із послідовністю, що відповідає фрагменту амінокислотної послідовності білка й тому має бути комплементарною ділянці ДНК клону, дозволяє отримати зонд. Після внесення радіоактивної мітки такий олігонуклеотид можна використати для гібридизації. Проте, зважаючи на виродженість генетичного коду, бажано синтезувати набір послідовностей, які відповідають усім можливим комбінаціям кодонів для даної ділянки послідовності

Розділ 2

амінокислот. Суміш таких альтернативних олігонуклеотидів, один із яких є напевно комплементарним, і використовують як зонд.

Замість синтезу набору олігонуклеотидів можна обійтися синтезом лише одного зонда, використовуючи базу даних EST (*Expressed Sequence Tag*).

База є загальнодоступною колекцією великої кількості коротких (200 – 400 пар основ) фрагментів послідовностей кДНК багатьох організмів. Щоб приготувати зонд, достатньо знайти в EST-базі коротку ділянку, яка відповідає фрагменту послідовності білка, і синтезувати її.

Питання до самоконтролю:

1. Отримати бібліотеки ДНК можна за допомогою векторів:

- а) вірусних
- б) плазмідних
- в) бактеріальних
- г) космід

2. Бібліотека геномної ДНК - це:

- а) сукупність плазмід
- б) сукупність вірусів
- в) сукупність бактерій
- г) сукупність космід

3. Потрібну нуклеотидну послідовність в зразку ДНК можна виявити за допомогою:

- а) космід
- б) плазмід
- в) ДНК-зонда
- г) агарози

4. Методом прямого ферментативного секвенування ДНК є :

- а) метод Сегнера «плюс-мінус»
- б) метод Максама-Гілберта
- в) метод Сегнера «термінаторів»
- г) метод піросеквенування

5. Як називається метод секвенування, заснований на специфічній хімічній деградації

Генетична інженерія

фрагмента ДНК, радіоактивно міченого з одного кінця:

- а) метод Сегнера «плюс-мінус»
- б) метод Максама-Гілберта
- в) метод Сегнера «термінаторів»
- г) метод піросеквенування

6. В основі автоматичного секвенування є метод ферментативного секвенування з використанням термінуючого ddNTP, це є:

- а) метод Сегнера «плюс-мінус»
- б) метод Максама-Гілберта
- в) метод Сегнера «термінаторів»
- г) метод піросеквенування

7. Спосіб поділу суміші білків на фракції або індивідуальні білки, заснований на русі заряджених білкових макромолекул різного молекулярного ваги в стаціонарному електричному полі це:

- а) електрофорез
- б) дот-блот аналіз
- в) скринінг аналіз
- г) радіографія

8. Стандартна процедура створення бібліотеки –це:

- а) метод електрофорезу
- б) метод скринінгу
- в) метод дробовика
- г) метод ДНК- зонда

9. Головні ферменти, які приймають участь в реплікації:

- а) РНК-полімераза
- б) ревертаза
- в) рестриктаза
- г) ДНК-полімераза

10. Як називається база з загальнодоступною колекцією великої кількості коротких (200 – 400 пар основ) фрагментів послідовностей кДНК багатьох організмів?

- а) EST
- б) TES
- в) ECT
- г) ETS

Література

1. Дейвис К. Анализ генома. Методы. М.: Мир, 1990. 246 с.
2. Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж, Р. Уолден Генная инженерия растений: Лабораторное руководство. М.:Мир, 1991. 408с.
3. Кандиба Н.М. Генетика: курс лекцій. Суми: ВТД «Університетська книга», 2013. 397 с.
4. Краців Р.Й., Колотницький А.Г., Буцяк В.І. Генетична інженерія. Львів, 2008. 214 с.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. Мир, 1984. 480 с.
6. Сингер М. Гены и геномы: в 2 т. Т.1. М.: Мир, 1999. 369 с.
7. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. 359 с.
8. Сиволоба А.В., Рушковський С.Р., Кириченко С.С. та ін. Генетика. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 320 с.
9. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. М.: Мир, 1983. 1077 с.
10. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК: Краткий курс. М.:Мир, 1986. 288 с.
11. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ.пособие. 2-е изд., испр. и допол. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. 496 с.
12. Sudbery P. Human molecular genetics. Harlow, Addison Wesley Longman Limited, 1998. 311 p.
13. Lewin B. Genes V. Oxford: Oxford University Press, 1999. 1272 p.
14. Ed. F.M. Ausubel et al. Short protocols in molecular biology N.Y., John Wiley & Sons, 1995. 850p.
15. Singer M., Berg P. Genes and genomes. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1991. 929p.
16. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. Recombinant DNA. N.Y.: W.H. Freeman and Co., 1992. 626 p.



3. Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК- паспортизація



Тема 3.1. Методи отримання генетично модифікованих рослин



3.1.1. Методи генетично модифікованих рослин.

З часу піонерських робіт у галузі генної інженерії рослин перелік завдань, які вирішують дослідники, значно розширився. Якщо перші дослідження були зосереджені, насамперед, на трансформації рослин за ознаками, що можуть мати певне значення для сільського господарства (стійкість до вірусів, певних гербіцидів та шкідників), то зараз спектр питань в цьому напрямку значно більший. Можна згадати про генно-інженерні рослини, що мають стійкість до посухи та інших абіотичних стресів; відстрочений час дозрівання плодів та модифікований час цвітіння; рослини зі зміненим жирнокислотним складом та зі зміненим метаболізмом, що дозволяє синтезувати нові сполуки в рослині; рослини зі збалансованим складом окремих компонентів; рослини, здатні очищати довкілля від органічних та неорганічних поллютантів; рослини, здатні синтезувати різноманітні фармпрепарати (табл. 3.1.1).

Передумовою розвитку генної інженерії рослин стали процеси, що відбуваються в природі без участі людини. Природним чином трансформація рослин здійснюється за допомогою ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens*. При пошкодженні рослини в ній починає синтезуватись специфічна речовина, у відповідь на цей хімічний сигнал *A. tumefaciens* приєднується до мембрани рослинної клітини, після чого відбувається перенос частини Т-ДНК бактеріальної плазміди (Ті-плазміди) в ядро рослинної клітини. Т-ДНК вміщує гени, що кодують ферменти синтезу фітогормонів, які викликають збільшення розмірів рослинних клітин та їх проліферацію. Крім того, рослинні клітини починають синтезувати опін, що кодується Т-ДНК, який може використовувати

тільки *A. tumefaciens*. Таким чином, у процесі еволюції сформувався механізм перетворення рослинної клітини на "фабрику" з виробництва речовини -джерела вуглецю та нітрогену (опіну) виключно для потреб *A. tumefaciens*.

Щоб використати природну здібність *A. tumefaciens* попадати в рослинні клітини для доставки в них клонованих генів, були створені модифіковані Ті-плазміди. З Т-ДНК видаляли гени фітогормонів та гени метаболізму опіну та вбудовували таку змінену Т-ДНК у плазмиду.

Таблиця 3.1.1. Завдання, що вирішуються при створенні біотехнологічних рослин

1. Якість продукції	<ul style="list-style-type: none"> • Метаболізм вуглеводів • Колір • Тривалість зберігання • Метаболізм жирних кислот • Стійкість • Затримка дозрівання фруктів • Зменшення вартості переробки
2. Стійкість до шкідників	<ul style="list-style-type: none"> • Бактерій • Грибів • Комах • Нематод • Вірусів
3. Агрономічні показники	<ul style="list-style-type: none"> • Стійкість до посухи • Резистентність до гербіцидів • Гібридні системи • Зменшення потреби в азотному живленні • Стійкість до засолення • Стійкість до температурних факторів
4. Енвайронментальні біотехнології	<ul style="list-style-type: none"> • Деградація <i>in situ</i> органічних поллютантів • Фіторемедіація важких металів
5. Синтез фармпрепаратів та інших сполук	<ul style="list-style-type: none"> • Синтез вакцин, гормонів, фармацевтичних білків та моноклональних антитіл • Синтез мономерів біодеградуючого пластику

Вбудований в Т-ДНК ген-мішень попадає разом з нею в ядро рослинної клітини-реципієнта. У випадку бінарної системи човниковий вектор з клонованим у Т-ДНК геном вводять в штам *Agrobacterium*

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

tumefaciens, що несе модифіковану плазмиду з геном, необхідним для переносу Т-ДНК, у клітину рослини (віг-генами). Крім того, розроблена також коінтегративна система, яка дозволяє введення човникового вектору в *A. tumefaciens*, де він рекомбінує з неонкогенною Ті-плазмидою, що несе віг-гени, з утворенням плазмиди, в якій є і функціонуючі віг-гени, і Т-ДНК з клонованим геном. Ділянки Т-ДНК *A. tumefaciens* використовували для введення генів у різні рослини. На жаль, ця система може бути застосована не для всіх видів рослин.

Ефективним методом доставки ДНК у різні рослинні клітини є також бомбардування мікрочастинками (біолістика), метод мікроін'єкцій ДНК, соматична гібридизація та деякі інші, більш сучасні методи (табл. 3.1.2).

Таблиця 3.1.2. *Методи введення чужорідної ДНК у клітини рослин*

Метод	Коментарі
Використання Ті-плазмід	Високоєфективна система, але може бути використана не для всіх видів рослин
Бомбардування мікрочастинками	Використовується для великого кола рослин і тканин, простий та дешевий метод
Використання векторів на основі повноцінних вірусів (Full virus strategies)	Ефективний метод трансформації рослин, але може бути застосований лише для обмеженого числа видів рослин
Використання векторів на основі "розібраних" вірусів (Deconstructed virus strategies)	Ефективний метод трансформації рослин, забезпечує контроль за експресією принесених генів
Мікроін'єкція	Має обмежене використання, оскільки одночасно ін'єкцію можливо зробити тільки в одну клітину
Електропорація	Може бути використана тільки лише для введення генів у протопласти, з яких можливо регенерувати життєздатні рослини
Злиття ліпосом	Може бути використане для введення генів лише в протопласти, з яких можливо регенерувати життєздатні рослини

Для забезпечення експресії чужорідних генів і введення в рослинні клітини використовують різні промотори. Розроблені також методи вбудовування чужорідних генів безпосередньо в хлоропласту та мітохондріальну ДНК так, що кодований білок синтезується прямо в цих органелах.

Системи трансформації повинні відповідати таким вимогам:

- Забезпечувати стабільну інтеграцію чужорідної ДНК у геном господаря без структурних ушкоджень принесеної ДНК.
- Інтегрувати якомога більше число копій ДНК.
- Забезпечити стабільність нового генотипу впродовж багатьох генерацій.
- В ідеалі, забезпечити тканино-специфічну регуляцію та онтогенез-специфічну регуляцію принесеного гена.

Системи переносу генів за допомогою *A. tumefaciens* ефективно працюють тільки у випадку деяких видів рослин. Зокрема, однодольні рослини, включаючи головні зернові культури (рис, пшеницю, кукурудзу), практично не трансформуються *A. tumefaciens*.

Однак, дещо модифікувавши методику і контролюючи умови, вдалося трансформувати кукурудзу та рис агробактеріями *A. tumefaciens*, які несуть вектори - похідні Ті-плазмід. Для цього, наприклад, незрілі зародки кукурудзи поміщали на кілька хвилин у суспензію клітин *A. tumefaciens*, а потім інкубували кілька днів у відсутності селективного тиску, після чого зародки переносили в середовище з антибіотиками, в якому могли рости тільки трансформовані рослинні клітини. Клітини витримували в темноті протягом кількох тижнів, потім переносили на інше поживне середовище та інкубували на світлі з метою регенерації цілої трансформованої рослини.

Деякі з методів трансформації вимагають руйнування клітинної стінки з утворенням протопластів. Останні підтримують в культурі як клітини, що ростуть незалежно або у відповідному поживному середовищі, де клітини утворюють клітинні стінки. З таких

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

клітин можливо регенерувати цілу рослину. Крім того, розроблені методи трансформації, що дозволяють вводити клонований ген у невелику кількість клітин рослинної тканини, з якої можливо регенерувати цілу клітину, обходячись без регенерації з протопластів.

На сьогоднішній день для доставки ДНК у клітини рослин надають перевагу або векторам на основі Ті-плазмід, або бомбардуванню мікрочастинками. Таким чином було генетично трансформовано близько 100 різних видів рослин (табл. 3.1.2.).

3.1.2. Експресія чужинних генів у рослинах.

Після того, як методика трансформації рослин була повністю відпрацьована, дослідники спробували вводити різні рослинні і бактеріальні гени в клітини самих різних рослин. Трансформовані рослини перевіряли на здатність до синтезу чужорідних білків, проводили фізіологічні дослідження, щоб дослідити, як присутність цього білка відзначається на всій рослині. У багатьох ранніх експериментах використовували промотори, які контролюють конститутивну експресію у ряду рослинних клітин.

Не так давно були виділені та охарактеризовані рослинні промотори, контролюючі експресію чужорідних білків у специфічних клітинах на певних стадіях росту та розвитку рослини. Наприклад, замість сильного конститутивного 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти, функціонуючого в усіх рослинних клітинах протягом всього життя рослини, можна використовувати промотор гена малої субодиниці фотосинтетичного ферменту рибулозобіфосфат-карбоксилази (РБФК, RUBISCO), який працює тільки в фотосинтезуючих тканинах, наприклад у листках. Аналогічно для контролю експресії деяких чужорідних генів використовують рослинні промотори, що функціонують тільки в специфічних тканинах та при сприятливих умовах.

Більшість генів рослин локалізована в ядерній ДНК, але хлоропласти та мітохондрії теж вміщують гени, кодуючі ряд важливих та унікальних функцій. При цьому не всі білки, що знаходяться в цих органелах, закодовані в їх ДНК, деякі з них кодуються ядерною ДНК, синтезуються в цитоплазмі, а потім за допомогою специфічних механізмів імпортується у відповідну органелу. Є два шляхи введення специфічного чужорідного білка в мітохондрії та хлоропласти. Один зі способів - це злиття генів, які кодують чужорідний білок, та послідовності сигнального пептиду, що направляє білки в органели. Така конструкція може бути вбудована в хромосомну ДНК, а рекомбінантний білок буде імпортуватись у відповідну органелу. Другий спосіб припускає вбудовування гена, що кодує чужорідний білок, безпосередньо в хлоропластну або мітохондріальну ДНК.

Для виділення рослинних промоторів з деяких видів рослин використовують спеціалізовані, так звані, «промотор-направлені» вектори і систему трансформації на основі Ті-плазмід *Agrobacterium*. Суть підходу наступна: репортерний ген без промотора вбудовують відразу за правою фланкуючою послідовністю вектора на основі Ті-плазмиди, а після переносу Т-ДНК у хромосому рослин він опиняється в оточенні рослинної ДНК. Якщо Т-ДНК вбудовується в промоторну ділянку функціонального гена, то відбувається транскрипція репортерного гена. Для ідентифікації рослинних промоторів як репортерного гена можливо використання неоміцинфосфат-трансферази. При цьому експресію даного гена можливо проконтролювати відбором канаміцинстійких трансформантів. Однак, таким чином важко ідентифікувати промотори, які функціонують тільки на певній стадії розвитку рослини або індукуються специфічними факторами навколишнього середовища. Щоб бути впевненим у відборі саме трансформованих клітин, у Т-ДНК відразу за репортерним геном

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

без промотора вбудовують ген стійкості до гігromіцину, що знаходиться під контролем промотора. Спочатку відбирають гігromіцинстійкі клітини, а потім перевіряють ферментативну активність трансформантів в умовах, які забезпечують експресію репортерного гена. У результаті спостерігається, що від 5 до 30% трансформованих рослинних клітин несуть репортерний ген, який знаходиться під контролем активного промотора.

35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти часто використовують в рослинних системах як сильний промотор, але рівень експресії гена, що контролює даний промотор, часто нижчий, ніж хотілося би. З метою вирішення цієї проблеми і пошуку найефективнішого промотора, необхідно тестувати в рослинах різні конструкції «промотор-ген». Крім промотора, експресію чужорідного гена можуть посилювати інші елементи, зокрема енхансерні послідовності, розташовані на відстані від одної до кількох сотень нуклеотидів від промотора, інтрони, що стабілізують мРНК, та сигнали термінації транскрипції.

Були протестовані ДНК-конструкції, що вміщують всі або деякі з наступних елементів: 35S промотор; сигнал термінації транскрипції гена нопалінсинтетази; від одного до семи тандемних повторів енхансерних елементів; так звана W- послідовність, яка збільшує експресію гена на рівні трансляції. Найефективніша конструкція вміщувала сім енхансерних елементів, при цьому рівень експресії чужорідного гена в трансгенних рослинах тютюну та рису був набагато вищий, ніж у випадку одного 35S промотора. Протестовані промоторні конструкції контролювали експресію кола чужорідних генів у трансгенних рослинах. Таке різноманіття може пояснюватися тим, що Т-ДНК вбудовується в різні сайти в геномі рослин. Використовуючи цей підхід, можливо утворювати сильні тканиноспецифічні промотори, що регулюються в процесі розвитку.

3.1.3. Детекція та ідентифікація рослин з генетично модифікованими ознаками. Визначення присутності ГМО в сортах рослин, продуктах харчування, кормах для тварин та постреєстраційний моніторинг трансгенних організмів потребує розробки надійних методів детектування, ідентифікації та кількісного аналізу ГМ продукції. Розвиток та стандартизація технологій детекції ГМО в експериментальних зразках рослинного чи тваринного походження є необхідним також і в контексті визначення та реалізації правил маркування продукції такого типу. Розроблені сьогодні основні методи детекції ГМО варіюють значною мірою стосовно їх надійності, умов проведення аналізу та здатності коректного повторного відтворення результатів. Сучасний розвиток ГМ- технологій та стандартизація методів контролю ГМО потребують безпомилкового визначення в експериментальному матеріалі присутності дуже малої кількості трансгенної ДНК.

Ідентифікація ГМО теоретично може здійснюватися за різними критеріями: оцінка за фенотиповими ознаками, визначення специфічних РНК, аналіз синтезованих білків та метаболітів або безпосереднє детектування впроваджених трансгенних конструкцій на молекулярному рівні. Методи детекції ГМО повинні відповідати таким критеріям:

1. Можливості детекції різних видів ГМО.
2. Забезпеченню кількісної інформації про наявність ГМ матеріалу в біологічному об'єкті.
3. Наявності інформативних результатів, які охоплюють широке коло продуктів харчування та сільськогосподарської продукції.
4. Забезпеченню максимально коректної оцінки результатів.
5. Чутливості та надійності для відтворення достовірних результатів у будь-якій науковій лабораторії.

Серед поширених методів детекції та ідентифікації ГМ рослин можна виділити такі:

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

1. Біологічні методи оцінки та аналізу фенотипів ГМ рослин.

2. Методи, що базуються на визначенні специфічних білків, що синтезують трансформовані рослини.

3. Методи аналізу ДНК на наявність в ній елементів привнесеної генетичної конструкції, що була використана в генно-інженерних маніпуляціях з рослиною.

Методи аналізу фенотипу відносяться до «низькотехнологічних» засобів детекції та дозволяють проаналізувати наявність чи відсутність специфічної ознаки в ГМ рослинах (у більшості випадків це стійкість або толерантність до гербіцидів). Проведення даних тестів включає в себе оцінку здатності рослини до росту після обробки специфічним гербіцидом.

3.1.4. Нові технології детекції та аналізу ГМ рослин.

У майбутньому прогнозується швидкий ріст ГМ-технологій та поява нових генетичних конструкцій, які не будуть містити загальновідомих ГМ-маркерів, таких як 35Sпромотор або pos-термінатор, тому розвиток нових методів детекції ГМО є виключно необхідним для ідентифікації різноманіття генетичних конструкцій.

Нові технології в даному випадку є результатом поєднання технологій мікрочіпів та мікрофлюїдальних систем. Для аналізу лабораторних зразків за допомогою такого методу був створений **біоаналізатор Agilent 2100**, який є системою розділення ДНК на основі чип-технології. Це система для проведення капілярного електрофорезу в мікрокапілярах, в якій визначення та комп'ютерна оцінка даних здійснюються автоматично. Хід роботи та автоматичний аналіз даних контролюється за допомогою комп'ютера, який з'єднаний з біоаналізатором. Проведення аналізу отриманих результатів на даному приладі має ряд переваг порівняно з традиційним гель-електрофорезом. Оскільки використовується короткий роздільний канал та застосовується висока напруга

електричного поля, швидкість аналізу значно підвищується порівняно з електрофорезом у шарі гелю. Внаслідок збільшення швидкості аналізу підвищується й кількість проаналізованих зразків. Прилад має флуоресцентний детектор, який дозволяє збільшити чутливість реєстрації. Використання розфасованих зразків у поєднанні зі стандартними методиками дозволяє отримати точніші дані. Ці набори також дозволяють покращити відтворення результатів від експерименту до експерименту. Порівняно з оцінкою даних, отриманих за допомогою систем, що сканують гель, аналіз результатів здійснюється автоматично. Витрати зразків та реактивів у межах від одного до кількох мікролітрів зводять до мінімуму вплив шкідливих матеріалів та зменшує кількість втрат зразка. Висока чутливість детекції експериментального матеріалу забезпечується оптичною системою, що самофокусується, з використанням лазерів червоного та синього світла. Отримані дані можуть бути представлені або у вигляді смужок гелю, або у вигляді електрофореграм. Інформація про розмір та кількість зразків може бути додатково представлена у вигляді таблиць та легко переноситься у різні комп'ютерні програми.

Ще одним методом, що дозволяє проводити аналіз ДНК та нових білків у ГМО, є **аналіз поверхнево-пластмонного резонансу (SPR)**. Основний принцип SRP: тоненька плівка, що пропускає світло, розміщується на поверхні між матеріалами з різними показниками заломлення. Якщо ліганд кон'югований на поверхні біосенсорного типа, то приєднання до нього молекули-мішені зразка може бути виміряне як функція збільшення маси. Зміни в куті відбивання світла, що пропорційні зміні в масі на поверхні пластинок (до та після інкубації), занотовуються графічно та вимірюються у відносних одиницях. Вищезгадана технологія біосенсорів успішно використовується для

Розділ 3
скринінга ГМО зразків. Переваги даної технології: швидкість проведення аналізу, простота у використанні та невелика вартість аналізу.

Серед інших сучасних технологій ГМО детекції можна виділити **сканометричний аналіз ДНК**. На поверхні пластинки іммобілізуються золоті мікрочастинки, покриті близько 200 олігонуклеотидними нитками, які комплементарні до різних ДНК-мішеней. При з'єднанні мікрочастинок з ДНК мішені відбувається їх полімеризація та утворення поліструктур, що складаються з тисяч частинок. Далі використовується фотографічний розчин, який покриває кожну золоту частинку сріблом, та генерується сигнал, величина якого пропорційна збільшенню кількості частинок.

Фотографія результатів детекції може бути отримана за допомогою звичайного планшетного сканера. Повідомляється про можливість детекції близько 60 молекул ДНК за допомогою цієї техніки без необхідності застосування ПЛР.

Питання до самоконтролю:

1. При контрастуванні препаратів для електронної мікроскопії використовують:

- 1) фосфорновольфрамову кислоту
- 2) ураніл ацетат
- 3) нуклеїнову кислоту
- 4) формвар

2. Для виготовлення плівок – підкладок в електронній мікроскопії використовують:

- 1) каніфоль
- 2) формвар
- 3) уранілацетат
- 4) яблочну кислоту

3. Методом ультратонких зрізів можна визначити:

- 1) колір вірусу
- 2) локалізацію вірусу в клітині
- 3) тип нуклеїнової кислоти

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

4) тип білку

4. З якої кількості нуклеотидів складеться кодон:

- 1) 3 – х
- 2) 2 – х
- 3) 5 – х
- 4) 6 – х

5. Якщо вірус потрапляє до рослини транспортується по ній, але симптоми ураження проявляються слабо, то це:

- 1) толерантність
- 2) імунність
- 3) надчутливість
- 4) системне ураження

6. Системне ураження – це коли:

- 1) вірус транспортується по всім тканинам з чіткими проявами симптомів хвороби
- 2) вірус транспортується по всіх тканинах, але симптоми виражені слабо
- 3) рослини уражуються з утворенням локальних некрозів
- 4) рослина не має симптомів

7. Назвіть методи діагностики вірусів:

- 1) діаліз
- 2) електронна мікроскопія
- 3) електрофорез
- 4) іоннообмінна хроматографія

8. Імунізацію тварин фіто вірусами проводять з метою:

- 1) вивчення генетичних взаємодій
- 2) з'ясування морфології вірусних частинок
- 3) отримання антитіл
- 4) діагностики вірусів

9. З якою метою використовують метод рослин індикаторів:

- 1) діагностика
- 2) розповсюдження вірусів
- 3) вивчення генетичної структури вірусів
- 4) отримання безвірусного посадкового матеріалу

10. Серологічні реакції засновані на взаємодії:

- 1) кон'югат ад'ювант
- 2) фермент-субстрат
- 3) гормон-рецептор
- 4) аглютинат-преципітат

Тема 3.2. Трансформація рослин Ті-плазмідною з *Agrobacterium tumefaciens*



3.2.1. Фізичні методи переносу генів у рослинні клітини. Грам-негативна ґрунтова бактерія *Agrobacterium tumefaciens* - фітопатоген, який в процесі свого життєвого циклу трансформує клітини рослин. Ця трансформація призводить до утворення корончатого гала - пухлини, яка шкодить росту рослини. Це захворювання властиве тільки для дводольних рослин. Утворення корончатого гала починається з інтеграції в геном рослинної клітини специфічного сегмента бактеріальної плазмідної ДНК, так званої Т-ДНК (від англ. Transferred DNA), та її експресії. Т- ДНК - це частина плазмиди, що індукує розвиток пухлини, довжина Т-ДНК варіює від 12 до 24 т.п.н. залежно від штаму.

Інфекційний процес починається з прикріплення *A. tumefaciens* до клітин рослин у місці пошкодження. Рослини в пошкоджених місцях виділяють специфічні фенольні сполуки - ацетосирінгтон та гідроксиацетосирінгтон. Саме ці сполуки активують гени вірулентності (*vir*), які локалізовані в ділянці Ті-плазмиди довжиною 35 т.п.н. та знаходяться за Т-ДНК. Продукти *vir*-генів необхідні для транспорту та інтеграції Т-ДНК у геном рослинної клітини; існує приблизно 7 різних *vir*-генів.

Т-ДНК транспортується в клітину після приєднання *A. tumefaciens* до рослинної клітини та активації *vir*-генів. При цьому Т-ДНК знаходиться в одноланцюговій формі, і

саме в цій формі вона вбудовується в хромосому ДНК рослин. Більшість генів Т-ДНК активуються тільки після її вбудовування в геном рослин, їх продукти і викликають утворення корончатого гала.

Найпростіше використання природної здатності Ті плазмід у генетичній трансформації рослин полягає в можливості вбудовування певного гена, що викликає зацікавленість («ген інтересу») в Т-ДНК, а потім використання Ті-плазмід та *A. tumefaciens* для доставки та вбудовування клонованого гена компетентній рослинній клітині.

Не зважаючи на те, що Ті-плазмиди є ефективними природними векторами, є ряд обмежень на їх використання як вектора для клонування:

- Фітогормони, що синтезуються трансформованими клітинами в культурі, подавляють регенерацію зрілої рослини з цих клітин, тому при конструюванні векторів на основі Ті-плазмід гени ауксинів та цитокінінів повинні бути вилучені.

- Ген опіну несуттєвий для трансгенних рослин, але при його наявності може знижуватись кінцевий вихід біомаси, оскільки частина ресурсів іде на синтез опіну. Відповідно, при створенні векторів ген опіну треба вилучити.

- Ті-плазмиди мають досить великі розміри (від 200 до 800 т.п.н.), а для експериментів з рекомбінантними ДНК ефективніші вектори меншого розміру, тому ділянки ДНК, що не мають значення для клонування вектора, повинні бути вилучені.

- Ті-плазмиди не реплікуються в *E. coli*, що виключає роботу з рекомбінантними Ті-плазмидами в цих бактеріях. Таким чином, при конструюванні векторів на основі Ті-плазмід необхідно ввести в них сайт ініціації реплікації, який забезпечував би їх підтримку в *E. coli*.

Не зважаючи на всі ці труднощі сконструйовано кілька векторів для рослинних клітин. Всі вектори на основі Ті-плазмід

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

організовані подібним чином та мають наступні елементи:

- Селективний маркерний ген. Прикладом такого гена, досить часто вживаного раніше, може бути ген неоміцинофосфаттрансферази, який забезпечує стійкість трансформованих рослинних клітин до канаміцину. Оскільки цей ген (як і багато інших маркерних генів, що використовують при трансформації рослин) за своєю природою прокаріотичний, необхідно поставити його під контроль рослинних (еукаріотичних) сигналів регуляції транскрипції, в тому числі промотора і сигналу термінації-поліаденілювання з метою ефективною експресії гена в трансформованих рослинних клітинах.

- Сайт ініціації реплікації, який дозволяє плазміді реплікуватись в *E. coli*.

- Права фланкуюча послідовність Т-ДНК. Цей елемент необхідний для інтеграції Т-ДНК у клітинну ДНК рослин. Більшість векторів мають як праву, так і ліву фланкуючі послідовності.

- Полілінкер (численний сайт клонування) для включення гена в ділянку між кордонами Т-ДНК.

Оскільки клонуючі вектори не мають генів *vir*, вони самі не здатні забезпечити транспорт та інтеграцію Т-ДНК у клітини рослин. З метою вирішення цього питання розроблено два підходи. У першому випадку використовують бінарну векторну систему. Бінарний клонуючий вектор має сайти ініціації реплікації і для *A. tumefaciens* і для *E. coli*, але не несе генів *vir*, тобто це практично човниковий вектор *A. tumefaciens* - *E. coli*. Всі стадії клонування проводять в *E. coli*, а потім вектор вводять в *A. tumefaciens*. Штам-реципієнт *A. tumefaciens* несе модифіковану неонкогенну Ті-плазмідку, яка вміщує повний набір *vir*-генів, але з неї видалено частину Т-ДНК. У цій системі на неонкогенній Ті-плазміді синтезуються продукти *vir*-генів, які мобілізують ділянку Т-ДНК бінарного клонуючого вектора. Продукуючи білки, що кодують *vir*-гени, неонкогенна Ті-плазмідка

виступає в ролі помічника, сприяє вбудовуванню Т-ДНК з бінарного клонуючого вектора в хромосомну ДНК рослин.

В іншому випадку використовують коінтегративну векторну систему. Векторна ДНК рекомбінує в *A. tumefaciens* з «роззброєною» Ті-плазмідкою,

Таблиця 3.2.1. *Приклади трансгенних рослин, отриманих шляхом бомбардування рослинних клітин мікрочастинками*

Рослина	Джерело клітин
Кукурудза	Суспензія зародкових клітин, незрілих зиготичних зародків
Рис	Незрілі зиготичні зародки, зародковий калус
Ячмінь	Суспензія клітин, незрілі зиготичні зародки
Пшениця	Незрілі зиготичні зародки
Дерноутворюючі злаки	Зародковий калус
Жито	Меристема
Сорго	Незрілі зиготичні зародки
Просо	Незрілі зиготичні зародки
Орхідні	Протокорми
Банан	Суспензія зародкових клітин
Тополя	Калус
Ялина європейська та канадська	Соматичні зародки
Горох	Зиготичні зародки
Огірок	Зародковий калус
Батат	Калус
Клюква	Отримані <i>invitro</i> частини пагона
Піон	Пилок
Люцерна	Зародковий калус
Боби	Зиготичні зародки
Бавовна	Зиготичні зародки
Виноград	Суспензія зародкових клітин
Земляний горіх	Зародковий калус
Гютюн	Пилок

Т-ДНК якої не несе пухлинних генів. Таким чином, весь клонуючий вектор вбудовується в неонкогенну Ті-плазмідку. Коінтегративний вектор та неонкогенна Ті-плазмідка-помічник вміщують гомологічні послідовності, які утворюють сайт для гомологічної рекомбінації *in vivo*. Ці послідовності розміщуються в Т-ДНК, після рекомбінації клонуючий вектор стає частиною неонкогенної Ті-плазмідки, яка вміщує *vir*-гени,

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

необхідні для переносу Т-ДНК у рослинну клітину. Єдиний спосіб підтримки клонуючого вектора в *A. tumefaciens* - це використання такої коінтегративної структури, в конфігурації якої генетично сконструйована ділянка Т-ДНК може бути перенесена в рослинні клітини.

Бомбардування мікрочастинками або біолистика - це найбільш багатообіцяючий метод введення ДНК у рослинні клітини (табл. 3.2.1.). Золоті або вольфрамові сферичні частинки діаметром 0,4-1,2 мкм покривають ДНК, яка осаджена CaCl_2 , спермідіном або поліетиленгліколем, та «вистрілюють» ними в клітини з спеціальної «рушниці», яку приводять в дію газами, що утворюються при згоранні пороху, стисненим повітрям або гелієм. Частинки розганяються до швидкості 300-600 м/с і пробивають клітинну стінку та мембрани рослинної клітини. При цьому їх густина така, що клітини практично не пошкоджуються.

Попадаючи в клітину, ДНК, що покриває частинки, якимось невідомим чином інтегрується в рослинну ДНК. Метод бомбардування мікрочастинками дозволяє трансформувати рослини самих різних видів, у тому числі однодольних та хвойних, в які не вдається ввести ДНК за допомогою *Agrobacterium*.

Бомбардування мікрочастинками можливо використовувати також для введення чужорідної ДНК у суспензію рослинних клітин, культури клітин, меристематичні клітини, незрілі зародки, колеоптилі та пилки широкого кола клітин. Крім того, за допомогою цього метода були транспортовані гени вхлоропласти та мітохондрії. На поверхні мікрочастинок можливо осадити плазмідну ДНК, розчинену в буфері, що дозволяє підвищити частоту трансформації збільшенням кількості плазмідної ДНК, але треба мати на увазі, що занадто велика її кількість може бути летальною для клітини.

У трансформованих таким чином клітинах, які ідентифікують по експресії маркерного гена, введена ДНК часто

експресується тільки тимчасово. Поки чужорідна ДНК не вбудувалась в геном рослини, вона з великою вірогідністю втрачається під час ділення трансформованих клітин. Як інтеграція, так і експресія чужорідних генів можуть залежати від конфігурації вектора, який використовують для їх введення. Наприклад, частота трансформації збільшується, якщо використовується лінійна, а не кільцева ДНК. Крім того, при бомбардуванні мікрочастинками високомолекулярні плазміди (>10 т.п.н.) можуть фрагментуватись, тому рівень експресії чужорідних генів буде нижчий, ніж у випадку плазмід меншого розміру.

3.2.2. Методи визначення специфічних білків, які синтезують трансформовані рослини. Імунодіагностика:

один з методів детекції нових білків, які утворюються внаслідок генетичних модифікацій рослин, основою якого є ідентифікація комплексу антиген-антитіло. Цей спосіб детекції є високоспецифічним і потребує відносно простого підготовчого етапу для зразків, які мають бути проаналізовані. Для ефективної оцінки присутності молекули-мішені (в даному випадку - білка ГМ організму) в експериментальному зразку необхідно забезпечити умови, за яких виключене блокування сайту зв'язування антигена з антитілом (відсутність у зразку сурфактантів, фенольних компонентів, жирних кислот та ендогенних ферментів, що кон'юговані з антитілом). Ефективність проведення аналізу також залежить від характеристик антигена (розміру, гідрофобності та третинної структури).

Найбільш розповсюдженим типом імунодіагностики є *Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Цей метод дозволяє детектувати білки, найтипівіші для існуючих сьогодні ГМ рослин, -nptII, EPSPS, Bt, Cry 1 Ab, PAT.

Імуносорбентний аналіз (ELISA) проводять у кілька етапів.

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

На поверхню твердої підложки (наприклад, пластикової плашки для мікробіологічного титрування) наносять специфічні антитіла та додають антиген (розчин, що містить білок-мішень) (рис. 3.2.1).

Після цього промивають лунку для вимивання компонентів, які не зв'язались, та додають другі антитіла, специфічні до антигенної детермінанти білка-мішені. Другі антитіла попередньо кон'югують з ферментом з метою подальшого проведення ферментативної реакції, в якій утворюється забарвлений продукт реакції. Таким ферментом найчастіше є пероксидаза хрину чи кисла фосфатаза. Після промивання в лунку додають субстрат для ферменту, що каталізує перетворення незабарвленого субстрату на забарвлений продукт реакції, кількість якого пропорційна концентрації зразка. Кількісну або якісну оцінку проводять спектрофотометрично.

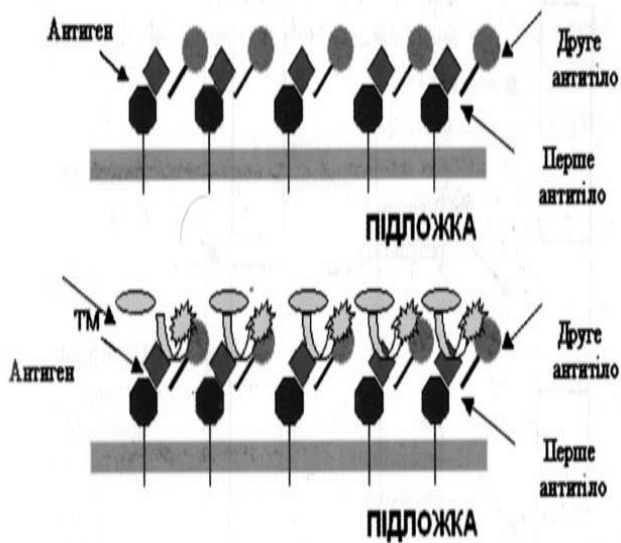


Рис. 3.2.1. Загальна схема постановки імуносорбентного аналізу

Антитіла можуть бути поліклональними (отримують з сироватки крові імунованих тварин), які зв'язуються з різними антигенними детермінантами молекули-мішені, та моноклональними (отримують з клітинних культур), які є специфічними до однієї антигенної детермінанти.

Однією з різновидностей тесту ELISA є **детекція ГМО** в листках чи насінні рослин за

допомогою індикаторних смужок (рис. 3.2.2).

Цей метод дуже нагадує тест на вагітність. Принцип методу полягає в тому, що на мембрану смужки нанесені антитіла з високим ступенем спорідненості до відповідного епітопу молекули антигена. Мембрана містить дві зони зв'язування: одна для чужорідного білка, інша для кольорового реагенту. Після занурення смужки у розчин з екстрактом зразка, який містить чужорідний білок, відбувається зв'язування більшої частини антитіл з антигеном, частина з антитіл залишається зв'язаною виключно з кольоровим реагентом.

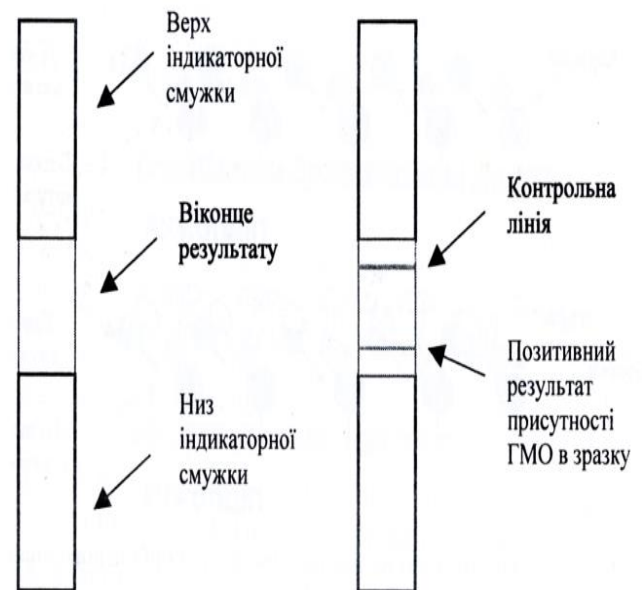


Рис. 3.1.2. Принцип детекції ГМО за допомогою індикаторних смужок

Наявність однієї лінії після проведення аналізу свідчить про негативний результат, а наявність двох - про позитивний. Метод є досить ефективним та дає 90 % результат при наявності в зразках не менше, ніж 0,15 % ГМО.

Практичний блок Методи аналізу ДНК

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) відноситься до найпоширеніших та високотехнічних методів детекції і на сьогодні є основним методом аналізу рослинного

Розділ 3
матеріалу на наявність генетично модифікованих інгредієнтів. За допомогою ПЛР можна детектувати будь-яку частину впровадженої генетичної конструкції: промотор, структурний ген, термінатор або репортерний ген. ПЛР можна використовувати для рутинного скринінгу ГМО, оскільки відомо, що у більшості конструкцій, які застосовували для генетичної трансформації рослин, присутні або 35Sпромотор вірусу мозаїки цвітної капусти, або елемент регуляції транскрипції (термінатор) гена нопалінсинтетазы з *A. tumefaciens* (pNOSi tNOS):

Проведення ПЛР аналізу з праймерами до згаданого промотора та термінатора дозволяє детектувати переважнубільшість (але не всі) трансгенні рослини, присутні зараз на ринку (табл. 3.2.2).

Таблиця 3.2.2. Скільки PCR систем потрібно для детектування ГМ рослин

Генетичні системи	Кількість пар праймерів	Можлива кількість ідентифікованих продуктів (із загальної кількості 28, що були вивільнені на ринок на кінець 90-х р.)
P-35S	1	22
nos 3'	1	16
P-35S, nos 3'	2	27
P-35S, nos 3', E9 3', als	4	28
nptII	1	17
P-35S, nptII	2	25
P-35S, nptII, nos 3'	3	27
P-nos	1	7
P-35S, P-nos	2	25

Ідентифікація ГМ рослин потребує повної інформації про структуру впровадженої генетичної конструкції та її аналізу. Аналіз матеріалу на наявність генетичних модифікацій за допомогою цього методу поділяється на кілька етапів:

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

1. Детекція, загальне визначення присутності ГМО в зразках.
2. При наявності позитивного результату наступний етап включає оцінку типу впровадженої генетичної конструкції та, відповідно, визначення існування дозволу на реалізацію даного типу генетично модифікованих організмів.
3. Кількісне визначення ГМ організмів.

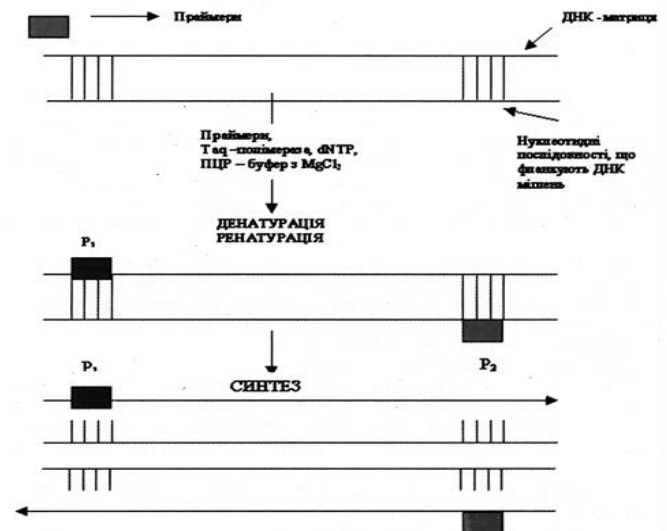


Рис. 3.2.3. Перший раунд ПЛР-реакції

Для проведення ПЛР необхідні:

- 1) Два синтетичні олігонуклеотидні праймери, комплементарні ділянкам з протилежних ланцюгів, які фланкують (обмежують) послідовність-мішень, їх 3'-гідроксильні кінці після відпалювання з ДНК мають бути орієнтовані назустріч один одному;
- 2) ДНК-мішень (у даному випадку це стосується послідовності впровадженого генетичного елемента);
- 3) термостабільна ДНК полімераза; чотири дезоксирибонуклеотидні основи.

Проведення ПЛР складається з багатократного повторення наступних реакцій (рис. 3.2.3).

1. **Денатурація.** Перший етап ПЛР складається з теплової денатурації зразка ДНК при 93-95 °C протягом не менше ніж 1 хв. Крім матриці ДНК реакційна суміш містить в надлишку пару праймерів, Taq-полімеразу та чотири дезоксирибонуклеотиди.

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

2. **Ренатурація.** Температуру суміші повільно знижують до ~ 55 °С: відбувається зв'язування праймерів з комплементарними послідовностями ДНК.

3. **Синтез.** Температуру суміші підвищують до ~ 75 °С - величини, оптимальної для Таq-полімерази. Починається синтез комплементарного ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера.

Таблиця 3.2.3. **Число копій молекул ДНК, що синтезуються на кожному з циклів полімеразної ланцюгової реакції**

Номер циклу	Число копій дволанцюгової молекули-мішені ДНК
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	23
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1 024
13	2 048
14	4 096
15	8 192
16	16 384
17	32 768
18	65 538
19	131 072
20	262 144
21	524 288
22	1 048 576
23	2 097 152
24	4 194 304
25	8 388 608
26	16 777 216
27	32 544 432
28	67 108 864
29	134 217 728
30	268 435 456
31	536 870 912
32	1 073 741 824

Внаслідок багаторазового повторення цих трьох етапів відбувається синтез конкретного сегмента ДНК.

Коли кількість копій ділянки ДНК, що аналізується, становить мільйон та більше, їх можна аналізувати із застосуванням фізичних методів з УФ або флуоресцентним детектуванням. Інформація про наявність ГМО у зразках отримується визначенням присутності або відсутності конкретного амплікона після проведення гелелектрофорезу продуктів ПЛР (табл. 3.2.3).

Для підтвердження того, що ампліфікована ДНК кореспондує із нуклеотидною послідовністю - мішенню і не є наслідком неспецифічного зв'язування праймерів з ділянками ДНК, застосовують наступні види аналізу:

1. Рестриктивний аналіз отриманого амплікона за допомогою специфічних рестриктаз та ПДРФ-аналіз профілю рестрикції.

2. Саузерн-блот гібридизація, при застосуванні якої отримані амплікони розділяються за допомогою гелелектрофорезу, переносяться на мембрани та гібридизуються зі специфічним ДНК-зондом.

3. Методика nestedoligo: продукти ПЛР реакції використовують як матрицю в її наступних циклах, при цьому використовують праймери, які мають гомологію з ділянками ДНК усередині ампліконів. Після закінчення реакції, утворюється велика кількість коротших фрагментів індивідуальної послідовності ДНК, що підлягають подальшому аналізу.

4. Сіквенс отриманих ампліконів, що є найбільш надійним (але не завжди доступним) методом перевірки відповідності отриманих ПЛР-продуктів нуклеотидній послідовності ДНК-мішені.

Кількісне визначення ГМО в зразках проводять за допомогою кількох варіантів ПЛР:

Конкурентна ПЛР - один з методів кількісної оцінки, який дозволяє в присутності конкурентора (конкурента) в ПЛР отримувати дві смуги фрагмента ДНК. Один з цих фрагментів є контрольним, з відомою вихідною кількістю матриці, по якому відраховують кількість ДНК у зразку, що аналізується (рис. 3.2.4).

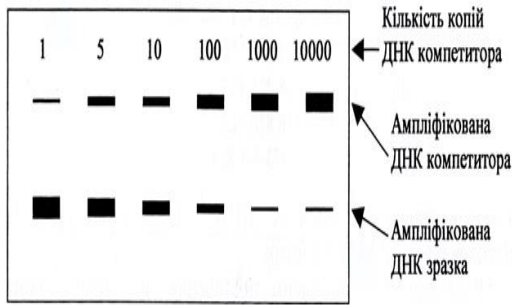


Рис. 3.2.4. Принцип конкурентної ПЛР

Подвійна конкурентна ПЛР - використовується для гена «домашнього господарства», гена, специфічного для ГМО та їх конкуриторів. Дозволяє кількісно оцінювати відсоток ГМ матеріалу в експериментальних зразках.

Напевно, найпоширенішим зараз методом кількісної оцінки ГМО є метод полімеразної ланцюгової реакції в умовах реального часу (*real-time ПЛР*) - методика, що базується на постійному моніторингу продуктів ампліфікації. Даний варіант ПЛР дозволяє проводити коректну оцінку нуклеотидного матеріалу (кількість копій, геномних еквівалентів вихідної матриці) в будь-який момент часу протягом всього процесу проведення ПЛР аналізу.

Використання методики *real-time ПЛР* дозволяє:

1. Визначати вихід продукту реакції після кожного циклу ампліфікації.
2. Конструювати згідно з отриманими даними кінетичну криву ПЛР.
3. Визначати відносну концентрацію субстрату на основі аналізу цієї кривої.

Кінетична крива ПЛР поділяється на 3 стадії:

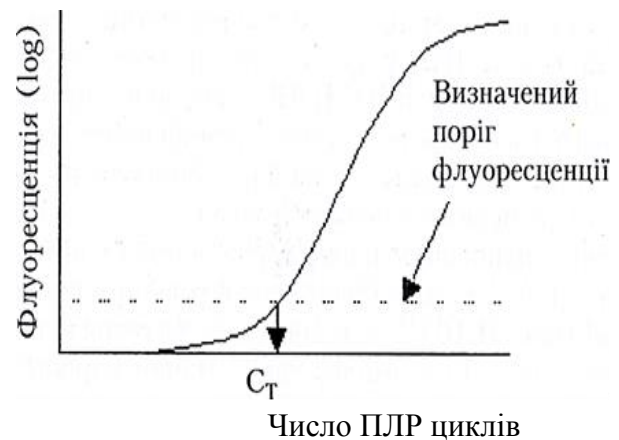
1. Стадію ініціації (ПЛР-продукти ще не детектуються флуоресцентною міткою);
2. Експонентну стадію (в якій спостерігається експонентна залежність кількості флуоресценції від циклу ПЛР);
3. Плато (стадія насичення).

Для детекції продуктів ампліфікації використовують флуоресцентні барвники, які забезпечують флуоресценцію, прямо пропорційну кількості ПЛР-продукту -

репортерну флуоресценцію (рис. 3.2.5). Механізми генерації репортерної флуоресценції розрізняються залежно від типу *real-time ПЛР*. Два головні принципи - це:

1. Застосування інтеркалюючих флуоресцентних агентів, флуоресценція яких значно збільшується при зв'язуванні з двонитковою ДНК.

2. Використання помічених флуоресцентними агентами олігонуклеотидних проб, компліментарних ділянці ПЛР-продукту.

Рис. 3.2.5. Схематична крива інтенсивності флуоресценції в процесі *Real-Time ПЛР*

Як інтеркалюючий барвник частіше за все використовують SYBRGreen. У технологіях TaqMan, Molecular Beacons, Light Cycler використовують мічені олігонуклеотидні зонди.

TaqMan метод оснований на використанні 5'-екзонуклеазної активності Taq полімерази. У реакційну суміш додають два ДНК-зонди, мічені на 5' кінці флуоресцентним барвником, а на 3' кінці - фосфатною групою та гасником флуоресценції (рис. 3.2.6). Проби комплементарні ділянці ампліфікованої області ДНК.

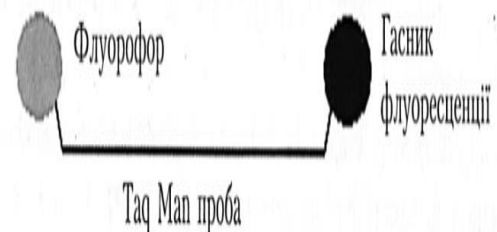


Рис. 3.2.6. Схема TaqMan проби

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

Гасник поглинає випромінення флуоресцентної мітки, а фосфатна група в 3' позиції блокує полімераза. При здійсненні відралювання праймерів зонд кількісно зв'язується з комплементарною ділянкою ДНК. На стадії елонгації полімераза синтезує компліментарний ланцюг ДНК, а при доходженні до ділянки, яка гібридизована із зондом, починає розщепляти його за рахунок 5'-екзонуклеазної активності ферменту. У результаті відбувається розділення флуоресцентної мітки та гасника, при цьому флуоресценція може бути детектована. Таким чином, збільшення флуоресценції буде прямо пропорційне кількості ПЛР продукту, що утворився (рис. 3.2.7).

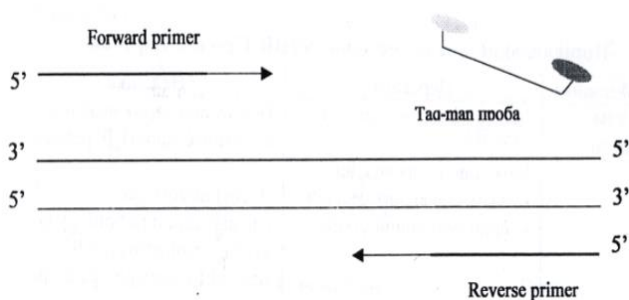


Рис. 3.2.7. Схема TaqMan методу (www.gensetoligos.com)

Застосування *SYBR Green* ставить досить високі вимоги до специфічності реакції, на що необхідно зважати при виборі праймерів. *SYBR Green* - методика для експериментів, в яких потрібне визначення кількості одного продукту. Переходити від *SYBR Green* до TaqMan варто тільки в тому випадку, коли *SYBR Green* реакцію не вдається оптимізувати, або кількості субстрату недостатні для достовірного аналізу *SYBR Green*. Зазвичай ця методика добре працює до $C(T) = 35-37$, а потім її точність починає зменшуватися. Діапазон достовірності результатів легко перевірити для кожної конкретної пари праймерів, після проведення кількох незалежних real-time PCR.

Рекомендують відразу починати з методики TaqMan, коли:

1. Планується робота з дуже невеликими кількостями субстрату (наприклад single-cellPCR);

2. Не вдається підібрати якісні праймери до потрібної послідовності.

Використання методики TaqMan також доречно, коли потрібен контроль утворення кількох PCR-продуктів в одній пробірці (табл. 3.2.4.).

Light Cycler. У цій методиці використовують два зонди, мічені флуоресцентною міткою. Принцип методу полягає в перенесенні енергії від одного флуорофора, що знаходиться на 3' кінці першого зонда до іншого - на 5' кінці другого зонда, що відбувається коли відстань між ними становить 1-3 нуклеотиди.

Таблиця 3.2.4. Порівняльний аналіз методик *SYBRGreen Taq Man*

Методика	Переваги	Недоліки
SYBR Green	Дешевша вартість аналізу Можливість проведення кількох кількісних реакцій в одній реакційній суміші	Неможливість проведення мультиплексної ПЛР реакції Високі вимоги до специфічності реакції. Будь-яка двохланцюгова ДНК, у тому числі димери праймерів будуть генерувати репортерну флуоресценцію Менша точність при малих кількостях субстрату
Taq Man	Менш суворі вимоги до специфічності реакції- репортерна флуоресценція буде генеруватися тільки при гібридизації проби зі специфічним ПЛР- продуктом Висока точність при малих кількостях субстрату	Дороговизна. Новий зонд (близько 200 \$) для проведення кожної реакції Менше можливостей для оптимізації (якщо реакція не йде з вибраною комбінацією зонда і праймерів, скоріше всього, буде потрібна їх повна заміна)

Molecular Beacon. Один із сучасних методів детекції ПЛР продуктів базується на використанні зонда – «молекулярного маяка» (рис. 3.2.8). Такий зонд складається з послідовності нуклеотидів, комплементарної для ДНК мішені, а 5' кінцевих нуклеотидів взаємно комплементарні та утворюють своєрідну «шпильку». До 5' кінця приєднаний флуоресцентний хромофор, а до 3' кінця – нефлуоресцентний хромофор (гасник).

У розчині при кімнатній температурі «маяк» має конфігурацію, коли флуорофор та гасник знаходяться в тісному контакті, і флуоресценція гаситься. При гібридизації зонда з комплементарною послідовністю ДНК мішені відбувається просторове розділення флуорофора і гасника та детектується флуоресценція, рівень якої може бути зареєстрований.

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) зонди. Принцип методу в перенесенні енергії від флуорофора донора до акцептора. Основними умовами для проведення цієї реакції є відстань між молекулами донора та акцептора близько 10-100 Å⁰. Якщо флуорофор-донор та акцептор знаходяться близько один під одного, активізація донора під впливом синього світла призводить доперенесення енергії до акцептора, який може потім випромінювати світло більших довжин хвиль.

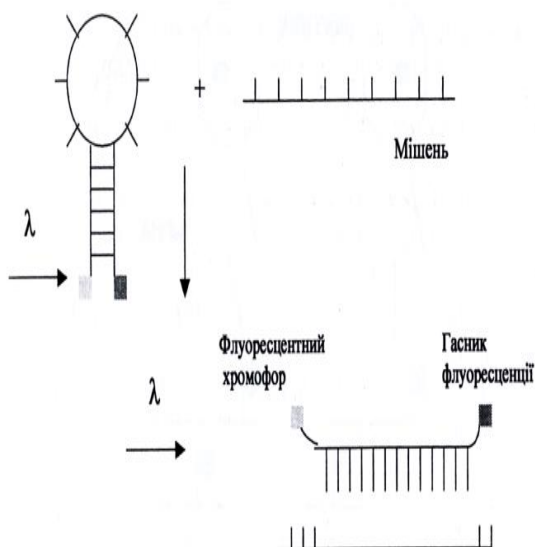


Рис. 3.2.8. Принцип зонда *Molecular Beacons*

Моніторинг утворених ПЛР-продуктів проводиться з використанням двох специфічних олігонуклеотидних зондів, помічених флуоресцентною міткою як доповнення до ПЛР праймерів. Зонди гібридизуються з ділянкою матричної ДНК (зазвичай, коли вони розділені відстанню 1-5 нуклеотидів). Коли дві проби гібридизуються, відстань між двома флуоресцентними барвниками зменшується та генерується сигнал, який оцінюється за допомогою флуорометра.

Метод мікроматриці (*Microarray*)

широко застосовують останнім часом для аналізу рівня генної експресії та оцінки різних послідовностей великої кількості зразків (рис. 3.2.9). Суть цього методу полягає в множинних гібридизаційних процесах, які відбуваються одночасно у варіанті dotblot (точка), при цьому таких точок може бути кілька тисяч на одиницю площі невеликих розмірів. Метод можна також використовувати для аналізу експресії вбудованих генів у генетично модифікований рослинний організм.

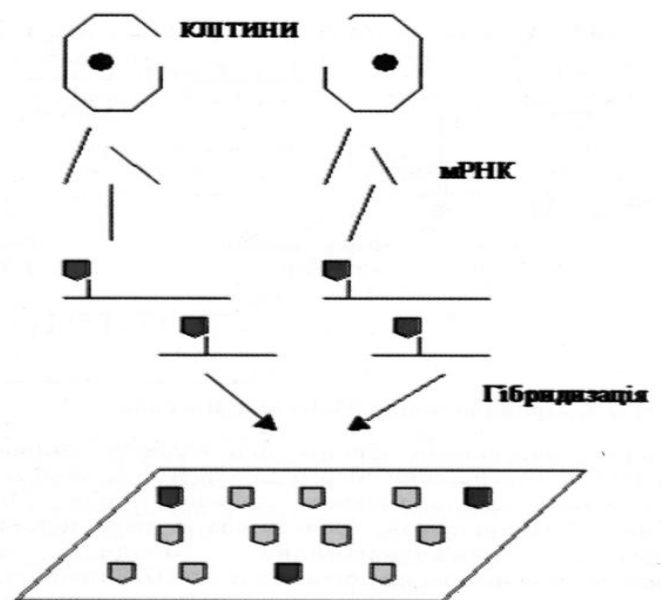


Рис. 3.2.9. Детекція ГМО методом мікроматриці

Метод мікроелектронної матриці (розробка «Gene-Scan Europe» у співпраці з «Clinical Micro Sensors») покладений в основу функціонування приладу e-Sensor: на пластинці розміщується 36 золотих електродів, які зв'язані

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

з великою кількістю одониткових молекул ДНК, кожна з яких приєднана до молекули провідника. Молекули ДНК на електродах частково кореспондують з фрагментами ДНК ГМ зразків. При контакті нитки ДНК, комплементарної до мішені, відбувається їх зв'язування. Ця реакція утримує молекулу провідника біля поверхні електроду, що змінює потік струму через його поверхню. За допомогою спеціального пристрою цей потік реєструється, після чого відбуваються якісний та кількісний аналіз зразків.

Питання для самоконтролю:

1. Серологічні методи використовують для:

- 1) освітлення фільтрату
- 2) діагностики
- 3) концентрації вірусів
- 4) очистки вірусів

2. До серологічних методів відносяться:

- 1) імуноферментний аналіз
- 2) імунофлуорисцентний аналіз
- 3) реакції преципітації
- 4) рослин-індикатора

3. Якщо віруси вражають рослин не проявляючи розвитку зовнішніх симптомів такі віруси називають:

- 1) маскованими
- 2) датентними
- 3) вірулентними
- 4) авірулентними

4. Віруси спроможні знаходитися у переноснику протягом декількох годин:

- 1) персистетні
- 2) неперсистетні
- 3) масковані
- 4) скилетпереноснв

5. Першим був відкритим вірус:

- 1) X-вірус картоплі
- 2) вірус мозаїки
- 3) Вірус мозаїки цвітної капусти

4) Вірус тютюнової мозаїки

6. Повноцінна вірусна частка називається:

- 1) капсид
- 2) капсомер
- 3) нуклеокапсид
- 4) нірїон

7. Віруси в рослині від клітини до клітини рухаються по:

- 1) плазмодесмах
- 2) перидермі
- 3) симпласту
- 4) апопласту

8. Якщо при ураженні рослини вірусом симптоми виражені слабо то це тип реакції:

- 1) імунність
- 2) толерантність
- 3) резистентність
- 4) надчутливість

9. Каліксид складається з:

- 1) ліпідів
- 2) ферментів
- 3) білків
- 4) нуклеїнових кислот

10. Якщо вірус транспортується по рослині з чіткими проявами хвороби та це тип реакції:

- 1) Імунність
- 2) Система ураження
- 3) Толерантність
- 4) Надчутливість

Тема 3.3. Сучасний стан та поширеність**ГМ рослин**

3.3.1. Генетично - модифіковані рослини в країнах ЄС. Біотехнологічні (генетично модифіковані) рослини поступово стають

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

реаліями нашого життя. Вони вперше були комерціалізовані в 1996 р. і відтоді спостерігається чітка тенденція до зростання площі їхніх насаджень. Протягом дев'яти років, з 1996 р. по 2004 р., загальносвітова площа вирощування

біотехнологічних сільгоспкультур виросла в 47 разів: з 1,7 млн га в 1996 р. до 81 млн га в 2004 р (рис. 3.3.1). Найбільших темпів приросту загальної площі вирощування ГМ сільгоспкультур було досягнуто в 2004 р. Зростання площі становило 20 % стосовно до 2003 р., коли біотехрослини культивувалися на площі 67,7 млн га. У 2004 р. біотехнологічні сільгоспкультури вирощували 8,25 млн фермерів у 17 країнах світу (для порівняння - у 2003 р. ці показники становили 7 млн фермерських господарств та 18 країн). За період з 1996 р. по 2004 р. загальна площа, на якій вирощувались ГМ сільгоспкультури, сягнула 385 млн га і загалом вони вирощувались у 22 країнах світу.

Якщо країни, в яких вирощувалися ГМ сільгоспкультури, розташувати в порядку зменшення площі вирощування біотехрослин, то буде такий список: США, Аргентина, Канада, Бразилія, Китай, Парагвай, Індія, ПАР, Уругвай, Австралія, Румунія, Мексика, Іспанія та Філіппіни. Близько однієї третини (34 %) загальносвітової площі біотехнологічних сільгоспкультур (27 з 81 млн га) припадає на країни, що розвиваються, і в цих країнах вони продовжують прискорено наростати.

Країни, що вирощують 50 000 га та більше біотехнологічних сільгоспкультур, класифікують як біотехнологічні мега-країни. У 2003 р. їх нараховували 10, у 2004 р. до них приєдналися Парагвай, Іспанія, Мексика та Філіппіни. Список 14 мега-країн виглядає таким чином: США -47,6 млн га (59 % загальносвітової площі ГМ сільгоспкультур; вирощували кукурудзу, бавовник, олійний ріпак та сою), Аргентина - 16,2 млн га (20 %; соя, кукурудза, бавовник), Канада - 5,4 млн га (6 %; олійний ріпак, кукурудза, соя), Бразилія - 5 млн га (6 %; соя), Китай - 3,7 млн га (5 %; бавовник), Парагвай - 1,2 млн га (2 %; соя), Індія - 0,5 млн

га (1 %; бавовник), ПАР - 0,5 млн га (1%; кукурудза, соя, бавовник), Уругвай - 0,3 млн га (<1 %; соя, кукурудза), Австралія - 0,2 млн га (<1 %; бавовник), Румунія - 0,1 млн га (<1 %; соя), Мексика - 0,1 млн га (<1 %; бавовник, соя), Іспанія - 0,1 млн га (<1 %; кукурудза), Філіппіни - 0,1 млн га (<1 %; кукурудза). У 2004 р. біотехнологічні сільгоспкультури вирощували також Колумбія (бавовник), Гондурас (кукурудза) та Німеччина (кукурудза).

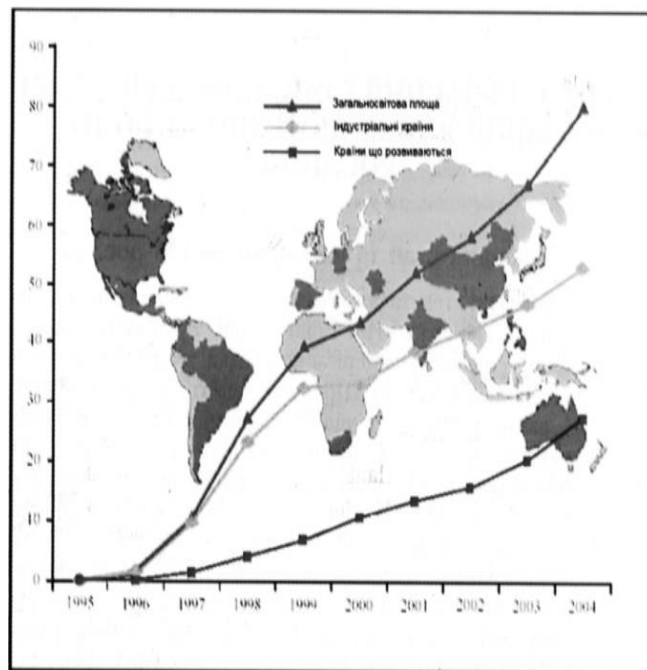


Рис. 3.3.1. Динаміка росту площі посівів ГМ культур (млн га) у світових масштабах (джерело: James C., 2004)

У 2004 р. продовжувалось зростання площі вирощування основних чотирьох комерційних біотехсільгоспкультур. Біотехнологічна соя займала 48,4 млн га (60% загальносвітової площі під біотехнологічними сільгоспкультурами) порівняно з 41,4 млн га в 2003 р. Біотехнологічна кукурудза вирощувалась на 19,3 млн га (23 % площі під біотехкультурами), у 2003 р. цей показник становив 15,5 млн га. Це найбільший приріст площі (25 %) і очікується, що в найближчому майбутньому рівень приросту біотехнологічної кукурудзи залишиться самим високим, оскільки попит на неї постійно зростає. Біотехнологічний бавовник вирощувався на 9 млн га (11 % площі під біотехкультурами) порівняно з 7,2 млн га в 2003 р.

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

Біотехнологічний ріпак займав 4,3 млн га (6 % загальносвітової площі) порівняно з 3,6 млн га в 2003р. У цілому, в 2004 р. біотехсільгоспкультури займали 5% від 1,5 млрд га загальносвітової посівної площі.

В окремих, згаданих вище біотехнологічних країнах, ГМ рослини становлять значну частину посівів відповідної сільгоспкультури. Зокрема, в Китаї площа посіву ГМ бавовнику у 2004 р. становила 3,7 млн га, або 66 % від загальної площі посівів (5,6 млн га) цієї культури. Для Індії цей показник (площа під біотехнологічним бавовником) дорівнював 6 % від загальної площі в 9 млн га. Аргентина в 2004 р. вирощувала сою на площі в 14,750 млн га, з них - 14,5 млн га (98 %) - площі під ГМ соєю, посіви трансгенної кукурудзи займали 55 % від усієї площі посівів в 3,0 млн га цієї культури, ГМ бавовник вирощували на 25 % всієї площі посівів. На площі в 22 млн га (22 % загальної площі посівів) біотехнологічну сою вирощували у Бразилії. У ПАР під біотехнологічну кукурудзу відводилась площа в 4 млн га (15 % всієї площі), під б/т сою - 70 млн га (50 % всієї площі), під бавовник - 30 млн га (85 % всієї площі). У світових масштабах за показниками 2004р. площа посівів б/т сої становила 56 % від загальної площі в 86 млн га, б/т бавовник займав 21 % площі від загальних 32млн га, площа посівів біотехнологічного ріпаку становила 19 % загальносвітової площі в 23 млн га і б/т кукурудзу вирощували на 19,3млн га, що становить 14 % від загальної площі посівів у 140 млн га. Загальна площа вирощування цих традиційних сільгоспкультур у 2004 р. становила в світових масштабах 284 млн га, з яких 29 % були відведені під біотехнологічні культури.

Найбільші площі (72 % або ж 58,6 млн га) в 2004 р. були підведені під б/т культури (сою, кукурудзу, олійний ріпак та бавовник) зі стійкістю до гербіцидів. Культури, стійкі до комах- шкідників (Вткультури) вирощували на території в 15,6 млн га (19 %). Водночас зросли також площі посівів біотехнологічних

бавовнику та кукурудзи з комбінованими ознаками стійкості до гербіцидів та шкідників (9 % або 6,8 млн га порівняно з 5 8 млн гав 2003р.).

Ринкова вартість біотехнологічних сільгоспкультур складається з цін за продаж насіння та ліцензійних відрахувань за технології в цій галузі. Загальна вартість світового ринку біотехнологічних сільгоспкультур становила в 2004 р. 4,7 млрд доларів США. Для порівняння: світовий ринок засобів захисту рослин становив у 2003 р. 32,5 млрд доларів, а світовий ринок насіння - 30 млрд доларів. Загальна вартість ринку б/т культур, починаючи з 1996 р., коли їх вперше почали вирощувати, становила 24 млрд доларів. Очікується, що вартість цього ринку в 2005 р. буде близько 5 млрд доларів. Загальна ж вартість усієї біотехнологічної продукції (продукти харчування для людини, корми для тварин, волокна тощо) у 2003 р. була оцінена в 44 млрд доларів.

Таблиця 3.3.1. *Основні «гравці» на ринку ГМ рослин на кінець 90-х років та обсяги їх продаж*

Компанія	Обсяг продажу 1998 р., млн доларів США
Novartis	5010
Monsanto	4030
Dupont	3156
Zeneca	2798
Dow Chemical	2352
AgrEvo	2330
Bayer	2200
American Cyanamid	2190
Rhone-Poulenc	2066
BASF	1880

Таблиця 3.3.1. дає уяву про основні фірми-виробники ГМ продукції станом на кінець 90-х рр., та про обсяги бізнесової активності цих фірм. Навіть ці застарілі цифри, наведені в таблиці, свідчать про серйозність намірів та фінансові можливості біотехнологічних компаній боротися за розширення ринків збуту своєї продукції. За час, що минув, деякі фірми зникли (як, наприклад, American Cyanamid чи AgrEvo), а

Розділ 3

деякі об'єдналися і на біотехнологічному ринку з'явилися нові потужні «гравці» (як, наприклад, Syngenta).

Переділ біотехнологічного ринку, який реально відбувся декілька років тому, привів до того, що основна бізнесова та дослідницька активність в сфері рослинних біотехнологій зосереджена зараз в таких великих компаніях як Syngenta, Monsanto, Bayer Crop Science, Du Pont/Pioneer Hi-Bred, Dow Agro Sciences та BASF. В 2002 р. ці компанії витратили разом на дослідження біля 2,7 млрд доларів США (табл. 3.3.2), що складає в середньому біля 11% від їх загальних обсягів продажу.

Таблиця 3.3.2. *Обсяги продажу основних біотехнологічних компаній та їх вклад в проведення досліджень*

2002 рік	Обсяг продажу (млн.)	Витрати на дослідження (млн.)	Частка витрат на дослідження в порівнянні з обсягом продажу, %
Syngenta	6197 USD	697 USD	11,2
Monsanto	4673 USD	527 USD	11,3
Dupont/Pioneer Hi-Bred	4510 USD	506 USD	11,2
Bayer CropScience	4697 Euro	598 Euro	12,7
BASF	4924 Euro	367 USD	7,5
Dow	2700 Euro	Не повідомл.	
Разом	27701	2695	10,8 (середнє знач.)

Хоча витрати на дослідження починають давати певний зиск лише через 10-15 років після початку тієї, чи іншої наукової розробки, фірми-виробники думають про майбутнє.

Крім «фірм-важковаговиків» варто згадати також про дещо менші фірми, що теж знайшли свою нішу на ринку агробіотехбізнесу. Насамперед, це Mendel Biotechnology, Arcadia Biosciences, Shoffner Farm Research та деякі інші, відомі, і не дуже, компанії. Загалом, в проміжку з 1985 до 2003 рр. дозвіл на польові випробування біотехнологічних рослин в США

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

отримали біля 150 приватних компаній та 75 державних закладів, переважно університетів. В 2000 році в США державні інвестиції в дослідження, що пов'язані з сільським господарством, склали 3,540 млрд доларів, що свідчить також і про серйозну державну підтримку цієї галузі науки. Ще одним свідченням цього може бути зростання загального числа випускників різних навчальних закладів, які в Сполучених Штатах Америки отримали ступінь бакалавра, M.S. або Ph.D. в області біологічних наук. В 1990 р. ця цифра складала 45000, а в 2000 р. вона виросла на 62 відсотки і склала вже 73000.

Варто зауважити, що створення ГМ рослин відбувалося разом із розробкою відповідних гербіцидів та інсектицидів, під які інколи і створювалися ті чи інші біотехнологічні рослини. Тобто, розвиток рослинної біотехнології відбувався (і відбувається) паралельно і погоджено з розробленням нових засобів захисту рослин, оскільки біотехнологічні сільгоспкультури створюються не заради самих себе, а з метою зайняти свою нішу в цілісному ланцюжку промислового виробництва.

Прогнозується, що зростуть загальні площі посівів б/т сільгоспкультур і кількість фермерських господарств, що їх використовують. Передумовою таких прогнозів для розвинених країн, таких як США чи Канада, є поява на ринку б/т культур з новими властивостями. Про це свідчить зростання площі посівів лінії кукурудзи MON 863 зі стійкістю до корневих шкідників та лінії TC 1507, що дає змогу забезпечити ширший контроль за перетинчастокрилими шкідниками. Передумовою поширення ГМ культур у слаборозвинених країнах є зростаючий попит на продовольство (табл. 3.3.3).

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

Таблиця 3.3.3. Деякі гербіциди та інсектициди, розроблені в процесі впровадження ГМ технологій

Торгова марка	Звичайна назва	Призначення	Види рослин, щодо яких застосовується препарат	Компанія-виробник
Round Up	Гліфосат	Гербіцид	Бавовник, соя, кукурудза	Monsanto
Liberty	Глюфозина т	Гербіцид	Кукурудза, ріпак	Agrevo
Actigard	Ацибензол ар-S-метил(бензотіадіазол)	Протигрибковий, антимікробний препарат	Різні види	Novartis
MAC (MoltAcceleratingCompound)	Діацилгідразин	Інсектицид	Різні види	Rohn & Haas
Touchdown	Триметилсульфонова сіль гліфосату	Гербіцид	Різні види	Zeneca
Acuron	Інгібітор протопорфіринооксидази	Інсектицид	Різні види	Novartis
Bollgard	Протеїн	Інсектицид	Кукурудза	Monsanto
Bt toxin	Протеїн <i>Bacillus thuringiensis</i>	Інсектицид	Кукурудза	Monsanto
Photoliarbus	Фотохарбдус	Інсектицид	Різні види	Dow
Bromoxynil	Бромоксініл	Гербіцид	Бавовник, ріпак	Rhone-Pulenc
Sulfonylurea	Сульфонілсечовина	Гербіцид	Різні види	Dupont
DeKalb™	Токсичний рослинний білок	Інсектицид	Кукурудза	DeKalb Genetic Corp.
STAR™	Імідазолінон	Гербіцид	Кукурудза, ріпак	American Cyanamid

У свою чергу, Європейська Комісія дозволила в 2004 р. імпорт 2 сортів біотехнологічної кукурудзи (лінії Bt 11 та NK 603) для застосування її в їжу та як корм для тварин, а 17 сортів кукурудзи MON810, стійкої

до шкідників, дозволено для вирощування в 25 членах ЄС, що теж прогнозує подальший ріст площі насаджень ГМ культур у світових масштабах. Очікується, що основний вплив на глобальне поширення б/т сільгоспкультур будуть мати 5 провідних країн, що розвиваються (Китай та Індія в Азії, Бразилія та Аргентина в Латинській Америці, ПАР в Африці), оскільки вони є лідерами в своїх регіонах і придбали вже певний досвід та знання. Найближчим часом також може трапитися подія, що істотно вплине на розвиток біотехнології. Це -дозвіл і впровадження на території Китаю Bt рису. Така подія може стати стимулом до поширення біотехнологічного рису в усій Азії, а в більш ширшому аспекті - до поширення б/т продовольчих, кормових та луб'яних культур в усьому світі. Наведений в таблицях список біотехнологічних культур не варто сприймати як щось обособлене, - мова йде про вже комерціалізовані ГМ культури, які отримали дозвіл на те, щоб бути вивільненими на ринок для вирощування та культивування, або у вигляді добавок та інгредієнтів у їжу людини і корма для тварин. Попри отриманий формальний дозвіл, у багатьох країнах ведеться досить серйозний постреєстраційний контроль і моніторинг ГМ рослин (про це буде йти мова далі). Прикладом такого серйозного контролю може бути Європейський Союз. Раніше вже згадувалось про те, що в країнах Європейського Союзу біотехнологічні рослини культивуються на невеликих площах і лише в кількох країнах. Причина цього полягає в обережному ставленні європейських країн до генетично модифікованих організмів і в досить складному законодавчому регулюванні ГМ організмів та в дещо бюрократизованому (в позитивному розумінні цього слова) механізмі прийняття рішень щодо ГМ рослин у країнах ЄС. Водночас, дослідницька активність в різноманітних питаннях, що стосуються генетичної трансформації рослин, в європейських країнах має великі традиції і продовжує бути визначальним чинником, що формує риси сучасної біотехнології. Наведена

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

далі в таблицях 3.3.1.-3.3.3. інформація має на меті скласти у читача уяву про масштаби таких досліджень, про країни, що володіють сучасними технологіями трансформації рослин і про види рослин, що викликають потенційний комерційний інтерес для впровадження ГМ-технологій. Важливим, на наш погляд, є те, що в цьому списку зустрічаються не лише традиційні сільгоспкультури, але й фруктові дерева, ягоди, трави, лісоутворюючі породи. Такий широкий список свідчить про одне, - хочемо ми того, чи ні, але біотехрослини стають реаліями нашого життя, оскільки цей перелік список щороку має тенденцію до поповнення та розширення, а список ГМ рослин, що вивільнені на ринок, має тенденцію до поповнення, нехай і не дуже високими темпами.

3.3.2. Застосування репортерних генів при трансформації клітин рослин. Для ідентифікації трансформованих клітин необхідно вміти виявити чужорідну ДНК, що інтегрується в геномну ДНК рослин. Більше того, при дослідженні сигналів регуляції транскрипції та їх функцій в специфічних рослинних клітинах (листках, коріннях та квітах) важливо оцінити рівень експресії гена, що кодує легко ідентифікований продукт. Все це вимагає використання репортерних генів, які дозволяють або проводити відбір трансформованих клітин, або оцінити активність кодованого ними ферменту. Було протестовано кілька різних генів, які можливо використовувати як домінуючі селективні маркери, і генів, продукт експресії яких можливо спостерігати за допомогою специфічних методів.

Оскільки багато з репортерних генів мають бактеріальне походження, вони були забезпечені регуляторними послідовностями з метою їх експресії в рослинних клітинах. Наприклад, у присутності канаміцина виживають лише клітини рослин, що

синтезують активну неоміцинфосфаттрансферазу.

Вибір того чи іншого репортерного гена визначається характером конкретного експерименту. Якщо експресія гена шкодить нормальному росту рослини, то його неможливо використовувати як репортерний. Крім того, присутність деяких генів та їх продуктів може призводити до забруднення комерційного продукту. У зв'язку з цим уникають вводити гени стійкості до антибіотиків у сільгоспгосподарські рослини.

Деякі продукти репортерних генів (наприклад, b-D- глюкуронідаза, а також люцефераза, що синтезується бактеріями та світлячками) можливо спостерігати в інтактних рослинних клітинах. У системах трансформації головним чином використовували ген b- глюкуронідази *E. coli* (GUS-ген), який кодує стабільний фермент, відсутній в рослинах, та каталізує розщеплення b-глюкуронідів. Активність гена в трансформованих рослинних тканинах можливо виявити за наявністю синього забарвлення в результаті гідролізу нефарбованого субстрату, 5 - бром-4-хлор-3-індоліл – b - Б- глюкуронової кислоти. Альтернативний, більш чутливий метод кількісної оцінки активності GUS- генів у рослинних екстрактах оснований на визначенні інтенсивності флуоресценції продукту гідролізу 4-метилумбел- ліферилу, b-D-глюкуроніду.

3.3.3. Отримання трансгенних рослин без маркерних генів. При введенні чужорідного гена в рослини вводять і селективний маркерний ген. Хоч до цього часу не було ніяких відомостей про те, що будь- який з цих генів може шкідливо впливати на людину, тварини і навколишнє середовище, наслідки, до яких у принципі можуть призвести включення в рослини селективних маркерних генів, викликають занепокоєння суспільства. Наприклад, продукти деяких селективних маркерних генів можуть бути алергенними або токсичними речовинами, а гени стійкості до

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

антибіотиків можуть потрапити в патогенні ґрунтові мікроорганізми. Крім того, присутність селективних маркерів технічно ускладнює трансформацію трансгенних рослин додатковими генами, оскільки один селективний маркер не може використовуватись двічі. Щоб заспокоїти громадськість, були розроблені методи отримання трансгенних рослин без будь-яких маркерних генів.

Один з експериментальних підходів до отримання безмаркерних трансгенних рослин включає котрансформацію рослин двома різними ДНК, одна з яких несе маркерний ген, а інша - послідовність, цікаву для дослідника. У цьому випадку від 30 до 80% рослин вміщують обидва гени, які, однак, інтегровані в різні сайти хромосомної ДНК. Після відбору трансформантів маркерний ген можна видалити з трансгенної рослини за допомогою простого схрещування.

У рамках другого підходу селективний маркерний ген вбудовують між рослинними мобільними елементами (Ds-елементами) і таку конструкцію вводять в Т-ДНК разом з геном транспозази, яка вирізає ділянку ДНК між Ds-елементами і переміщує його в другий хромосомний сайт. У процесі вбудовування Т-ДНК у ДНК рослини-господаря в 90 % випадків селективний маркер, який знаходиться між двома Ds-елементами, опиняється в другому сайті хромосомної ДНК, при цьому з вірогідністю 50 % цей сайт знаходиться далеко від початкового. Таким чином, селективний маркерний ген можна використовувати для ідентифікації трансформованих рослин, а потім виділяти при схрещуванні.

3.3.4. Принципи регулювання генно-інженерної діяльності. Основним принципом, що є основою системи біобезпеки багатьох країн стосовно генетично змінених організмів, є принцип упередження (precautionary principle). Вперше такий підхід (упередження ризиків) упроваджено в законодавстві ЄС у 80-

х роках при розробці законодавчої бази щодо традиційних продуктів харчування, у подальшому цей принцип знайшов своє відображення і в документах, що стосуються генно-інженерної діяльності.

Хоча можна назвати цілу низку причин для того, щоб регулювати генно-інженерну діяльність, основними з них будуть: захист здоров'я людини та захист довкілля від можливого негативного впливу генетично модифікованих організмів. У Директиві 2001/18/ЄС констатується, що «Захист здоров'я людини та навколишнього середовища вимагає, щоб належна увага була приділена контролю ризиків від вивільнення в навколишнє середовище генетично модифікованих організмів». Захист здоров'я людини вимагає маркування безпечної продукції за умови, що регуляторна система стосовно ГМО успішно працює. У свою чергу, навколишнє середовище буде захищене, якщо вивільненню ГМ рослин буде передувати глибокий експертний аналіз щодо їх безпечності.

У подальших підрозділах проаналізовано структуру та законодавчу базу регуляторної системи стосовно ГМО, що створені і працюють в кількох різних окремих країнах та в Європейському Союзі. Можна вбачати недоліки чи переваги однієї системи регулювання над іншою, але всі вони мають спільні необхідні і концептуальні компоненти: обов'язковий дозвіл на генно-інженерну діяльність ще до вивільнення ГМ організмів на ринок; сталі і вивірені стандарти щодо безпеки; прозорість у прийнятті рішень; залучення широких кіл суспільства до обговорення питання; залучення сторонніх вчених як наукових експертів; рішення приймається незалежними регуляторними агенціями; постреєстраційний моніторинг за ГМО; вирішення питання в контексті з іншими соціальними проблемами; охорона авторських прав. У цьому питанні накопичено величезний досвід.

Система біобезпеки та її основні елементи. Під біобезпекою в галузі генетично

Розділ 3
модифікованих організмів розуміють використання системи заходів, направлених на запобігання або пониження здоров'я людини та навколишнього середовища. Основними напрямками генно-інженерної діяльності є:

- діяльність в замкнених системах, де операції, пов'язані з ГМО, виконуються при умовах спеціального захисту (фізичних, хімічних, біологічних), що ефективно обмежують зовнішнє середовище від контакту з ГМО та впливу ГМО на нього;

- діяльність, пов'язана з вивільненням ГМО в навколишнє середовище, але з метою, не пов'язаною з розташуванням ГМО на ринку товарів (це діяльність, що стосується випробування ГМО). При цьому під вивільненням розуміють спрямоване впровадження ГМО в навколишнє середовище, обумовлене спеціальними підходами до запобігання контакту ГМО з середовищем та забезпечення високого рівня безпеки для населення і середовища (як це характерно для діяльності з ГМО в замкнених середовищах);

- діяльність, пов'язана з використанням ГМО в господарській діяльності (вивільнення ГМО з метою розміщення їх на товарному ринку);

- діяльність, пов'язана з транскордонним переміщенням ГМО.

Основними елементами системи біобезпеки при виконанні вище наведених напрямів діяльності є: 1) законодавча база; 2) адміністративна система; 3) система обґрунтованого прийняття рішень, що включає оцінку та попередження відповідного ризику; 4) механізм інформування та участі громадськості в прийнятті рішень та контролі за їх виконанням.

Таким чином, структура біобезпеки генно-інженерної діяльності (ГІД), згідно з існуючою міжнародною практикою, повинна мати ряд певних обов'язкових елементів, які забезпечують добробут населення та навколишнього середовища в умовах прискорюючого розвитку науки та техніки, появи нових нетрадиційних технологій,

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація продуктів харчування та інших факторів життєзабезпечення людини, виникнення живих організмів, генетично відмінних від вже існуючих у природі аналогів. Система біобезпеки повинна представляти собою ефективну адміністративну систему, що спирається в своїй діяльності на розвинуту законодавчу базу. Ця система повинна забезпечувати обґрунтоване прийняття рішень стосовно проведення ГІД, включаючи оцінку і попередження ймовірного ризику при її здійсненні та інших видах діяльності, з нею пов'язаних, з обов'язковим залученням громадськості до прийняття таких рішень. Законодавча база повинна враховувати регулювання питань, що мають відношення до головних напрямів генно-інженерної практики, враховуючи діяльність в замкнених системах, тобто системах, які дозволяють ізолювати генетично-модифіковані організми протягом усього їх існування від контактів з навколишнім середовищем та населенням; вивільнення ГМО в навколишнє середовище та їх використання в господарській діяльності, включаючи правові акти, що зазначають правила ввозу ГМО в країну та їх вивіз за кордон.

3.3.5. Процедура реєстрації та ліцензування ГМО. Згідно з директивою 2001/18/ЕС, компанія, яка має намір зареєструвати ГМО на ринку, повинна подати заявку до відповідного компетентного органу країни-члена ЄС (надалі країни-члена), де планується вперше випустити продукт на ринок.

Заявка повинна включати в себе повну оцінку потенційного ризику для оточуючого середовища. У випадку позитивного рішення компетентного органу стосовно розміщення на ринку ГМО, відповідна країна повинна поінформувати стосовно цього інші країни-члени ЄС через Європейську Комісію.

У випадку відсутності жодних заперечень інших країн-членів чи Європейської Комісії компетентний орган, який розглядав

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

початкову заявку, дозволяє розміщення ГМО на ринку даної країни. Надалі продукт може бути розміщений на ринку всього ЄС.

У випадку наявності будь-яких заперечень рішення стосовно даного ГМО повинне прийматися на рівні ЄС. Європейська Комісія спочатку очікує на думку її Наукових Комітетів, які складаються з незалежних вчених, висококваліфікованих у відповідних галузях науки (медицина, харчування, токсикологія, біологія, хімія та інші подібні дисципліни). З цією ж метою відповідні рішення приймаються аналогічними комітетами Європейської Організації з Безпеки Продуктів Харчування (European Food Safety Authority).

У випадку схвальної думки наукових комітетів Європейська Комісія подає попереднє Рішення до Регуляторного Комітету, що складається з представників країн-членів для їх висновків. Якщо Регуляторний Комітет дає схвальні висновки, то Європейська Комісія приймає дане Рішення. Якщо ні, то дане попереднє Рішення надсилається до Ради Міністрів для прийняття або відхилення методом кваліфікованої більшості. У випадку відсутності будь-якого рішення Ради Міністрів протягом 3 місяців Європейська Комісія затверджує дане Рішення.

Протягом даного процесу узгодження та прийняття відповідного рішення, спільнота має доступ до даної інформації за адресою в Інтернеті www.gjmoinfo.jrc.it, де містяться висновки щодо заявки, результати оцінки заявки компетентними органами та висновки Наукових Комітетів.

Якщо метою подачі заявки є також використання відповідного ГМО у їжу або як складової частини харчових продуктів, то заявка має відповідати вимогам не тільки Директиви 2001/18/ЄС, але й умовам, наведеним у постанові (ЄС) N 1829/2003. Відповідність даній постанові вимагає проведення оцінки ризику під відповідальністю Європейської Організації з Безпеки Продуктів Харчування (European Food Safety Authority) та

процесу управління ризиками із залученням Європейської Комісії та країн-членів за допомогою процедури регуляторних комітетів.

У цьому випадку заявка подається спочатку до компетентного органу країни-члена, де планується вперше випустити продукт на ринок. Заявка повинна чітко визначати межі даного подання; вказувати, які частими даної заявки є конфіденційними; включати в себе план моніторингу, пропозиції щодо маркування та методів детекції нових продуктів та кормів, що містять або складаються з ГМО. Компетентний орган країни-члена повинен підтвердити прийняття заявки письмово протягом 14 днів та поінформувати Європейську Організацію з Безпеки Продуктів Харчування. Заявка та будь-яка інша додаткова інформація, представлена позивачем, повинна бути доступною для Європейської Організації з Безпеки Продуктів Харчування, яка є відповідальною за наукову оцінку ризику, включаючи ризик для оточуючого середовища та ризик для безпеки здоров'я людини та тварин. Думка Європейської Організації з Безпеки Продуктів Харчування має бути доступною для спільноти, яка повинна мати можливість виказати будь-які коментарі та зауваження.

У більшості випадків Європейська Організація з Безпеки Продуктів Харчування висловлює свою думку протягом 6 місяців. Даний проміжок часу може бути збільшений, якщо дана організація вимагає більше інформації від позивача.

Протягом 3 місяців від отримання висновків Європейської Організації з Безпеки Продуктів Харчування та на основі даних висновків Європейська Комісія приймає попереднє Рішення стосовно дозволу чи відмови у даній заявці. Дане рішення надалі виноситься на узгодження Комітету з Продуктів Харчування та Здоров'я Тварин (Standing Committee on the Food chain and Animal Health), який складається з представників країн-членів. Рішення узгоджується кваліфікованою більшістю.

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

У випадку позитивного рішення Комітету Європейська Комісія приймає Рішення. У випадку негативного Рішення подається на розгляд Ради Міністрів для прийняття або відхилення методом кваліфікованої більшості. У випадку відсутності будь-якого рішення Ради Міністрів протягом 3 місяців, Європейська Комісія затверджує дане Рішення.

Авторизовані продукти надалі будуть внесені до публічного реєстру продуктів та кормів, що містять або складаються з ГМО. Дозвіл надається на період 10 років і надалі може бути подовжений на аналогічний термін.

Стосовно Великобританії головна роль у реєстрації та отриманні дозволу на виведення на ринок ГМО належить Агентству Харчових Стандартів (The Food Standards Agency), яке є органом Європейського законодавства. Щодо ГМО та новітніх продуктів харчування дане агентство консультується у незалежних експертів (Дорадчий Комітет з Новітніх Продуктів Харчування та Процесів (the Advisory Committee on Novel Food and Processes (ACNFP)). ACNFP є відповідальним за оцінку безпеки новітніх та генетично модифікованих продуктів харчування.

Підсумовуючи, варто звернути увагу на те, що з метою біобезпеки ГМО в замкнених системах у законодавстві країн - членів ЄС зазначається наступне:

Діяльність неможливо здійснювати без спеціального дозволу компетентних організацій.

Для отримання дозволу замовник подає запит встановленого зразка на право здійснення діяльності в замкнених системах.

До подання запиту замовник виконує процедуру оцінки ризику очікуваної діяльності і встановлює необхідний клас замкнених систем (залежно від ступеня небезпеки маніпулювання з заявленим видом ГМО).

Компетентні організації проводять експертизу поданих документів на науковій основі та видають дозвіл на діяльність з ГМО.

Уповноважені організації здійснюють протягом всього періоду після надання дозволу контроль над діяльністю з ГМО.

Таким є порядок, встановлений для діяльності в замкнених системах, що відповідає умовам біобезпеки, прийнятим у країнах ЄС.

Система біобезпеки при вивільненні ГМО в навколишнє середовище заснована на простих принципах:

Вивільнення неможливо здійснити без спеціального дозволу назначених компетентних організацій.

- Для отримання дозволу на вивільнення заявник подає запит певного зразка в назначені державні установи.

- До подання заявник проводить процедуру оцінки ризику ГМО, що може бути вивільненим.

- Компетентні установи проводять наукову експертизу поданих документів та видають дозвіл на вивільнення.

- Компетентні установи проводять моніторинг по ефективності вивільнення.

- Рішення про вивільнення приймається компетентними установами в умовах доступності відповідної інформації для громадськості.

3.3.6. Порядок ліцензування генно-інженерної діяльності.

Будь-яка біотехнологічна фірма, яка збирається подати заявку щодо ліцензування нової ГМ культури та отримати дозвіл на проведення польових експериментів повинна перш за все подати пакет документів до CFIA, який містить наступну інформацію: 1) детальну характеристику рослини (тип конструкції, методика трансформації, ділянки експреси трансгена, наявні зміни характеристик рослини, прогнози щодо подальшої стабільності впровадженної конструкції, очікуваний вплив на довкілля, особливо на сільськогосподарські та природні екосистеми). Перед проведенням польових досліджень також з'ясовуються будь-які близькі родичі ГМ рослини поблизу

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

експериментальної ділянки. Має бути представлений детальний план, в якому занотовані міри по забезпеченню репродуктивної ізоляції ГМО, описані режими культивування, запропоновані можливі схеми використання експериментальної території після проведення дослідів. Кожне подання повинне містити як результати польових експериментів, так і дані наукової літератури з цього питання. Інформація щодо нових ГМ організмів, яка оприлюднюється CFIA, має суто загальний характер: критерії, згідно з якими прийняте відповідне рішення, без конкретних експериментальних чи аналітичних даних. Ліцензування ГМ організму дозволяється тільки після того, як комісія CFIA визначить, що будь-який ризик для довкілля від впровадження цього ГМ об'єкта виключений або може бути контрольованим.

Польові випробування ГМ рослин проводяться на спеціальних ділянках, на яких згідно з правилами CFIA вони строго обмежені від взаємодії з навколишнім середовищем. ГМ рослини вирощуються на цих закритих ділянках протягом певного терміну для отримання найповнішої інформації щодо їх агрономічних характеристик та впливу на довкілля. Ті з ГМ рослин, що позиціонуються як комерційно вирашні, підпадають під додаткові оцінки їх ризиків перед тим, як будуть дозволені для широкого використання.

CFIA інспектори проводять моніторинг експериментального процесу та територій під час та після завершення дослідів.

Продукти харчування, що імпортуються або виробляються в Канаді, також підпадають під подібну систему оцінки, що проводиться Health Canada згідно з вимогами Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods. Характеристики нових продуктів харчування, порівнюються з їх традиційними аналогами в перерахуванні на їх молекулярний, композиційний, токсикологічний склад та поживну цінність. При першому контакті з інспекторами Health Canada подавач має надати першопочаткову інформацію, яка містить

загальні дані щодо вже проведених експериментів та результатів, які будуть представлені. Після ще кількох співбесід, на основі даних, поданих аплікантом Health Canada та Environmental Canada, приймають рішення, чи є новий продукт харчування токсичним для довкілля та здоров'я людини. Термін оцінки поданого матеріалу 45 днів, після чого інспектори цих агенцій протягом 90 днів повинні прийняти рішення. Інформація щодо ліцензування нової продукції публікується та містить наступні дані: назву продукції, ім'я подавача, дату прийняття рішення та загальну інформацію стосовно ризику даної продукції для довкілля та здоров'я людини. Дані, на основі яких було прийняте рішення, не оприлюднюються. Формальних критеріїв оцінки безпеки харчової продукції, що містить ГМ домішки, не існує.

Подання, які стосуються ГМ продукції, отриманої застосуванням мікроорганізмів, мають супроводжуватися інформацією про систематику мікроорганізму, історію застосування цієї лінії, деталі щодо типу конструкції та свідченнями про відсутність патогенних характеристик. Після прийняття позитивного рішення в CanadaGazette друкується лише список нових продуктів без надання іншої інформації.

3.3.7. Аналіз директивних документів з біобезпеки та регулювання діяльності, пов'язаної з ГМ організмами, в Європейському Союзі. Законодавство ЄС з біотехнології існує з 90-х років, і за останнє десятиріччя воно було доповнено та змінено. ЄС розробив спеціальне законодавство з біобезпеки, спрямоване на захист здоров'я своїх громадян та навколишнього середовища в умовах впровадження продуктів біотехнологій (генетично модифікованих організмів та мікроорганізмів) на ринок країн ЄС. Під ГМО при цьому розуміють організми рослин та тварин, за винятком людини, та мікроорганізми, в яких генетичний матеріал

Розділ 3

був змінений засобами, що не зустрічаються в природних умовах. Головним захисним законодавчим інструментом є директиви ЄС, що регулюють діяльність в замкнених системах та порядок вивільнення генетично-модифікованих організмів. При цьому Директива щодо регулювання і вивільнення доповнена спеціальними постановами, що мають відношення до порядку появи на ринку харчових продуктів та кормів, що складаються (включають) з ГМО.

Принципи біобезпеки при здійсненні діяльності з ГМО в замкнених системах (Директива Європарламенту 2001/ 18/ЄС).

Директива Європарламенту 2001/18/ЄС є подальшим розширенням положень, спочатку включених у Директиву 90/219/ЄС, і регулює використання генетично модифікованих мікроорганізмів (у замкнених системах у дослідницьких та промислових умовах з метою захисту здоров'я людини та навколишнього середовища від ймовірних шкідливих впливів цих ГМО. Директива є базовим документом при розробці законодавства країн-кандидатів в ЄС, по здійсненню генно-інженерної діяльності в замкнених системах, що стосується різних видів ГМО.

У Додатках до Директиви чітко наведені методи (техніка) рекомбінації, що має відношення до отримання генетично-модифікованих мікроорганізмів. Директива регулює здійснення двох типів операцій з генетично модифікованими мікроорганізмами. Тип А - операції пов'язані з їх дослідженням, отриманням, використанням в освітніх програмах (не промислове, некомерційне використання, де об'єм культури не перевищує 10 л). Тип В - операції інші, ніж при типі А. За необхідністю заходів біобезпеки ГМО розділяють на дві групи. Група І мікроорганізмів задовільняє ряд критеріїв щодо вимог стосовно батьківських та реципієнтних організмів, молекулярним векторам та отриманню ГМО. Ця сукупність критеріїв передбачає, що ні вихідні, ні генетично модифіковані мікроорганізми не є патогенними

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

для людей та тварин. Крім того, ГМО повинні мати обмежену життєздатність в навколишньому середовищі без реакторів та ферментів. До групи ІІ мікроорганізмів відносять всі інші, включаючи патогенні.

У Директиві констатують, що з метою забезпечення необхідної безпеки, країни-члени ЄС повинні прийняти всі необхідні заходи для виключення небезпечних ефектів ГМО на здоров'я людини та навколишнє середовище, які можуть виникнути при використанні ГМО в замкнених системах. Головним принципом забезпечення біобезпеки є обов'язкова попередня оцінка ризику очікуваної діяльності. Користувачі ГМО (фізичні та юридичні особи) повинні провести попередню оцінку ризику для очікуваних операцій з ГМО в закритих системах. Компетентні державні організації потім оцінюють інформацію про ризик даної діяльності та приймають рішення про можливість її виконання. Ніяка діяльність не може виконуватись без оцінки ризику та дозволу компетентних організацій на її проведення.

У додатках до Директиви наведені параметри безпеки, які повинні бути визначені для оцінки ризику діяльності з ГМО. Такі параметри детально характеризують біологічні особливості вихідного матеріалу з генетично модифікованих організмів, виходячи з можливого їх небезпечного ефекту на здоров'я людини та навколишнього середовища. У Директиві виділено чотири групи параметрів для оцінки біобезпеки:

Характеристики біологічних особливостей донорів та реципієнтів (інформація про репродуктивні цикли, про природу патогенності, вірулентності, токсичності та векторів перенесення хвороб; інформація про присутність генів стійкості до лікарських препаратів, коло хазяїв та ін. (Всього 15 пунктів, обов'язкових для розглядання).

Характеристики ГМО (опис техніки отримання ГМО, структури та кількості ДНК вектора чи донора, що зберігається в кінцевій

Розділ 3
конструкції, рівень експресії нового генетичного матеріалу та ін. (Всього 8 пунктів, обов'язкових для розглядання).

Питання впливу ГМО на здоров'я (токсичність та алергічність організмів та їх метаболітів, параметри патогенності та ін.)

Питання, пов'язані з навколишнім середовищем (фактори, що впливають на виживання, розмноження ГМО в навколишньому середовищі, характеристика можливих хазяїв ГМО та ін.

Таким чином, регламентована вичерпна характеристика біологічних особливостей ГМО дозволяє оцінити ступінь небезпеки при здійсненні діяльності з ГМО та прийняти необхідні міри захисту.

Директивою передбачаються заснування компетентних організацій в країнах ЄС, які виконують міри по забезпеченню безпеки ГМО, що приймають та роздивляються заявки на генно-інженерну діяльність в замкнених системах. Передбачається, що до початку діяльності, у випадку необхідності, треба розробити та надати компетентним організаціям план захисних дій у випадку непередбачених обставин, що погрожують здоров'ю населення та навколишньому середовищу.

Директивою передбачається ще одна важлива частина системи біобезпеки - можливість надавати всю важливу інформацію громадськості та обговорення з громадськістю всіх аспектів у замкнених системах.

3.3.8. Аналіз існуючої структури регулювання біобезпеки США. У США існує кілька децентралізованих адміністративних структур з регулювання біотехнологічної діяльності: The Food and Drug Administration (FDA), the Environmental Protection Agency (EPA) та US Department of Agriculture. Функціонування регуляторної системи базується на уявленні, що ГМО не відрізняються від традиційних гібридів. Основним предметом діяльності регуляторної системи є

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

власне продукт біотехнологічних розробок, а не процес його створення. Таким чином, ГМО входить в ту саму сферу регулювання, що й немодифіковані об'єкти. На думку уряду, ті агенства, що здійснюють регулювання ГМО на даний момент, діють досить ефективно, й потреби в створенні централізованої установи немає. Будь-яка агенція може розглядати різні питання, пов'язані з ГМО, проте відповідальність за рішення стосовно кожного конкретного типу ГМО лежить на тій установі, в сферу регулювання якої він входить (рис. 3.3.2).

USDA. До складу цього відомства входить the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), який регулює питання пов'язані з:

захистом агрономічного сектора економіки США від загрози впливу шкідників та хвороб,

імпортом, перевезенням та польовими експериментами з ГМ рослинами, тваринами та мікроорганізмами,

оцінкою безпеки ГМО для довкілля (перевірка того, чи можуть впливати ГМ рослини на довкілля як інвазивні види),

контролем потенційних паразитів рослин, продуктів, які можуть бути паразитами рослин або продуктів, що містять генетичний матеріал від паразитів рослин.

EPA. Відповідає за всі питання, пов'язані з:

регулюванням різних видів пестицидів та встановленням норм їх споживання,

Встановленням правил регулювання ГМ рослин, створених для виробництва ними пестицидів,

Регулюванням використання біологічних пестицидів (мікроорганізми та ГМ мікроорганізми включно), оцінкою ризиків використання пестицидів на людське здоров'я, потенціальним впливом на довкілля (вплив на немішенні організми, розповсюдження в ґрунтах).

У сферу регулювання цього федерального відомства входить оцінка безпеки

Розділ 3
 продуктів харчування (корма для тварин, включно), що містить ГМ домішки (оцінка токсичності, алергійності, композиційного складу).

Частково FDA співпрацює з EPA в питаннях, пов'язаних із впливом пестицидів на здоров'я людини.

Якщо спробувати уявити координацію активності в галузі біотехнології між різними відомствами в США, то вона буде виглядати так:

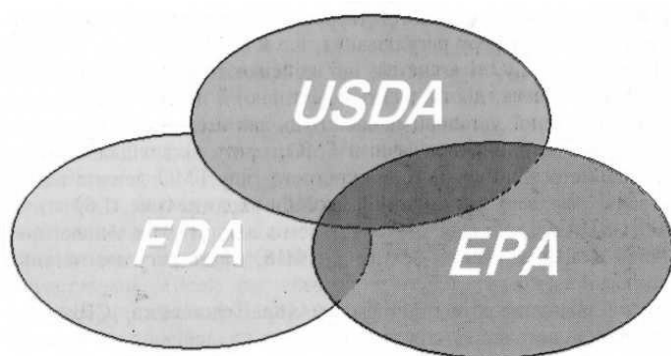


Рис. 3.3.2. Координація регуляторної активності в біотехнології між різними відомствами в США

Деякі нормативні документи:

FPPA (the Federal Plant Pest Act). Умови цього документа наділяють USDA відповідальністю за регулювання питань, пов'язаних з контролем шкідників рослин, об'єктів, що можуть бути шкідниками рослин, та продуктів або об'єктів, що містять генетичний матеріал від шкідників рослин. За останні приймають будь-які ГМО, при трансформації яких був використаний генетичний матеріал відшкідників рослин, будь-які ГМО, класифікація яких невідома, або будь-які ГМО, як і інспекція APHIS визначить як шкідників рослин. Проте, на даний момент у біотехнології широко використовують інші типи конструкцій (без генетичного матеріалу від патогенів), тому все більше ГМ рослин випадає зі сфери регулювання USDA.

FIFRA (the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act). Правила цього документа вимагають, щоби всі нові пестициди, які впроваджуються на ринок (розповсюдження, продаж та використання), проходили обов'язкову реєстрацію в EPA.

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

FDCA (the Federal Food, Drug and Cosmetic Act). Регулює всі питання, пов'язані з встановленням норм отруйних чи небезпечних речовин у сільськогосподарській продукції та деяких продуктах харчування.

TSCA (the Toxic Substances Control Act). Згідно з вимогами цього акту EPA регулює виробництво, продаж та використання буд-яких нових хімічних речовин. Дане визначення охоплює й ГМ мікроорганізми.

Microbial Commercial Activity Notice (MCAN). Регулює питання ліцензування, імпорту, експорту, продажу, транспортування, переробки виключно ГМ мікроорганізмів.

Подання на ліцензування ГМ продукції в США має кілька ступенів оцінки.

Дозволи, що стосуються ГМ рослин (юрисдикція APHIS): Пільговий дозвіл: стосується тих ГМ рослин, які не містять генетичного матеріалу від патогенних організмів і які виробник вважає безпечними для довкілля. Подання має супроводжуватися інформацією щодо типу генетичної конструкції, детальним описом того, чим саме ГМО відрізняється від свого немодифікованого аналога, та поясненням, чому виробник має право саме на цей вид дозволу. Рішення приймається APHIS протягом 60 днів, після чого виробник або отримує дозвіл, або мусить подавати на більш складний вид дозволу;

Notification Permit: до 1997 р. всі подання на отримання ліцензій щодо ГМО мали пройти через повну процедуру дозволу, проте з 1997 р. APHIS дозволив проводити ГМО, які позиціонуються, як ті, що не мають суттєвого ризику для довкілля через спрощену схему notification permit. Виробник має подати до APHIS інформацію, в якій детально описана відповідність ГМО б основним критеріям:

1. ГМ рослина не може бути шкідливим бур'яном, згідно з вимогами Federal Noxious Weed Act. .

2. Генетична конструкція, якою була трансформована рослина, є стабільною.

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

3. Експресія впровадженого генетичного матеріалу не може призвести до розвитку хвороби у рослини.

4. Експресія впровадженого генетичного матеріалу не може призвести до розвитку інфекційних захворювань. Впроваджена генетична послідовність не кодує речовини, які могли би бути токсичними для немішених організмів (тих, які живуть або харчуються на даному виді рослини).

5. Впроваджена генетична послідовність від рослинних вірусів не може призвести до появи будь-якого нового вірусу рослин.

6. Генетична конструкція не містить генетичного матеріалу від патогенів тварин або людини (послідовності, експресія яких може спричинити хвороби людей або тварин).

Крім того, пакет документів на отримання цього виду дозволу має містити інформацію щодо фізіологічних характеристик рослини, типу конструкції, опис ліній цієї рослини, інформацію щодо фенотипу та генотипу кожної лінії.

Більшість ГМ рослин у США сертифікуються саме через таку процедуру дозволу, тому що вважаються генетично стабільними, а звідси безпечними для довкілля.

Сертифікація тих ГМ рослин, які вважаються потенційно небезпечними (залежать від типу конструкції) або згідно з рішенням інспекторів APHIS не входять в рамки notification permit, включає найбільш складну схему дозволу. Повна схема дозволу включає результати польових експериментів плюс додаткова інформація щодо ГМ рослин, яка містить наступні пункти:

1. Вся генетична інформація щодо ГМ рослини.

2. Дані щодо країни та місцевості, де був отриманий організм донор, реципієнт та вектор.

3. Детальний план експериментів та їх кількість.

4. План транспортування ГМО.

Виробник відповідає за міри безпеки по запобіганню розповсюдження ГМО в довкілля.

Термін для винесення рішення APHIS становить 120 днів, протягом яких інспектори можуть вимагати будь-яку додаткову інформацію. Після прийняття рішення APHIS сповіщає регіональну агенцію про дозвіл. Проте навіть після отримання позитивного рішення аппліканти має подавати на додатковий дозвіл на транспортування, імпорт та експорт ГМО (тип інформації не вказаний). Рішення щодо цього дозволу приймається протягом 15-60 днів.

Виробники пестицидів, створених за допомогою ГМ мікроорганізмів, для отримання дозволу на продаж цієї продукції мають перш за все провести польові експерименти. Для отримання дозволу на їх проведення (Experimental Use Permit) виробник повинен подати в ЕРА наступну інформацію:

Коло можливих хазяїв даного виду мікроорганізму.

Потенційні вектори.

Засоби детекції ГМО.

Очікуваний об'єм та ділянки використання даного пестициду.

Прогноз щодо рівня та ступеня можливої небезпеки від застосування даного пестициду для довкілля.

Після отримання повного пакета даних (дані з експериментальних ділянок включно) рішення приймається інспекторами ЕРА протягом досить тривалого періоду (до 1-2 років).

Термін прийняття рішення може значно зменшитися, якщо виробник надасть докази того, що активні інгредієнти нової продукції частково подібні або ідентичні тим, що вже були колись зареєстровані («Metoo» registration).

Також в юрисдикцію ЕРА входять питання щодо регулювання ГМ рослин, створених для виробництва пестицидів. В основному ЕРА регулює ті рослини, що можуть бути небезпечними для немішених організмів. Згідно з правилами TSCA ЕРА регулює також питання, пов'язані з ГМ мікроорганізмами. У 1997р. розроблено окремий вид дозволу Microbial Commercial

Розділ 3

Activity Notice. У сферу регулювання цього документа входять всі питання, що стосуються ГМ мікроорганізмів. Для того, щоб отримати дозвіл на виробництво, продаж, переробку продукції, створеної за допомогою ГМ мікроорганізмів, виробник повинен мінімум за 90 днів до початку виробництва подати в ЕРА необхідну інформацію про:

- таксономію та опис генетики ГМ мікроорганізму,
- екологічні характеристики ГМО та його можливий вплив на біорізноманіття,
- загальну кількість продукції, що буде вироблена за допомогою ГМО,
- сфери можливого використання ГМО та деталі виробничого процесу,
- місця вироблення, переробки або використання ГМО плюс інформацію про аналогічні ділянки, які випадають зі сфери контролю виробника,
- транспортування та необхідні засоби безпеки під час перевезення ГМ продукції,
- експериментальні дані щодо впливу даного ГМО на довкілля та здоров'я людини.

ГМ мікроорганізми, що виробляються виключно для експорту, звільняються від потреби отримання МСАН. У цьому випадку виробник може подавати на кілька інших типів дозволів:

The Environmental Release Application (TERA). Використовується для регулювання польових експериментів з ГМ мікроорганізмами. Інформація, яку подає виробник для отримання цього дозволу, подібна до вимог МСАН, за винятком даних щодо деталей виробництва, використання, переробки та транспортування.

Test Market Exemption (TME). Дає дозвіл виробнику на комерційні операції з ГМ продукцією в обмеженому обсязі, проте тільки в тому випадку, коли виробник вже подав заявку на ліцензування в ЕРА, й вона знаходиться на ранніх стадіях розгляду.

FDA. Регулює всі питання щодо виробництва та постачання на ринок продуктів харчування, фармацевтичних та медичних

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація засобів, у тому числі і ГМ. Частково FDA співпрацює з ЕРА в питаннях, пов'язаних з впливом пестицидів на здоров'я людини.

Для отримання ліцензії на продаж виробник має надати до інспекторів FDA наступну інформацію:

- назву ГМ продукції, з якої рослини вона отримана,
- опис генетичної конструкції та очікуваний ефект від цього типу модифікації,
- прогнози, як ця модифікація може вплинути на склад або характеристики їжі,
- порівняльний аналіз композиційного складу або інших характеристик ГМ продукції з аналогічними показниками традиційних продуктів харчування,
- оцінку можливої токсичності ГМ продукції.

Цю інформацію потрібно надсилати в FDA мінімум за 120 днів до постачання ГМ продукції на ринок. Після прийняття рішення FDA на своєму веб-сайті публікує лист до виробника, в якому вказується регуляторний статус ГМ продукції, часткова інформація, надана виробником, та інформація стосовно прийнятого рішення.

На даний момент як FDA, так і виробники продуктів харчування в США, чії інтереси захищає Міжнародна рада по харчовій біотехнології, вважають, що потреби в розробці нових нормативних актів, які б регулювали виробництво та споживання продуктів харчування та харчових компонентів, які отримують за допомогою рекомбінантних ДНК, немає. Основою для такого ствердження є те, що будь-який неліцензований продукт харчування або харчовий інгредієнт (незалежно від засобу його отримання) в США і так має пройти перевірку на токсичність, чистоту та алергійність. Якщо в результаті генетичних маніпуляцій склад дозволених до продажу продуктів харчування або харчових інгредієнтів сильно змінюється, то компанія- виробник після ретельної перевірки безпеки такої продукції повинна супроводити їх спеціальним ярликом,

який буде повідомляти, що даний продукт відрізняється від традиційного.

Практичний блок.

Генетично модифіковані рослини в лісовому секторі

Вперше модифікацію деревовидних рослин здійснено у 1986 р. для *Populus*, і з того часу цю родину активно використовують як модельний об'єкт для різноманітних експериментів у галузі біотехнології та генетичних модифікацій. Перша публікація стосовно вбудовування чужерідного гена в геном хвойних (*Larix*) з'явилася в 1991 р., а інтродукція нових генів у геном хвойних стала одним з основних напрямів генетичної модифікації деревних рослин. Дослідження в цьому напрямку, насамперед, мають на меті покращення якості деревини.

За станом на 2004 р. про дослідження в області генетичної інженерії деревовидних рослин повідомляли 35 країн, а 16 з них проводили також певні польові випробування. Рисунок 3.3.3. дає інформацію про те, які саме деревовидні рослини стали об'єктом для генно-інженерних маніпуляцій з ними.

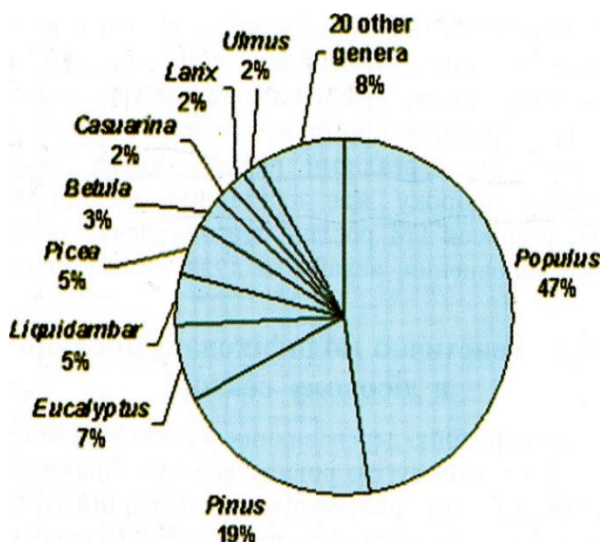


Рис. 3.3.3. Розподіл активності з генетичної трансформації різних деревовидних рослин (у процентах від загальної кількості повідомлених випадків трансформації)

Переважає більшість польових випробувань генетично модифікованих дерев здійснювалась на невеликих площах (виросливали від 12 до 2 850 дерев) і лише в Китаї висаджені комерційні плантації ГМ дерев (*P. nigra*) на площі понад 300 га. Основні ознаки, за якими трансформуються деревовидні породи рослин, - стійкість до гербіцидів, до комаховидних шкідників, модифікація періоду цвітіння, якісна та кількісна модифікація лігніну.

Питання до самоконтролю:

1. В чому проявляється реалізація генів Ті-плазмід

- 1) надсинтезі гормонів
- 2) синтезі спеціальних амінокислот
- 3) синтезі ферментів
- 4) наявністю специфічних амінокислот

2. Віруси не містять:

- 1) дЛ РНК
- 2) оЛ РНК
- 3) (-) РНК
- 4) (+) РНК

3. Суперкапсид складається з:

- 1) ліпопротеїдів
- 2) глікопротеїдів
- 3) нуклеопроїдів
- 4) нуклеїнової кислоти

4. До вірусних нуклеїнових кислот відносяться

- 1) Дл ДНК
- 2) Дп РНК
- 3) Ол ДНК
- 4) Транскриптаза

5. З якою метою в фітовірусології використовуються методи біотехнології :

- 1) отримання безвірусного посадкового матеріалу
- 2) діагностики
- 3) ідентифікації вірусів
- 4) культивування вірусів на поживних середовищах

Розділ 3

Діагностика та ідентифікація ГМО, ДНК – паспортизація

6. Рослинні-індикатори-це:

- 1) рослини які дають чітку специфічну реакцію на певний вірус, яка відрізняється від реакції цієї рослини на інший вірус.
- 2) які рослини дають чітку реакцію на певний вірус, яка не відрізняється від реакції цієї рослини на інший вірус.
- 3) рослина яка є нечутливою до певного вірусу
- 4) рослина-господарь

7. Першим етапом екстракції фіто вірусу С:

- 1) освітлення
- 2) діаліз
- 3) центрифугування
- 4) подріблення у гомогенізаторі

8. Віруси були відкриті:

- 1) Р.Кохом
- 2) Л.Пастером
- 3) Д.Івановський
- 4) Р.Гуком

9. Типи симетрії вірусів:

- 1) спіральна
- 2) ізометрична
- 3) змішана
- 4) дзеркальна

10. Визначте тип нуклеїнової кислоти вірусу тютюнової мозаїки:

- 1) од (-)РНК
- 2) од ДНК
- 3) дд РНК
- 4) дд.ДНК

Література

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение,-М.: Мнр, 2002.-С. 379-387.
2. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. -Киев: Наук, думка, 1997.-152 с.
3. Daniell H., Khan M. S., Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology // TRENDS in Plant.Sci.-2002.-V.7, №2.-P.84-91.
4. Gleba Yu., Marillonnet S., Klimyuk V. Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructedvirus' strategies // Curr.Opinion in Plant Biology. - 2004. - V. 7 - P.182-188
5. Maliga P. Plastid Transformation in High Plants // Ann. Rev. Plant Biol. -2004. -55.-P. 289-313
6. Miki B., S.McHugh Selectable markers genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety // J.Biotechnology.- 2004,-v. 107.-p. 193-232.
7. Niederhauser, C., Gilgen, M., Meyer, R. Gentechnologisch veränderte pflanzliche Lebensmittel: Stand der anwendungsorientierten Forschung und potentielle Nachweismöglichkeiten mit molekularbiologischen // Methoden. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.- 1996.-V. 87.-P. 307-367.
8. Pauls K.P. Plant biotechnology for crop improvement // Biotechnol. Asv.-1995.-v. 13.-P.673-693.
9. Th.R.Sinclair, L.C.Purcell, C. H. Sneller Crop transformation and the challenge to increase yield potential // TRENDS in Plant.Sci.- 2004.-v.9,N2.-P.70-75.



4

Генетика імунітету до
збудників хвороб і шкідників

Тема 4.1. Імунітет рослин у сучасному землеробстві



4.1.1. Проблеми від шкідливих організмів у сільськогосподарському виробництві.

Рослини за вирощування піддаються негативному впливу від широкого спектру шкідників та збудників хвороб (бактерії, гриби та грибоподібні організми, віруси, нематоди та тощо). У середньому 26% світового виробництва продукції рослинництва щорічно втрачається через шкідників і збудників ще до збирання врожаю. Зростання людського населення, втрата сільськогосподарських угідь через зміни клімату, ерозії та нестача води вимагають максимально зменшити втрати у виробництві, які спричиняють шкідливі організми. Чотири основні культури, які вирощують у світі, рис (який годує більше половини світового населення), пшениця, кукурудза та банан знаходяться під постійною загрозою розвитку та поширення нових інфекційних хвороб у країнах з різним розвитком аграрного виробництва. До серйозної біологічної загрози продовольчій безпеці відносять *Puccinia graminis* f. sp. tritici (збудника стеблової іржі пшениці), сильно вірулентний штам якого (Ug99) виник у 1998 р. у Східній Африці. Цей штам подолав гени стійкості, які використовували в культурі для боротьби зі стебловою іржею і різко поширився на Африканському континенті та в Азії. Такі небезпечні хвороби як чорна сігатока (Black Sigatoka) (збудник – *Mycosphaerella fijiensis*) та панамська хвороба (збудник – *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubensis*) загрожують банановим полям в країнах, де ця культура є основним продуктом харчування. Виробництво сої у всьому світі обмежується нематодами та іржею, спричиненою грибом *Phakopsora pachyrhizi*. У поєднанні з поширенням патогенів внаслідок зміни клімату є численні

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників приклади виникнення хвороб, які можуть перерости в неконтрольовані епіфітотії та поставити під загрозу продовольчу безпеку, якщо не будуть розгорнуті контрзаходи.

4.1.2. Історія розвитку імунітету рослин.

Уявлення про імунітет рослин складались поступово і перші наробики у цьому напрямі мали вигляд опису, спостережень і зафіксовані у роботах Аристотеля (IV ст. до н.е.), його учня Теофраста (III ст. до н.е.) та Плінія молодшого (I ст. н.е.). У них висували ряд припущень можливості виникнення хвороби, переходу її з рослини на рослину, відмінностей стійкості у культурних та диких рослин.

Незважаючи на те, що інфекційність хвороб рослин було доведено ще в XVIII ст., імунологічні реакції рослин почали досліджувати лише наприкінці XIX століття.

На той час уже було встановлено основні принципи вчення про імунітет тварин, засновником якого був І.І. Мечников. Він сформулював фагоцитарну теорію імунітету, за яку був удостоєний Нобелівської премії у 1908 р.

Наприкінці XIX століття було створено ряд теорій про природу імунітету рослин до хвороб, але вони базувались лише на окремих факторах стійкості. Основоположною роботою в галузі імунітету рослин стала монографія М.І. Вавилова "Імунітет рослин до інфекційних захворювань", опублікована 1919 р., в якій було підсумовано його дослідження, а також проаналізовано всі наявні на той час відомості про імунітет рослин, зроблено висновки та узагальнення. М.І. Вавилов систематизував усі відомі типи стійкості рослин на дві категорії, які назвав пасивним, або механічним і активним, або фізіологічним імунітетом. Він вперше пов'язав імунітет рослин з їх генетичними особливостями, обґрунтував теоретичні основи селекції культурних рослин на імунітет до паразитичних організмів. Вавилов дійшов висновку, що чим вужча спеціалізація паразита відносно видів і родів

Розділ 4

рослин, тим більше шансів виявлення імунних форм у межах окремих видів рослин. Він встановив закономірності формування і принципи географічного поширення імунних та сприйнятливих форм рослин, що дозволили зробити висновок: стійкі форми рослин необхідно шукати на первинній батьківщині культурної рослини.

Проривом у розвитку фітоімунології було відкриття американськими фітопатологами Е. Стекманом і Ф. Пімайзелом фізіологічних рас у збудника стеблової іржі, що дало можливість зрозуміти основну причину втрати сортами стійкості проти хвороби, що зводила нанівець усі зусилля селекціонерів.

Генетичним вираженням теорії спорідненої еволюції П.М. Жуковського стала гіпотеза американського фітопатолога Флора "ген на ген", згідно з якою генетичні системи рослини-живителя і патогена взаємодіють між собою за принципом комплементарності, тобто, кожному гену, що контролює стійкість рослини, відповідає специфічний ген, що контролює вірулентність патогена. Взаємодія між парами таких комплементарних генів і визначає сприйнятливість або стійкість рослини до певної раси.

Значний внесок у розвиток фітоімунології зробили Е.Е. Гешеле, Т.І. Федотова, М.В. Горленко, Ю.Т. Дьяков, М.П. Лісовий, В.І. Кривченко, Н.М. Гусєва, Б.Г. Рейтер, І.Г. Одінцова.

Початкове розуміння стійкості до хвороб рослин було сформовано роботою Флора (1955) понад півстоліття тому, яка генетично визначила концепцію "ген до гену" як потребуючого гена авірулентності (*Avr*) у збудника та гена R у рослини - хазяїна. Хоча перший ген *Avr* (*AvrA*) був клонований 30 років тому, ідентифікація та клонування одиночних локусів резистентності R генів зайняли значно більше часу. Перший ген стійкості *Pto* з томатів надав стійкість до штамів *Pseudomonas syringae*. Паралельно перші "справжні" (нуклеотид-зв'язуючі ділянки, багаті лейцином повторення; NLR) R гени були ідентифіковані в

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників арабідопсиса. Згодом багато інших генів R були швидко ідентифіковані, в основному в арабідопсиса та томатах, які надавали стійкість до різних патогенів, включаючи віруси, бактерії, гриби та грибоподібні організми.

4.1.3. Переваги вирощування стійких сортів.

Найбільш ефективною є інтегрована система захисту культур від шкідливих організмів. Але зазвичай перевагу віддають фітофармакологічним засобам захисту, вважаючи їх ефективнішими за інші способи захисту. При цьому чомусь забувають про екологічні наслідки, виникнення резистентних форм шкідливих організмів, значну вартість пестицидів, низьку ефективність при захисті рослин від багатьох захворювань, наприклад, корневих гнилей, білої та сірої гнилей соняшнику, хвороб овочевих культур. У центрі інтегрованої системи захисту повинні стояти стійкі сорти.

Переваги вирощування стійких сортів:

1. Вирощування стійких сортів зумовлює поліпшення фітосанітарного стану в агробіоценозах.

2. Стійкі сорти сприяють ефективності організаційно-господарських, агротехнічних, біологічних, генетичних та інших заходів з обмеження чисельності та поширення шкідливих організмів.

3. На стійких сортах пестициди або взагалі не застосовують, або застосовують в обмежених обсягах, завдяки чому:

а) знижується забрудненість сільськогосподарської продукції, ґрунту, джерел води та повітря;

б) зберігаються корисні організми та нейтральні живі компоненти навколишнього середовища;

в) розширюються можливості розвитку бджільництва та шовківництва;

г) поліпшуються умови для запилення перехреснозапильних культур, завдяки чому зростає їх урожайність;

Розділ 4

д) знижується або взагалі відсутня фітотоксична дія пестицидів;

є) значно знижується собівартість продукції рослинництва та зростає рівень рентабельності її виробництва. Адже, зокрема, вартість хімічного захисту одного гектара пшениці становить 30 \$, цукрових буряків – 95, соняшнику – 45, картоплі – 33. Україна належить до країн, де рівень виробництва хімічних засобів захисту рослин задовольняє потреби сільськогосподарського виробництва не більше ніж на 14–18%. Решту потреби необхідних пестицидів компенсують за рахунок їх імпорту. Витрати на закупівлю цих засобів перевищують 300 – 350 млн американських доларів. Окрім того, значною є окупність селекції на стійкість до шкідливих організмів. За даними спеціалістів США прибуток у результаті селекції комплексно стійких сортів складає 300 доларів на 1 долар вкладень.

4.1.4. Досягнення в імунітеті рослин. Існує багато прикладів вирішення значних втрат в агропромисловості за впровадження стійких сортів:

- В Англії, де рак картоплі набув епіфітотійного розвитку наприкінці ХІХ-го – на початку ХХ-го століття, у 1914 році було прийнято закон, згідно з яким заборонялося вирощувати сприйнятливі до нього сорти картоплі під загрозою штрафу у 10 фунтів стерлінгів у разі його невиконання. І сьогодні проблема захисту картоплі від цієї хвороби у всьому світі розв'язується селекційним шляхом, у тому числі й в країнах СНД, де свого часу створено цілий ряд стійких сортів (Темп, Сулев, Олев, Гатчинська, Юбель та ін.).

- Створення панцирних сортів соняшнику, які не уражуються соняшниковою вогнівкою.

- Сорт озимої пшениці Безоста 1, створений П.П. Лук'яненком майже 60 років тому, що вирізняється високим рівнем стійкості щодо жовтої, середньою польовою витривалістю щодо бурої та стеблової іржі,

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників вирощували багато років на території Союзу та інших країн на площі близько 8 млн га.

Генетично - модифіковані рослини стали новим проривом у захисті рослин. З 1995 р. успішно випробувано у виробничих умовах трансгенний сорт олійного ріпаку Redy, стійкий до гліфосату (ф. "Монсанто"), сорт Innovator, що не пошкоджується глюфосинатом (ф. "АгрЕво"), сорт 45Ф71, стійкий до імазетапіру (ф. "Ціанамід"). У Канаді створено сорт льону олійного FP 967 з геном, що кодує фермент ALS-синтазу і знижує токсичність сульфоналсечовини. Його можна без побоювання висівати в сівозміні після зернових, що оброблялися цим гербіцидом.

Перспективними є роботи з безпосереднього перенесення *Bt*-генів, що кодують білкові токсини, від бактерій у геноми рослин. Уже створено трансгенні рослини кукурудзи, стійкі до кукурудзяного стеблового метелика (ф. "Новартіс" і "Монсанто"), бавовнику – до совок (ф. "Монсанто"). Давно вже широко відомий канадський трансгенний сорт картоплі Новий лист, стійкий до колорадського жука, з трансформованим від *Bacillus thuringiensis* v. *tenebrionis* геном, що кодує синтез рослинного білка-токсину.

У ВНДІБЗ (Росія) створено трансгенні рослини тютюну, що не пошкоджуються непарним шовкопрядом, лучним метеликом і озимою совкою, картоплі – з підвищеною стійкістю до колорадського жука.

Важливим напрямом генної інженерії є трансформація генів, що контролюють синтез токсичних для сисних і інших комах пектинів та інгібіторів різних ферментів (протеаз, холестериноксидаз, ліпоксигеназ і ін.). Зокрема, в геном рослин суниці за допомогою *Agrobacterium* трансформовано ген – інгібітор синтезу трипсину вигни, що забезпечило їх стійкість до суничного довгоноса (*Otiorrhynchus sulcatus*).

Новим перспективним напрямом генної інженерії в обмеженні шкодочинності фітофагів є створення рослин із генами, що кодують синтез аналогів феромонів, які

Розділ 4

приваблюють корисних комах (хижаків та паразитів фітофагів).

Дуже перспективне використання прийомів біотехнології і генної інженерії у створенні стійких рослин до вірусних хвороб, де класична селекція до цього часу не дала вагомих результатів. У цьому плані вивчають можливості трансгенозу в геном рослин генів білків оболонки вірусів, антисмислові версії реплікази або фактори реплікації вірусів, що тим або іншим чином блокують відтворення віріонів у клітинах рослин (порушують процес вивільнення їх від білкових оболонок, синтез білків – компонентів білкової оболонки віріонів, нуклеїнових кислот, транспортування нуклеїнових кислот від однієї клітини до іншої тощо). Таким чином створюють трансгенні рослини, стійкість яких проти вірусів зумовлена: експресією транспортних білків; посттрансляційною "мовчанкою" генів; експресією антивірусних антитіл; експресією антивірусних елісаторів тощо. Зокрема, у Канаді створено трансгенні рослини картоплі, трансформовані білком вірусу скручування листя, що впродовж п'яти років вегетаційних і польових випробувань виявляли підвищену на 32 – 71% стійкість проти цієї хвороби. В Аргентині білок Х-вірусу картоплі експресували в трансформовані рослини тютюну, завдяки чому вони набули стійкості проти вірусу тютюнової мозаїки та інших вірусів. У Китаї одержано трансгенні рослини томатів з подвійною стійкістю до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) і вірусу огіркової мозаїки (ВОМ). Шляхом клонування генів СРТМV (ВТМ) і СМV (ВОМ) і трансформування їх у рослини томатів одержали трансгенні лінії, стійкі до ВТМ, ВОМ і бактеріального в'янення. У результаті трансформації гена білка оболонки вірусу мозаїки огірку досягається підвищення стійкості до різних вірусів. Одержано трансгенні лінії конюшини, що містять три різних конструкції з геном оболонки білка вірусу жовтої мозаїки квасолі. Це забезпечило

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників високий та середній рівні стійкості до цієї хвороби.

Існує ряд напрямів створення трансгенних рослин, стійких до збудників грибних хвороб. Зокрема, це трансформація у геном рослин генів, які кодують синтез фітоалексинів, ферментів, що знешкоджують гідролітичні ферменти і токсини патогенів; еліситинів, генів барнази і "Barstar"-гена, які зумовлюють реакцію надчутливості; хітинази і β -1,3 глюканази, що призводять до лізису гіф грибів; антигрибних білків і білків, пов'язаних з патогенезом.

Впродовж останніх років розроблено чимало методів генетичної інженерії для створення стійких проти бактеріальних хвороб сортів рослин. Зокрема, це трансформація до генетичних систем рослин генів, які кодують продукування антибактеріальних білків нерослинного походження (літичних пептидів, лізоцимів і ін.); інгібування бактеріальних токсинів; підвищення природних захисних властивостей рослин; штучна індукція загибелі клітин у місцях проникнення інфекції тощо.

У результаті трансформації гена винограду, який контролює активність ферменту стильбенсинтази, у рослини томатів підвищено їх стійкість до фітофторозу, а картоплі – до фітофторозу і фузаріозу. За трансформації генів амаранту і редьки, які кодують утворення антибіотиків, у рослини тютюну і картоплі підвищено стійкість останніх до бактеріальних і грибних хвороб. Ідентифікація й ізоляція гена, що кодує білок, який інгібує полігалактуранази малини, дали можливість використати його як джерело стійкості до збудника сірої гнилі.

Практичний блок

Вивчення прояву імунітету та стійкості пшениці до збудника бурі іржи

Мета: Вивчити два різні поняття – імунітет та стійкість рослин

Розділ 4

Обговорення результатів. Різниця за стійкістю до збудників іржі проявляється якісно – за типами ураження, при чому основне значення мають кількість і розмір пустул. Тип ураження враховує і прояв рослиною захисної реакції у вигляді хлорозів та некрозів. Чим більше виражена захисна реакція, тим вища стійкість сорту. В імунних сортів пустули гриба не утворюються, місця зараження помітні за знебарвленими ділянками листка. На листках сприйнятливих сортів захисна реакція рослин не проявляється, і розвиваються великі пустули гриба.

Питання до самоконтролю:

1. Яка раса *Puccinia graminis* f. sp. tritici подолала гени стійкості до збудника стеблової іржі пшениці?

- а) Ug99
- б) Pg 32
- в) Pg110
- г) 125

2. Цілковита несприйнятливість рослин до зараження чи пошкодження шкідливими організмами

- а) стійкість
- б) толерантність
- в) імунітет
- г) антибіоз

3. Засновник фітоімунології.

- а) Ю.Т. Дьяков
- б) І.І. Мечников
- в) Е.Е. Гешеле
- г) М.І. Вавилов

4. Створення панцирних сортів соняшнику забезпечило стійкість до

- а) збудника білої гнилі соняшнику
- б) соняшникової вогнівки
- в) сірого довгоносіка
- г) дротяників

5. Трансгенний сорт олійного ріпаку Redy стійкий до

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

- а) гліфосату
- б) трипсину
- в) сульфонілсечовини
- г) полігалактуранази

6. Канадський трансгенний сорт картоплі, стійкий до колорадського жука, з трансформованим від *Bacillus thuringiensis* v. tenebrionis геном, що кодує синтез рослинного білка-токсину.

- а) Пауль Вагнер
- б) Новий лист
- в) Гранада
- г) Кур'єр

7. Найважливіше використання прийомів біотехнології і генної інженерії у створенні стійких рослин до

- а) вірусів
- б) фітоплазм
- в) комах
- г) грибів

8. У результаті трансформації гена винограду, який контролює активність ферменту стильбенсинтази, в рослини томатів підвищено їх стійкість до

- а) фітофторозу
- б) альтернаріозу
- в) септоріозу
- г) церкоспорозу

9. Який захист рослин є найвитратнішим?

- а) біологічний
- б) імунологічний
- в) фізичний
- г) хімічний

10. Характеристика сорту пшениці за шкалою Мейнса і Джексона при ураженні бурою іржею: урединії зовсім не утворюються, іноді на листках з'являються невеликі некротичні плями

- а) помірно стійкий
- б) гетерогенний
- в) імунний
- г) дуже стійкий

Тема 4.2. Властивості патогенів рослин



4.2.1. Трофіність фітопатогенів. Характер впливу фітопатогена на рослину визначається особливостями його паразитизму. Паразити за типом живлення поділяють на біотрофів і некротрофів. Кожної з груп паразитів властиві свої способи впливу на рослину, що визначає характер порушень у рослинному організмі й відповідно прояв симптомів хвороби. Біотрофи тривалий час живляться за рахунок живої клітини рослини-живителя. Некротрофи спочатку вбивають клітину рослини, а потім живляться її вмістом.

4.2.2. Паразитизм мікроорганізмів. А. де Барі поділив мікроорганізми на 4 групи: облигатні паразити, факультативні сапрофіти, факультативні паразити та облигатні сапрофіти.

Облігатні паразити – це організми, які живляться тільки за рахунок живих клітин рослини-живителя і ніколи не ведуть сапрофітного способу життя. Для них характерна повна залежність від рослини-живителя. Тому, після проникнення паразита в клітину останнього, взаємовідносини між ними на перших етапах близькі до симбіотичних. Паразит істотно впливає на загальний перебіг процесів у клітинах сприйнятливої рослини, спрямовуючи весь обмін речовин у потрібному для нього напрямку. Однак на початку захворювання ці зміни не завдають серйозної шкоди рослині-живителю, бо припинення життя клітини призвело б до загибелі паразита. Клітина гине лише після того, як паразит утворює спороношення. Рослини, що уражуються облигатними паразитами, мають бути міцними і життєздатними, аби паразит, що повною мірою залежить від існування рослини, не міг досягти репродуктивної стадії. Облігатні паразити, як правило, є вузькоспеціалізованими

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників організмами, здатними уражувати тільки певні види, а іноді – й сорти рослин. Типові представники цієї групи – збудники іржастих, борошнистороссяних, сажкових хвороб, пероноспорозів, раку картоплі, кили капустияних та ін.

Факультативні сапрофіти (напівпаразити) – це організми, які здебільшого ведуть паразитичний спосіб життя, але за певних обставин можуть існувати і як сапрофіти. Рівень їх спеціалізації значно вужчий, ніж у попередньої групи, бо вони мають вужче коло рослин-живителів. Типовими представниками цієї групи є збудники багатьох шкодочинних хвороб (*Venturia inaequalis* Wint., *Phytophthora infestans* de Bary, *Septoria* spp. Fr.)

Факультативні паразити (напівсапрофіти) – це організми, які все життя існують як сапрофіти, але здатні за допомогою своїх токсичних виділень руйнувати і живі тканини (здебільшого старі, пошкоджені та ослаблені). Вони є паразитами у вузькому розумінні, бо спочатку вбивають клітини рослини-живителя, а потім живуть на мертвих рештках. Такі організми, як правило, не є вузькоспеціалізованими і здатні уражувати широке коло рослин-живителів. Більшість з них добре ростуть на різних живильних середовищах. Типовими представниками цієї групи є збудники різних гнилей (*Botrytis cinerea* Fr., *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary, *Monilia fructigena* West.).

Облігатні сапрофіти – організми, живильним субстратом для яких можуть бути тільки мертві органічні речовини. Серед них багато корисних організмів, завдяки яким, зокрема, розкладаються органічні рештки і створюється природна ґрунтова родючість. Велика група сапрофітних базидіомікотів надана істивними грибами. Але багато з них є дуже шкідливими руйнівниками деревини, чинниками псування тваринних та рослинних жирів, продуктів переробки сільськогосподарської сировини тощо.

Розділ 4

4.2.3. Патогенність мікроорганізмів.

Патогенність – це здатність організмів до ураження. **Вірулентність** – якісний бік патогенності, здатність патогена уражувати певні сорти (генотипи) рослини. Вірулентність контролюється генами вірулентності. **Агресивність** – кількісний бік патогенності, визначає здатність патогена викликати той чи інший ступінь розвитку хвороби. Визначається наступними показниками: тривалістю інкубаційного періоду, інтенсивністю спороношення, розміром ураження тощо. Вірулентність патогенів у переважній більшості контролюється ядерним апаратом, на агресивність значний вплив має цитоплазма. Прояв агресивності залежить від зовнішніх умов середовища, тому агресивність сильно варіює. Вірулентність змінюється лише за умов змін у генетичному апараті збудника.

4.2.4. Спеціалізація патогенів рослин.

Найбільше значення у захисті рослин від хвороб має фізіологічна спеціалізація, яка проявляється у пристосованості патогенів заражати певний рід, вид і навіть сорт рослин.

Першим етапом вивчення фізіологічної спеціалізації було відкриття Еріксона (1894) відносно того, що гриби можуть відрізнятися не тільки за морфологічними, а і за фізіологічними особливостями. Він першим встановив спеціалізацію паразитів на рослинах-живителях – існування фізіологічних форм, які неможливо розрізнити морфологічно, але які різняться за здатністю паразитувати на певних видах і родах рослин. До Еріксона вважали, що *Puccinia graminis* Pers. спричиняє стеблову іржу у пшениці, жита, ячменю, вівса і багатьох злакових трав. Але він виявив, що цей патоген з пшениці може уражувати тільки пшеницю, але не уражує вівса; з вівса – уражує овес, але не уражує пшениці й ячменю; з жита – уражує жито і ячмінь, але не уражує пшениці та вівса. Таким чином, він довів: популяція *P. graminis* неоднорідна, а складається з цілого

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників ряду фізіологічних форм, які практично не різняться морфологічно, але вузькоспеціалізовані щодо рослин-живителів. Їх було названо спеціалізованими формами – *forma speciales*. Так було встановлено шість спеціалізованих форм у *P. graminis* (*P. graminis* f. sp. *tritici*, *P. graminis* f. sp. *secalis*, *P. graminis* f. sp. *avenae* та ін.). Отже, цей рівень спеціалізації відображає взаємовідносини між спеціалізованими формами патогена і родами родини *Poaceae*.

Після встановлення Й. Еріксоном різновидів у межах виду *Puccinia graminis* E. Стекмен і Ф. Пимайзел зробили наступний крок у вивченні спеціалізації іржастих грибів. Вони встановили, що спеціалізовані форми грибів неоднорідні й діляться на ще *більше вузькоспеціалізовані фізіологічні раси, приурочені до певних сортів*.

На сьогодні відомо понад 300 фізіологічних рас у *P. graminis* f. sp. *tritici*. Виявлено раси у збудників різних хвороб (у *Ustilago nuda*, *Ustilago tritici*, *Ustilago avenae*, *Phytophthora infestans*, *Synchytrium endobioticum*, *Drechslera graminea*, *Fusarium solani*), у квіткового паразита *Orobanchе cumanа* тощо.

Оскільки фізіологічні раси різняться між собою за реакціями, які спричиняють на різних сортах рослин-живителів, то це й покладено в основу їх ідентифікації (визначення). Для ідентифікації фізіологічних рас використовують сорти-диференціатори відповідних культур, з яких складають набори. Для певного збудника існують міжнародні (стандартні) набори сортів-диференціаторів.

Біотипи патогена – дрібні спеціалізовані форми патогена у межах фізіологічних рас, які різняться за здатністю паразитувати на певних генотипах (сортах) рослини-живителя. Наявність біотипів свідчить про те, що раси патогенів неоднорідні за своїм складом. Вони можуть бути представлені різними штамами, які відрізняються один від одного фізіологічними

властивостями. Деякі біотиби можуть стати новими фізіологічними расами.

4.2.5. Емпірична методика вивчення вірулентності (визначення рас). Уперше емпіричну методику вивчення вірулентності іржастих грибів запропонував американський фітопатолог Е. Стекмен. Він підібрав набір з 12 сортів, які відрізнялись стійкістю до північноамериканських ізолятів стеблової іржі *Puccinia graminis*. Цей набір був названий шкалою сортів-диференціаторів. З популяції іржі виділяли і розмножували спори з окремих пустул (монопустульні ізоляти), а потім отриманим інокулюмом заражали проростки. За взаємодії з сортами-диференціаторами спостерігали реакції: сумісна (S), стійка (R) і змішана (X). Групи ізолятів, що показують однакову реакцію з диференціаторами, поєднували у фізіологічні раси, яким у міру їх визначення були надані порядкові номери.

Ці принципи були застосовані для визначення расового складу збудників хвороб основних біотрофних паразитів. Для зручності порівняння результатів, отриманих у різних регіонах земної кулі, набори сортів-диференціаторів уніфікували та запропонували міжнародні шкали для кожного збудника хвороби. Для практичної роботи реакції стандартних сортів на зараження різними расами були зведені у таблиці-ключі. Приналежність будь-якого досліджуваного ізоляту до раси визначали, порівнюючи результати його взаємодії з сортами-диференціаторами та з таблицею - ключем.

Емпірична диференціація зіграла велику роль у вивченні вірулентності рас і структури популяцій багатьох фітопатогенів. Отримані результати показали, що фізіологічні раси розрізнялись вірулентністю до сортів-диференціаторів. У ході вивчення структури популяцій було встановлено, що вони, як правило, складаються з декількох рас, тобто популяції поліморфні за вірулентністю.

Практичний блок

Вивчення вірулентності та агресивності збудника темно-бурої (сітчастої) плямистості ячменю

Мета: Навчитись визначати вірулентність та агресивність патогенів рослин

Завдання 1. Отримати моноспорові ізоляти

Матеріал та обладнання. Мікроскопи, предметне та покривне скло; культура гриба; чашки Петрі з живильним середовищем.

Зміст завдання. Отримати краплі, в яких знаходиться лише одна спора гриба, і перенести її на живильне середовище. Кожна крапля з однією спорою дає початок моноспоровому ізоляту.

Методика і хід роботи. Для отримання моноспорових ізолятів розроблено декілька методів. Нижче наведено три методи, користуючись якими, можливо отримати моноспорові ізоляти.

1 метод. У стерильній воді готують суспензію спор гриба. На предметне скло піпеткою наносять одну краплю суспензії і під мікроскопом підраховують кількість спор у ній. При n спор суспензію розбавляють стерильною водою в $(n+1)$ раз. На покривне скло наносять по одній краплі суспензії і проглядають краплі під мікроскопом. Краплі, які містять одну спору, переносять разом із склом на живильний субстрат. При цьому скло перевертають краплею донизу.

2 метод. Піпеткою беруть розбавлену суспензію спор і наносять її краплі на тонкий шар агарового середовища в чашках Петрі. Краплі розташовують на деякій відстані одну від одної. Чашку Петрі обережно перевертають і проглядають краплі під мікроскопом, перевіряючи кількість спор у кожній з них. Краплі, які містять по одній спорі, відмічають на склі маркером. Потім чашку перевертають і поміщають у термостат при температурі, яка оптимальна для росту цього гриба.

Колонії, отримані з однієї спори, є моноспоровим ізолятом. Для розмноження його пересівають у пробірки на живильне середовище.

3 метод. Готують розбавлену суспензію спор у стерильній воді. Краплі суспензії наносять на середовище і розмазують по його поверхні шпателем.

Розділ 4

Чашки Петрі витримують при температурі 24 °C 16-17 годин, зазвичай, за цей час спори починають проростати.

Проглядають під мікроскопом при малому збільшенні поверхню агару в чашках, вибирають поодинокі спори, які проросли, і вирізають агарові блоки з ними. Агаровий блок із спорою, яка проросла, переносять стерильною голкою на живильне середовище у чашку Петрі чи пробірку, яку потім поміщають у термостат на інкубацію. Отримана таким чином культура буде моноспоровим ізолятом.

Завдання 2. Вивчення вірулентності і агресивності збудника темно-бурої (сітчастої) плямистості ячменю

Матеріал та обладнання. Чашки Петрі з чистою культурою збудників темно-бурої (сітчастої) плямистості ячменю, двох ізолятів; рослини ячменю різних сортів у фазі одного листа, які вирощують у кюветках на шарі вати, чашки Петрі, мікропіпетки.

Зміст завдання. За результатами штучного зараження листків ячменю збудником плямистості визначити вірулентні та агресивні властивості ізолятів, які досліджуються. Вірулентність визначається кількістю уражених сортів, а агресивність – ступенем ураження.

Методика і хід роботи. У чашки Петрі на тонкий шар зволоженої вати розкладають відрізки листків різних сортів ячменю. Довжина відрізків 1,5- 2 см. Відрізки листків інокулюють різними ізолятами збудника, наносячи піпеткою по 0,02-0,03 мл конідиальної суспензії гриба на кожний відрізок. Чашки Петрі закривають і поміщають в умови постійного освітлення. Реакцію на зараження для збудника темно-бурої плямистості (*Bipolaris sorokiniana*) визначають на 4 - 5 добу, для збудника сітчастої плямистості – на 6 - 7 добу (*Pyrenophora teres f. teres*). Для визначення вірулентності ізолятів гриба *P. teres* застосовують наступну шкалу:

- 1 – некрози без хлорозів – високостійкий сорт;
- 2 – некротичні коричневі плями з хлоротичною облямівкою чи без хлорозу, які не поширюються по листку – відносно стійкий сорт;
- 3 – некротичні коричневі плями з хлорозом, які поширюються по відрізку листка – сприйнятливий сорт;
- 4 – коричневий некроз займає всю поверхню відрізка – високосприйнятливий сорт.

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

Бал "0" у шкалі відсутній, тому що при лабораторному методі зараження виявити сорти, які б зовсім не уражувались хворобою, не можливо. За результатами зараження проводять аналіз вірулентності ізолятів гриба. Результати дослідів заповнюють за формою – табл. 4.2.1.

Таблиця 4.2.1. Вірулентність ізолятів збудника темно-бурої (сітчастої) плямистості ячменю

Ізоляти	Реакція сортів		
	1	2	3

Агресивність збудників плямистостей листя ячменю визначають за кількістю інфекційних плям на листку та розвитком хвороби. Отримані результати записують у формі табл. 4.2.2.

Таблиця 4.2.2. Агресивність ізолятів збудника темно-бурої (сітчастої) плямистості ячменю

Ізоляти	1-ий сорт		2-ий сорт		3-ий сорт		Середнє	
	Кількість плям, шт.	Розвиток хвороби, %	Кількість плям, шт.	Розвиток хвороби, %	Кількість плям, шт.	Розвиток хвороби, %	Кількість плям, шт.	Розвиток хвороби, %
1								
2								
3								

Обговорення результатів. На основі отриманих результатів зробити висновки про вірулентність і агресивність ізолятів збудника темно-бурої (сітчастої) плямистості ячменю. Проаналізувати зв'язок між вірулентністю та агресивністю одного і того ж ізоляту.

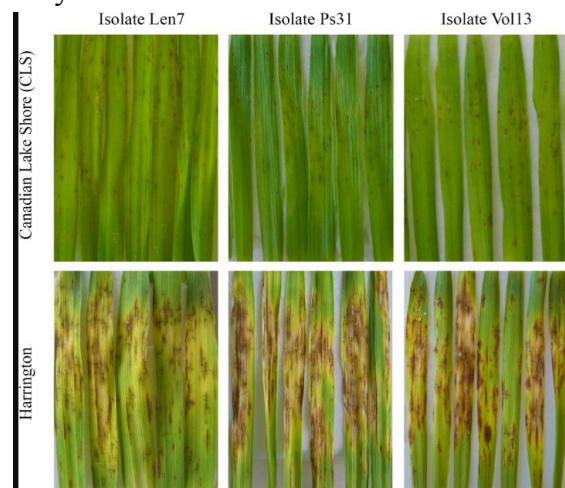


Рис. 4. 2. 1. Реакція 2 сортів ячменю на зараження 3 ізолятами *Pyrenophora teres f. teres* (Dinglasan et al., 2019)

Виділення ДНК з міцелію грибів

Мета: вивчити метод виділення ДНК грибів для подальшої ПЛР-діагностики

Матеріал та обладнання. Чиста культура грибів *Alternaria* в чашках Петрі, 2 мл мікропробірки Еппендорфа (2), хімічні реагенти, спеціальна лабораторія.

Довідковий матеріал. Суть усіх методів виділення полягає у вилученні ДНК зі зразка та видаленні або інактивації домішок, які перешкоджають проведенню ПЛР. Для того, щоб ДНК потрапила в розчин, потрібно, перш за все, знищити клітини. У деяких випадках (наприклад, за аналізу бактерій або тваринних клітин) достатньо простого кипіння лугом, у результаті чого клітинні стінки руйнуються. Однак за роботи з грибами, особливо при виділенні ДНК безпосередньо з ураженого органу рослини, цього може виявитися недостатньо, оскільки грибні гіфи і, особливо, спори, можуть мати дуже міцну оболонку. У цьому випадку зразок подрібнюють. Для ще більшої надійності та збільшення виходу ДНК (що особливо важливо, якщо ви хочете виділити ДНК збудника, який знаходиться у дуже низькій концентрації в ураженому органі), використовують рідкий азот. Зразок попередньо заморожують і розтирають в охолодженому розчині. Для ізоляції ДНК з ґрунту застосовують спеціальні пристрої, що подрібнюють біологічний матеріал ґрунту у центрифугу. Далі з суміші ДНК зі залишками оболонки, неорганічних компонентів (піску, залишків ґрунту), білків тощо потрібно отримати очищений препарат ДНК. Всі сучасні методи очищення нуклеїнових кислот можна розділити на дві групи:

- методи з поетапним видаленням домішок з водного розчину;
- методи, засновані на адсорбції нуклеїнових кислот на твердій фазі.

З варіантів першого способу найбільш відома екстракція за допомогою хлороформу. Метод застосовний майже до всіх видів грибів,

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників може використовуватися для виділення з ураженої рослинної тканини.

Однак якщо в досліджуваному зразку є багато інгібіторів ПЛР, то ДНК необхідно додатково очистити на колонці, тобто застосувати метод другої групи – сорбувати ДНК на твердій фазі. Зазвичай очищення проводиться в одноразових пластикових мікроколонках з упакованим у них сорбентом (часто використовують кремнезем або полівініліпіролідон (PVPP)). Промивання розчинами з високою іонною силою видаляє білки та низькомолекулярні сполуки, в результаті чого чиста ДНК залишається на сорбенті. ДНК легко змивається сорбентом розчинами з низькою іонною силою, наприклад, дистильованою водою.

Хід роботи. 1. Пророщування міцелію для виділення ДНК проводять у чашках Петрі на рідкому гороховому середовищі. Після досягнення необхідної біомаси міцелій видаляють з посуду, промивають стерильною дистильованою водою, сушать і, якщо необхідно, зберігають у мікропробірках при температурі – 20 °С за кілька днів до початку відбору.

Для грибів роду *Alternaria* міцелій попередньо можна вирощувати в чашках Петрі на картопляно-морквяному агарі (КМА) з подальшим вискоблюванням.

2. Невеликий фрагмент міцелію розтерти з рідким азотом в стерильній керамічній ступці.

3. У пробірку з 0,25 мл розтертого міцелію додати 700 мкл лізуючого СТАВ - буфера і інкубувати за 65 °С впродовж години.

4. До отриманої суміші додати 500 мкл хлороформу і центрифугувати 10 хв. за 13 000 об. / хв.

5. Відібрати 500 мкл надосадової рідини, додати до неї ще 500 мкл хлороформу і повторити центрифугування.

6. До отриманого супернатанту додати 400 мкл ізопропанола і 60 мкл 5М ацетату калію, центрифугувати 10 хв. за 13 000 об / хв.

7. Осад ДНК двічі промити охолодженим 70%-ним етанолом і

Розділ 4

ресуспендувати у 100 мкл деіонізованої води.
ДНК зберігати за температури -20°C .

Склад лізуючого СТАВ буфера: 0,2 М Tris pH 8; 2 М NaCl; 0,05 М EDTA; 2% СТАВ.

Концентрацію ДНК в отриманому препараті візуально визначають за інтенсивністю люмінесценції зразка об'ємом 10 мкл в ультрафіолетовому світлі в 1% -ному агарозному гелі з додаванням 2 мкл броміду етидію. Електрофорез проводять при напрузі 100–120 впродовж протягом 40 хв.

Питання до самоконтролю:

1. Визначити біотрофа серед мікроорганізмів.

- a) *Botrytis cinerea*
- б) *Puccinia graminis*
- в) *Drechslera teres*
- г) *Fusarium solani*

2. Який мікроорганізм є некротрофом?

- a) *Puccinia graminis*
- б) *Fusarium solani*
- в) ВЖКЯ
- г) *Plasmopara viticola*

3. Знайти фізіологічну форму збудника стеблової іржі пшениці.

- a) *P. graminis f. sp. tritici*
- б) *Puccinia graminis*
- в) *P. graminis f. sp. tritici 32*
- г) *P. graminis f. sp. secalis*

4. Здатність патогена уражувати певні сорти (генотипи) рослини.

- a) патогенність
- б) вірулентність
- в) агресивність

5. Яку ознаку ізолятів патогенів визначають на сортах-диференціаторах?

- a) патогенність
- б) вірулентність
- в) агресивність

6. Факультативний паразит.

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

- a) *Monilia fructigena*
- б) *Puccinia graminis*
- в) ВЖКЯ
- г) *Plasmopara viticola*

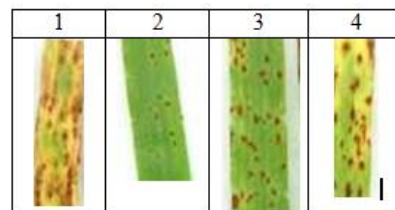
7. Факультативний сапрофіт.

- a) *Phytophthora infestans*
- б) *Puccinia graminis*
- в) *Monilia fructigena*
- г) *Fusarium solani*

8. Облігатний сапрофіт.

- a) ВЖКЯ
- б) *Boletus edulis*
- в) *Botrytis cinerea*
- г) *Drechslera teres*

9. Знайти найагресивнішу расу гриба *Drechslera teres*.



- a) 1
- б) 2
- в) 3
- г) 4

10. Знайти фізіологічну расу збудника стеблової іржі пшениці.

- a) *P. graminis f. sp. tritici*
- б) *Puccinia graminis*
- в) *P. graminis f. sp. tritici 32*
- г) *P. graminis f. sp. secalis*

Тема 4.3. Генетика патогенезу за зараження рослин мікроорганізмами



4.3.1. Зараження рослин патогенами. Зараження рослин патогенами здійснюється

Розділ 4

через рани, через природні отвори, через непошкоджену поверхню рослини. Через рани до рослин потрапляють частіше бактерії, але можуть і гриби. Бактеріальну клітину до рани приваблюють певні метаболіти. У *Agrobacterium tumefaciens* експресія *vir* –генів (вірулентних) відбувається за дії ацетосирингона та інших фенолів, синтез яких індукується у рослин за механічного пошкодження. Проникнення через продиhi також пов'язано з хімічним привабленням спор грибів та клітин бактерій. Наприклад, спора іржастого гриба спочатку проростає ростковою трубкою, яка над продихом утворює апресорій. Апресорій проростає гіфою вертикально донизу у підпродиховий простір, де утворюється підпродихове вздуття. Від нього відростають інфекційні гіфи, які і проникають до клітин. Цей морфогенез регулюють *INF* (infection) *PIG* (in planta induced genes) гени. Так, продукт гена *INF24* пов'язаний з формуванням апресорія. Експресія гена відбувається через 3–4 години після проростання спори і триває 10 годин. Експресія інших *INF*-генів проходить пізніше.

Проникнення через непошкоджену поверхню тканини рослини відбувається механічним чи хімічним шляхом або при їх поєднанні. Для механічного проникнення необхідне утворення апресорія, в зовнішній оболонці якого відкладається меланін. Перші білки, які синтезуються при утворенні апресорія – кальмодулін та *MPG1*-білок. Білки *car 20* та *car 22* – глікопротеїни, пов'язані з клітинною стінкою апресоріїв. Один з них потрібний для формування гаусторія, інший – для його функціонування. Також в апресоріях відбувається експресія генів біосинтезу меланіна.

За активного проникнення необхідно подолати природну перешкоду у вигляді кутикули. Вона складається з кутину (нерозчинного полімеру) та воску (гідрофобного комплексу). Кутикула руйнується кутиназою. Кутиназа – **індуцибельний фермент** (синтезується клітиною при появі в середовищі речовини,

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників перетворення якої він каталізує), який експресується за наявності гідролізата кутина та репресується глюкозою. Так, у *Fusarium solani* невелика концентрація кутинази утворюється конститутивно (внаслідок наявності неіндуцибельного гена зі слабким промотором). За контакту з кутином цей фермент викликає руйнування декількох молекул кутина і появу мономерів, які індукують експресію кутиназного гена, який має потужний промотор і продукує активну кутиназу.

4.3.2. Проникнення патогенів у рослинні клітини. Проникнення до клітини можливо лише за подолання перешкоди у вигляді клітинної стінки, яка складається з целюлози, пектинів, геміцелюлози, структурних білків, а також серединних пластинок, які складаються в основному з пектинів. Повне руйнування рослинної тканини включає руйнування лігніну. Деградація всіх цих речовин здійснюється спеціальними видами ферментів, які утворюють мікроорганізми (гриби і бактерії): пектиназами, целулазами, геміцелулозами, лігніназами. Іноді в клітинних оболонках наявні білки, тому деякі гриби здатні синтезувати протеолітичні ферменти і фосфатази. Протеази впливають на клітинні мембрани, що складаються з фосфоліпідів і білків.

Так, пектолітичні ферменти паразитів з'являються у зараженій рослині першими. Більшість фітопатогенних грибів та бактерій синтезують декілька пектолітичних ферментів, кожен з яких може кодуватися родиною генів і існувати в декількох ізоформах, які відрізняються оптимумом рН, температури та тощо.

4.3.3. Стабілізація інфекції та поширення патогенів у рослині. Для поширення у рослині, переходу з зараженої клітини до незараженої, патогену необхідно: інгібувати захисні

Розділ 4

механізми не окремої клітини, а тканини; змінити метаболізм рослини в необхідний для паразита бік; забезпечити близький та далекий транспорт у рослині.

Інгібування захисного потенціалу рослини. Роль речовин, які здатні мігрувати від місця інфекції по рослині, сприяючи подальшому зараженню патогеном виконують **фітотоксини**, які поділяють на вівотоксини (неспецифічні, неселективні токсини) та специфічні токсини. **Вівотоксини** здатні діяти на широке коло рослин, спричиняючи аналогічні симптоми, незважаючи на те, що патогени, які їх продукують, можуть бути високоспеціалізованими до певних видів рослин. Крім того, не завжди спостерігається зв'язок між продукуванням вівотоксину і патогенністю. Так, окремі ізоляти збудника фузаріозного в'янення бавовнику *Fusarium oxysporum* f. *rasinfectum* Snuder et Hanses здатні продукувати токсин при вирощуванні на штучних живильних середовищах, але не здатні паразитувати на живих рослинах. Табтоксин – токсин *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* інактивує глютамінсинтетазу, викликає нагромадження токсичних концентрацій амонію, порушення фотосинтезу, дихання, структури мембран. Фазеолотоксин – токсин *Ps. syringae* pv. *phaseolicola* порушує обмін аргініну, пиримидина, синтез і проникність мембран. Тентоксин – токсин *Alternaria alternata* інгібує енергетичний транспорт у хлоропластах, фосфорилування АДФ в АТФ, активність поліфенолоксидази.

Специфічні (селективні) токсини – патотоксини фітопатогенних грибів синтезуються патогеном, господарем, або є продуктами їх взаємодії. Вони, певне, і є безпосередньо причиною хвороб, бо індукують усі їх симптоми лише на рослинах, що входять до кола спеціалізації патогенів. Наочним прикладом, який підтверджує високий рівень специфічності патотоксинів, є токсин дуже специфічної раси Т *H. maydis*, здатної уражувати тільки рослини кукурудзи з цитоплазмою техаського типу. Ця раса

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників продукує специфічний патотоксин, що пригнічує ріст коренів рослин з техаською цитоплазмою. Він негативно впливає на сприйнятливі рослини-живителі, підвищуючи інтенсивність дихання і порушуючи фізіологічні процеси у рослин. Раса 0 *H. maydis* також утворює токсин, але він не специфічний щодо будь-якого конкретного типу цитоплазми, і утворюється в дуже низьких концентраціях.

На відміну від фітотоксинів некроторофних патогенів, які руйнують рослинну тканину, **супресори** лише запобігають активації механізмів стійкості, і патогени можуть проникати до рослини та існувати у ній. Супресори знайдені у спорах, які проростають, у культуральній рідині у тканинах інфікованих рослин. Супресори відомі на сьогодні є невеликими за молекулярною вагою молекулами: глюкани, пептиди, глікопротеїни. У випадку пригнічення активності генів, які кодують супресори, сильно знижується агресивність гриба. Супресори в рослинах виконують різні функції:

- порушують процес впізнавання партнерів і передачу сигналу для запуску імунних механізмів;
- пригнічують експресію генів ключових ферментів імунних реакцій;
- інгібують накопичення фітоалексинів;
- пригнічують лігніфікацію;
- інгібують процес репарації ран.

Зміни метаболізму заражених клітин і тканин. Синтез важливих метаболітів рослин, напрямок їх потоків, тому і морфогенетичні процеси регулюють фітогормони. **Ауксини** (Індоліл-3-оцтова кислота ($C_{10}H_9NO_2$)) являють собою природні фітогормони, що впливають на ріст, розподіл і диференціацію клітин. Підвищення рівня ауксинів виявлено у тканинах багатьох рослин, інфікованих грибами, бактеріями, вірусами і нематодами. Так, гриби, що викликають пухирчасту сажку кукурудзи (*Ustilago maydis*), килу капусти (*Plasmodiophora brassicae*), вілт бананів (*Fusarium oxysporum* f. *cubense*) і інші

Розділ 4

захворювання, не тільки індукують підвищення рівня ІОК хазяїв, але і самі здатні їх утворювати. За розвитку деяких хвороб підвищення рівня ІОК відбувається в результаті інгібування ферменту 3-іок-оксидази, що деградує гормон у тканинах, що було показано на прикладі пухирчастої сажки кукурудзи й стеблової іржі пшениці. Утворення і роль ауксину у формуванні симптомів були вивчені більш інтенсивно для деяких бактеріальних хвороб рослин. Збудник кореневого раку рослин – бактерія *Agrobacterium tumefaciens* патогенна більш ніж для 100 видів рослин. Гали (або пухлини) розвиваються на коренях, стеблах і черешках листків рослин. За вивчення патогенезу кореневого раку було виявлено, що плазмід бактерії мігрує до клітини хазяїна й переносить ділянку молекули нуклеїнової кислоти Т-ДНК з генами, що кодують ІОК (*tms-1*, *tms-2*) і цитокінін (*ipt*), у хромосоми клітини рослини. Підвищена кількість ІОК і цитокінінів призводить до розподілу та збільшення клітин, розростанню тканин рослини й формуванню пухлин.

Гібереліни є природними фітогормонами, але також можуть синтезуватися і деякими мікроорганізмами. Гібереліни, які викликають стовбуріння проростків рису, були вперше виділені з гриба *Gibberella fujikuroi*. Проростки уражених рослин росли швидше, ставали значно тоншими, ніж у здорових.

Цитокініни необхідні для росту клітин та їх диференціації, вони інгібують розпад білків і нуклеїнових кислот, у такий спосіб затримуючи процеси старіння. Вони мають властивість направляти потік амінокислот та інших живильних речовин у місця з високою концентрацією цитокінінів. Цитокініни беруть участь у розвитку кили капустияних, кореневого раку плодкових, пухирчастої сажки кукурудзи, іржастих хвороб злаків і квасолі. За розвитку борошнисторосяних та іржастих грибів на підвищену концентрацію цитокінінів вказують «зелені ділянки» – зони активного фотосинтезу й обміну речовин навколо міцелію. У деяких

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників випадках цитокініни порушують апікальний ріст рослин. Локальні виділення цитокінінів грибами *Exobasidium* та *Taphrina*, бактерією *Corynebacterium fasciens* викликає ізростання уражених органів.

4.3.4. Транспорт по рослині. Гриби і бактерії частіше поширюються у рослинах локально на невеликі відстані від місця інфекції по міжклітинниках. Ксилемні інфекції грибів та бактерій (трахеомікози та трахеобактеріози) поширюються всією рослиною з ксилемним током. Фітовіруси мають свої особливості поширення. Після репродукції у первинно зараженій клітині відбувається зараження всієї рослини шляхом переміщення вірусів з клітини у клітину (близький транспорт) та по флоемі (далекий транспорт). Близький транспорт відбувається через **плазмодесми** – мембранні тяжі між клітинами з мікроканалами усередині. Дослідження довели, що через плазмодесми можуть проходити дуже дрібні молекули розміром біля 1 kD. Але вірусна нуклеїнова кислота кодує спеціальний транспортний білок, який сприяє переходу через плазмодесми. Перший такий білок було відкрито у ВТМ. Він має молекулярну масу 30 kD і кодується геном, розташованим ближче до 3' кінця вірусної РНК. Цей білок зв'язується з вірусною РНК і відкриває плазмодесми, дозволяючи проходити через них великим молекулам. Тобто декілька молекул транспортного білка зв'язуються з РНК і цей комплекс рухається по елементах цитоскелету: у цитоплазмі по мікротрубочкам, біля плазмодесм – по філаментам актину, які пронизують плазмодесми. Швидкість руху вірусу гравірування тютюну, наприклад, складає 1 клітина за 2 години. Далекий транспорт здійснюється флоемним током. Так, після зараження ВТМ одного листка томата спочатку інфікується весь заражений листок, потім стебло нижче листка та корні, потім – верхівка і після цього – вся рослина.

Практичний блок
Визначення амілолітичної активності
грибів з родів *Fusarium* та *Alternaria*

Мета: Дослідити якісний метод визначення амілолітичної активності грибів

Матеріал та обладнання. Культури грибів з родів *Fusarium* та *Alternaria*, агарове середовище з розчинним крохмалем

Довідковий матеріал. Збудники здатні синтезувати різноманітні ферменти, які можуть бути пов'язані з проникненням до покривних тканин та розмноженням усередині рослин, а також руйнуванням тканин господаря продуктами, які можуть використовуватися паразитом.

Зміст завдання (за Курченко, 2012). Культури досліджуваних грибів попередньо вирощують на картопляно-глюкозному агарі у чашках Петрі. Для посіву у чашки на агарове середовище з розчинним крохмалем (2 г/л) використовується інокулюм ($\varnothing 3 \times 3$ мм) від краю колонії. Інокульовані чашки закривають липкою плівкою для збереження вологості живильного середовища з крохмалем та інкубують при $26 \pm 2^\circ \text{C}$ впродовж 3-10 днів. Ферментативна активність визначається якісним методом (Molitoris, 1986). Про амілолітичну активність судять за розмірами зони, яка визначається як різниця між середнім радіусом зони просвітлення середовища та середнім радіусом грибної колонії. Розміри зони просвітлення середовища та , відповідно, активність амілази умовно поділяють на три групи: низька – зона ≤ 2 мм; середня – 2,1 – 6,9 мм; висока – ≥ 7 мм.

Швидкість лінійного росту грибів визначають на агаризованому живильному середовищі з розчинним крохмалем. Двічі на день діаметр колонії грибів вимірюють у трьох напрямках. На основі отриманих даних визначається радіальна швидкість росту (K_r) за формулою [4.3.1]:

$$K_r = \frac{R_t - R_0}{t - t_0},$$

[4.3.1]

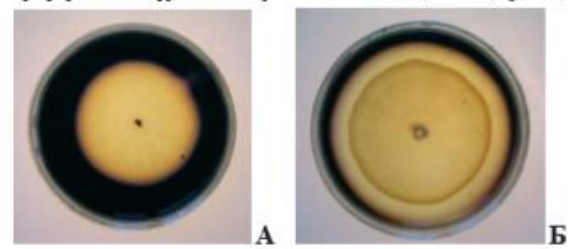


Рис. 4.3.1. Амільна активність досліджуваного виду: А) низька; Б) висока (Курченко, 2012)

Питання до самоконтролю:

1. Мембранні тяжі між клітинами з мікроканалами усередині.

- а) прориси
- б) плазмодесми
- в) філаменти
- г) мікротрубочки

2. За розвитку борошнисторосяних та іржастих грибів утворюються «зелені ділянки» – зони активного фотосинтезу й обміну речовин навколо міцелію, що вказує на підвищену концентрацію

- а) ауксинів
- б) гіберелінів
- в) цитокінінів
- г) етилену

3. Які речовини лише запобігають активації механізмів стійкості, і патогени можуть проникати до рослини та існувати у ній?

- а) супресори
- б) вівотоксини
- в) фітотоксини
- г) ферменти

4. У *Agrobacterium tumefaciens* експресія *vir*-генів відбувається за дії

- а) ацетосірінгона
- б) тентотоксина
- в) ауксинів
- г) кутинази

трансдукція

**4.4.1. Еліситори захисних реакцій.**

Еліситори – речовини, які індукують захисні реакції у рослин. Раніше їх називали індукторами стійкості. Еліситори з'являються в патосистемах з перших етапів взаємодії між патогеном і рослиною у результаті взаємного ферментативного впливу. Вже на ранніх стадіях розвитку патогенів рослина одержує численні й різноманітні сигнали про присутність чужорідного організму і його спробі порушити цілісність клітин. У результаті впізнавання сигналів активуються сигнальні системи, які індукують розвиток набору активних механізмів стійкості рослини.

Існує декілька груп еліситорів: біогенні та абіогенні. Перший біогенний еліситор було відкрито у 1968 році Cruickshank та Perrin. Біогенні можуть бути екзогенними та ендогенними. *Ендогенні* утворюються в уражених рослинах. Проникаючи до рослини, патогени ферментами руйнують віск та кутин, утворюються жирні кислоти. Останні окислюються ліпоксигеназами рослини і є ендогенними еліситорами. Після проникнення через кутикулу патоген за допомогою пектолітичних ферментів руйнує пектини – з'являються олігогалактуроніди.

Деякі вчені виділяють ще й вторинні ендогенні еліситори, які утворюються у клітинах рослин за дії біогенних та абіогенних стресів: фітогормони, абсцизову, жасмонову, саліцилову кислоти, а також поліпептид системін і деякі інші сполуки. Так, доведено важливу роль жасмонової кислоти у стійкості рослин до комах і патогенних мікроорганізмів. Екзогенний жасмонат призводить до синтезу цілого набору специфічних білків, до яких, наприклад, належать тіоніни. Вони локалізовані у клітинних стінках рослин,

Розділ 4

5. Приклади вівотоксинів.

- а) табтотоксин
- б) тентотоксин;
- в) вікторин
- г) деструксин

6. Продукт якого гена пов'язаний з формуванням апресорію.

- а) *INF24*
- б) *tms-1*
- в) *ipt*
- г) *tms-2*

7. З якого гриба були вперше виділені гібереліни?

- а) *Ustilago maydis*
- б) *Plasmodiophora brassicae*
- в) *Fusarium oxysporum*
- г) *Gibberella fujikuroi*

8. Ферменти патогенів, які руйнують білки рослин.

- а) пектинази;
- б) целюлози
- в) протеази
- г) геміцелюлози

9. Швидкість руху вірусу гравірування тютюну.

- а) 1 клітина за 2 години
- б) 10 клітин за 1 годину
- в) 100 клітин за 1 годину
- г) 1000 клітин за 1 годину

10. За інфікування яким мікроорганізмом підвищується кількість ауксинів?

- а) *Ustilago maydis*
- б) *Plasmodara viticola*
- в) *Tilletia caries*
- г) *Bipolaris sorokiniana*

Розділ 4

токсичні для грибів і бактерій й, імовірно, беруть участь у захисних реакціях рослин проти фітопатогенів. Висловлено припущення, що жасмонат є інтегральною частиною системи передачі сигналу, який регулює у рослинах індукцію захисних генів. Роль саліцилової кислоти у стійкості рослин є складною і суперечливою, вона залежить від багатьох факторів (її концентрації, інтервалу між обробкою і інфікуванням та ін.), а іноді переходить у свою протилежність – у підвищення сприйнятливості до хвороби. Ця кислота регулює відкладення полісахаридів калози в отворах плазмодесми, таким чином перешкоджає ближньому транспорту вірусів через плазмодесми, тобто відкладення калози разом з реакцією надчутливості відмежує заражений симпласт від здорового.

Екзогенні еліситори виділені з патогенів або середовищ їх культивування. Основу клітинних стінок більшості грибів складають хітин, хітозан і глюкани. Поверхневі клітини рослин у незначних кількостях містять ферменти (хітинази, хітозанази, глюканази), які викликають часткове руйнування клітинної стінки у перші години контакту. Через деякий час утворюються олігомери хітина, хітозана та інших полімерів патогенів, які є сигналами для посиленої активації синтезу цих же ферментів. Окрім полісахаридних похідних гриби утворюють еліситори, які належать до інших хімічних груп: ліпідомістячі молекули (арахідонова, йкозатетраєнова, ейкозапентаєна жирні кислоти) та стерини (ергостерол).

До числа *абіогенних еліситорів* відносять речовини, які не беруть участь у процесах патогенезу, але викликають захисні відповіді рослин. Це, наприклад, іони важких металів, інгібітори окремих ланцюгів метаболізму, фенольні сполуки та деякі антибіотики, хінони, ряд фунгіцидів, УФ радіацію. На сьогодні абіогенними еліситорами заявлені такі діючі речовини пестицидів: беномил, стробілурина (азоксистробін, крезоким-метил, трифлуксистробін, піраклостробін, пікоксистробін,

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників флуоксастробін), тебуконазол та ін. Так, іони важких металів викликають у рослин картоплі накопичення фітоалексинів, але їх утворюється не дуже багато. Одна з можливих причин абіотичної індукції захисних реакцій є в тому, що абіотичні еліситори активізують ендогенні гідролази рослинних тканин – нуклеази, пептидази, глюканази й інші ферменти, які відповідають за деградацію біополімерів. Останні здійснюють функції зберігання, передачі та реалізації інформації. Руйнування біополімерів індукуює захисні ефекти рослинної тканини. Порівняно з біогенними абіогенні речовини індукують захисні реакції рослин у високих концентраціях. Іноколи вони викликають у рослин ряд побічних ефектів, які не відносяться до процесів патогенезу.

4.4.2. Сигнальна трансдукція. Клітини багатоклітинного організму здатні підтримувати свій гомеостаз завдяки властивості вибірково впізнавати позаклітинні речовини. Це можуть бути еліситори і гормони, медіатори клітинного метаболізму, білки, пептиди, а також низькомолекулярні метаболіти. Процес упізнання здійснюється за допомогою сигнальних систем, які визначають реакцію клітин на різні хімічні і фізичні дії. Патогенні мікроорганізми й їх еліситори індукують у рослинній клітині каскад захисних реакцій задовго до того, як стійкість або сприйнятливість проявляється фенотипично. Завдання сигнальних систем полягає в впізнаванні, передачі і посиленні сигналу, який виходить від патогена або його еліситора. Дія сигнальної системи починається з контакту патогена або його еліситора з рецептором рослини і завершується захисною відповіддю рослинної клітини. Більшість еліситорів зв'язується з зовнішніми ділянками рецепторів, які локалізовані на плазмалемі. Це викликає автофосфорилування рецепторів і зміну їх конформації. Рецептори – продукти генів стійкості, вони мають загальний план будови: ділянка, розташована поза клітиною,

Розділ 4

внутрішньомембранну зону і частину, занурену у цитоплазму. Зовнішні і внутрішні ділянки варіабельні, серединна частина – константна. Зовнішній кінець рецептора специфічний по відношенню до елісатора, тоді як внутрішній С-кінець – до асоційованого з рецептором ферменту. Останній і визначає, з якою з сигнальних систем буде здійснюватися взаємодія. На шляху поширення сигналів функціонують десятки різних протеїнкіназ і фосфопротеїнфосфатаз, які регулюють фосфорилювання білків й їх активність. Особливу роль у сигнальних системах відіграє вплив на ядерні фактори регуляції транскрипції. Регулятори транскрипції взаємодіють з промоторними ділянками генів, викликаючи або пригнічуючи їх експресію. До числа основних сигнальних систем, відомих на даний час, відносяться:

- НАДФН-оксидазна (супероксидсинтазна);
- NO-синтазна;
- MAP-кіназна (mitogen-activated protein kinase), яка регулює поділ клітин;
- ліпоксигеназна;
- циклоаденилатна;
- Ca^{2+} -фосфоінозитольна;
- фосфатидилкіслотна.

Ці сигнальні системи виявлені як в клітинах тварин, так і рослин. Особливістю сигнальних систем є не тільки передача сигналу на генетичний апарат клітини, але і його значне посилення. На прикладі циклоаденилатної системи встановлено, що взаємодія однієї сигнальної молекули з рецептором може призводити до синтезу мільйона молекул, що визначають реакцію клітин. Сигнальна трансдукція призводить до координованої транскрипції великого числа генів, необхідних для реалізації різних механізмів імунітету рослин. Вивчення механізмів сигнальної трансдукції має величезне теоретичне і практичне значення, так як доведено, що за допомогою впливу на ключові точки сигнального каскаду можна моделювати стійкість рослин на необхідному рівні. Окремі

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників сигнальні системи можуть функціонувати як незалежно, так і разом. Чим триваліше взаємодія рослини і патогена, тим більше розширюється набір функціонуючих сигнальних систем.

Практичний блок

Визначення ефективності застосування Імуноцитофіту

Мета: вивчити дію екзогенного елісатора

Довідковий матеріал. Діючою речовиною Імуноцитофіту, ТАБ є арахідонова кислота ($\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$) або її етиловий ефір ($\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}$). Арахідонова кислота (АК) має широкий спектр впливу на експресію захисних генів, а також генів, які несуть інформацію про фактори росту, фітогормони, фактори розвитку та фактори обміну основних відомих клітинних медіаторних систем та ключових ферментів.

Хід роботи. Взяти 2 зразки по 5 г насіння пшениці. Перший зразок замочити у розчині імуноцитофіту, другий – у стерильній воді. Експозиція 2 години. Розчин імуноцитофіту: розчинити 1 таблетку в 10-15 мл води. Щоб визначити ефективність препарату, проростити насіння на фільтрувальному папері протягом 7–14 днів. Виміряти довжину проростків та їх коріння. Зробити висновки щодо ефективності препарату.

Питання до самоконтролю:

1. Коли елісатори з'являються у рослині?
 - а) після проростання спори
 - б) з перших етапів взаємодії між патогеном та рослиною
 - в) після утворення апресорію
 - г) після утворення спорозошення патогена
2. Які елісатори утворюються в уражених рослинах?

Розділ 4

- а) ендогенні
- б) екзогенні
- в) біогенні
- г) абіогенні

3. Коли було відкрито перший біогенний еліситор?

- а) 1932
- б) 1985
- в) 1968
- г) 1990

4. Знайти ендогенні елісители.

- а) жасмонат
- б) фенольні сполуки
- в) хінони
- г) олігогалактуроніди

5. До синтезу яких специфічних білків у рослині призводить жасмонат?

- а) протеїнкаіназ
- б) тіонінів
- в) лектинів

6. Вторинний ендогенний еліситор.

- а) олігогалактуроніди
- б) саліцилова кислота
- в) беномил
- г) антибіотики

7. Екзогенний еліситор.

- а) саліцилова кислота
- б) олігогалактуроніди
- в) жасмонат
- г) олігомери хітозана

8. Яка сигнальна система регулює поділ клітин?

- а) НАДФН-оксидазна
- б) ліпоксигеназна
- в) МАР-кіназна
- г) NO-синтазна

9. На основі якого елісатора створений препарат Імуноцитодіт?

- а) саліцилова кислота

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

- б) арахідонова кислота
- в) жасмонат
- г) іони важких металів

10. Накопичення яких речовин викликають у рослин картоплі іони важких металів?

- а) саліцилова кислота
- б) фітогормони
- в) фітонциди
- г) фітоалексини

Тема 4.5. Механізми стійкості рослин



4.5.1. Фактори пасивного імунітету рослин.

До пасивних механізмів відносять анатомо-морфологічні особливості рослин, обмін речовин, фітонциди, лектини, інгібітори ферментів, наявність фізіологічно-активних речовин.

Анатомо - морфологічні особливості рослин М.І. Вавилов назвав структурними. Цю категорію явищ він поділив за факторами, що зумовлюють стійкість:

- особливості будови епідермісу, кутикули, кори, волосків, що вкривають стебла і листя; особливості прорихів, сочевичок;
- особливості цвітіння; відкрите чи закриті цвітіння має вирішальне значення, наприклад, при ураженні ріжками і сажкою у злаків; клейстогамія запобігає ураженню квіток рослини;
- закриті і відкрите насіння;
- особливості росту тканин; наприклад, швидкість росту тканин має значення для ураження злаків сажкою і фузаріозами;
- виділення поверхневими клітинами слизу, камеді, воскового нальоту, ефірних олій, що запобігають проникненню патогенів;
- загальний габітус рослин, що визначає схильність до хвороб, як, наприклад, прямостоячий або зімкнутий кущ, плоске або скручене листя, опушення листя і стебел або

Розділ 4

відсутність такого опушення.

Фітонциди. *Фітонцидами* було названо, за визначенням Б.П. Токіна, «*продуковані рослинами бактерицидні, фунгіцидні, протистоцидні речовини, які є одним з факторів їх імунітету і відіграють роль у взаємовідносинах організмів у біоценозах*». Фітонцидною активністю рослин було пояснено багато давно відомих фактів взаємного впливу рослин – пригнічення життєдіяльності одних та стимулювання інших.

Фітонциди властиві не окремим групам рослин, а всьому рослинному світу – від бактерій до квіткових рослин. За хімічним складом фітонциди у більшості є комплексом сполук: глюкозидів, альдегідів, дубильних речовин тощо. На їх роль у стійкості рослин проти хвороб першими вказали О.І. Опарин та О.В. Купленська (1935). Надалі широкі дослідження з вивчення ролі фітонцидів у стійкості рослин проти інфекційних захворювань були здійснені науковою школою Д.Д. Вередеревського. Було, зокрема, встановлено, що клітинний сік стійких рослин містить речовини, які пригнічують розвиток патогенів, при цьому їх наявність не залежить від того, перебувають рослини в контакті з патогеном, чи ні. Крім того, їх дія на збудників хвороб неспецифічна, тобто, поширюється на мікроорганізми, не спеціалізовані на даному виді рослин. Так, наприклад, фітонциди цибулі та часнику пригнічують розвиток збудника фітофторозу на бульбах картоплі, однак не мають фунгіцидної дії відносно гриба *Botrytis allii*.

Обмін речовин рослини. Взаємовідносини між патогенами і їх рослинами-живителями істотно залежать від типу живлення мікроорганізмів, тобто належності до групи некротрофних чи біотрофних організмів. Для некротрофів якісний склад поживних речовин не має істотного значення. Це пов'язано з тим, що некротрофні організми мають широкий спектр ферментів, завдяки яким вони можуть використовувати для живлення найрізноманітніші речовини, які входять до

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників складу клітин живителя. Хвороби, викликані факультативними паразитами, супроводжуються значним підвищенням рівня гідролітичних процесів в тканинах, що викликано як дією ферментів патогенів, так і дією гідролаз клітин рослини, мембрани яких руйнуються токсинами грибів і рослин. Для некротрофів більш легка здобич – це ослаблені і пригнічені рослини, тому всі чинники, що знижують і порушують обмін речовин рослин (нестача елементів живлення, освітлення, температурний фактор, порушення умов зберігання й тощо), сприяють розвитку слабоспеціалізованих патогенів.

Живлення високоспеціалізованих біотрофів залежить від обміну речовин рослини. Найкращі умови живлення облігатні паразити отримують на добре розвинених рослинах, які перебувають в оптимальних умовах. Особливості обміну речовин рослини на певній фазі онтогенезу впливають на розвиток спеціалізованих патогенів. Ці закономірності узагальнив М.С. Дунін у теорії імуногенезу, в якій сформулював приуроченість хвороб до фаз розвитку рослин.

Лектини. Певна роль у процесах впізнавання патогенів відводиться лектинам (legere - вибирати). Лектини – комплексні білкові сполуки, які вибірково пов'язують вуглеводи, не викликаючи при цьому їх перетворення. Ці речовини виявлені більш ніж у 1000 видів рослин і складають гетерогенну за структурою групу речовин, переважно глікопротеїнів. Лектини виявляють спорідненість до певних вуглеводних угруповань, а за рахунок декількох ділянок зв'язування здатні склеювати між собою живі клітини. Особливу роль в імунітеті рослин відводять лектинам у зв'язку з їх здатністю іммобілізувати клітини патогена (immobilis – нерухомий). Показані іммобілізація і лізис бактерій, спор грибів, які проростають, лектинами різних видів рослин. Дуже високий рівень лектинів спостерігається в насінні рослин, можливо, це служить способом захисту насіння від проникнення патогенів.

Розділ 4

Інгібітори ферментів і PR-білки. Деякі конституційні білки рослин є інгібіторами дії протеїназ й інших гідролітичних ферментів, а також збільшують проникність плазматичних мембран шкідливих організмів. Інгібітори протеїназ захищають рослини, безпосередньо втручаючись в процес деградації поверхневих структур грибами, а також порушують діяльність травних ферментів комах. Крім того, поверхневі клітини рослин містять захисні PR-білки в невеликій кількості. Вони здатні викликати часткове руйнування клітинної стінки патогенів, приймаючи таким чином участь в реакціях впізнавання і механізмах стійкості до збудників хвороб.

4.5.2. Фактори активного імунітету. До активних механізмів стійкості рослин відносять окислювальний вибух, синтез захисних білків, синтез фітоалексинів, укріплення структурних бар'єрів та реакцію надчутливості.

Окислювальний вибух і активація сигнальних систем. Окислювальний вибух – це найшвидша клітинна відповідь, яка виникає після впізнавання патогена. Він виражається в накопиченні активних окиснювачів і прояві піку окислювальних реакцій у місці спроби вторгнення патогена. Окислювальний вибух починається у результаті взаємодії елісатора з високочутливим рецептором на плазматичній мембрані. Перший ефект – деполаризація плазматичної мембрани. В експериментах з *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* встановлено, що вже через 5 – 10 хв. після введення бактерій або після обробки елісатором тканини листа квасолі проявлялась перша відповідь клітин рослини у вигляді зміни електричного потенціалу (поляризації) плазмалемми. Поляризація цитоплазматичної мембрани активує пов'язаний з клітинною мембраною фермент НАДФН-оксидазу, яка починає синтез високоактивних окиснювачів: супероксидних іонів O_2^- , гідроксильних радикалів OH^\cdot , а також пероксид водню H_2O_2 , що утворюється з супероксида за допомогою

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників ферменту супероксидмутази. Ці речовини носять назву активних форм кисню – АФК (active oxygen species – AOS або ROS – reactive oxygen species). Їх дія призводить до стрибкоподібного посилення окислювальних реакцій – окислювального вибуху.

За взаємодії з мікроорганізмами спостерігається два піки окислювального вибуху. Перший пік індукується неспецифічно у всіх комбінаціях через декілька хвилин після контакту з елісатором, другий спалах окисної активності проявляється тільки у комбінаціях з патогенами, що несуть гени авірулентності і викликають реакцію надчутливості.

Електрохімічні зміни є для клітини сигналами про контакт з патогеном і призводять до активації генів стійкості. В результаті починається синтез PR-білків (хітинази, глюканаза та ін.), а також ключового ферменту фенілпропаноїдного метаболізму феніланінаміак-ліази.

Окислювальний вибух не єдиний сигнальний елемент у захисті рослин. Виявлено, що окрім АФК у несумісних комбінаціях у клітинах рослин з'являється оксид азоту NO. У стійких комбінаціях концентрація NO зростає у десятки разів. Оксид азоту бере участь у реакціях утворення активних видів окиснювачів і діє синергетично з АФК. Відомо, що NO взаємодіє з O_2 , утворюючи радикал $ONOO^\cdot$ – надзвичайно токсична сполука, яка пригнічує мікроорганізми. Ці радикали викликають клітинні руйнування і некроз клітини, а також приводять до дії NO-синтазну сигнальну систему, яка активує гени стійкості.

Високі концентрації активних окиснювачів токсичні для рослини. Тому їх утворення супроводжується синтезом антиоксидантних ферментів (наприклад, глутатіон-5-трансферази), які захищають клітини листка від АФК й оксиду азоту, які викликають некроз.

Електрохімічні зміни в клітинах і накопичення активних окиснювачів виконують найважливіші функції в імунітеті рослин:

Розділ 4

організацію імунної відповіді через активацію каскаду генів; безпосередню антимікробну дію на патоген.

Реакція надчутливості. Згідно з сучасними уявленнями, що базуються на результатах вивчення фізіолого-біохімічних аспектів активної стійкості рослин до хвороб, фізіологічна реакція рослин на вторгнення патогена проявляється у вигляді реакції надчутливості (HR – hypersensitive response), що є поштовхом до запуску процесу, який називають системною набутою стійкістю – SAR (systemic acquired resistance). **Реакція надчутливості** – морфологічні, гістологічні, фізіологічні і біохімічні зміни, що під впливом збудника хвороби призводять до передчасного відмирання (некрозу) зараженої тканини і в той же час забезпечують інактивацію і локалізацію патогена. Надчутливість, будучи верхньою межею сприйнятливості, дає ті самі результати, що й високий ступінь стійкості.

Ще на початку ХХ-го століття кембриджський ботанік Уард звернув увагу на цікаве явище: він спостерігав зв'язок між некрозами мезофілу листка у *Bromus* spp. і стійкістю щодо *Puccinia recondita* f. sp. tritici і встановив: патоген проникає своїми гіфами у тканини стійкого господаря так само легко, як і сприйнятливого, тобто, не спостерігається будь-яких відмінностей у поведінці стійких і сприйнятливих рослин-живителів щодо встановлення фізіологічного контакту з патогеном. У подальшому патоген поступово виснажує свого сприйнятливого живителя і на перших етапах патологічного процесу навіть деякою мірою стимулює активність його клітин. У стійкого живителя клітини, які вступають у контакт з патогеном, відмирають (некротизуються), що перешкоджає розвитку патогена і призводить до його загибелі. Інфекція обмежується локальним некрозом. Площа некрозу, як правило, обмежується зоною вторгнення патогена, тому некрози мають місцевий характер. Зовні це проявляється або в повній відсутності слідів зараження, або у вигляді дрібних некротичних

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників плям на листках у місцях вторгнення патогена. Таким чином рослина-живитель, жертвуючи незначною частиною клітин, позбувається хвороби.

Надчутливість як механізм стійкості насамперед важливий для взаємовідносин рослин-живителів з облігатними паразитами і близькими до них за типом живлення факультативними сапрофітами, здатними використовувати для живлення лише живі клітини.

Активна стійкість, пов'язана з надчутливістю, забезпечує дуже ефективний, хоча часто тимчасовий захист сільськогосподарських культур від багатьох грибних хвороб. На основі цього типу стійкості у світовій селекційній практиці було створено чимало сортів сільськогосподарських культур, імунних і з високим рівнем стійкості. На цій основі впродовж тривалого часу створювались сорти картоплі, стійкі до *Ph. infestans* і *Synchytrium endobioticum*, сорти пшениці та інших зернових культур, стійкі до різних видів іржі, борошнистої роси тощо. Наприклад, відомі в 70-х роках минулого століття сорти озимої пшениці Аврора і Кавказ було створено саме на основі цього типу стійкості.

Молекулярні дослідження показали, що окислювальний вибух, який проявляється в перші години після впізнавання патогена, призводить до окислення ліпідів мембран. У результаті чого порушується виборча проникність плазматичної мембрани і починається некероване витікання іонів з клітини. Як регулятор некротичної реакції може виступати саліцилова кислота, концентрація якої зростає в цей час у десятки разів. Можливо, її дія пов'язана з посиленням утворення внутрішньоклітинного суперокиснювача – пероксиду водню H_2O_2 . Крім АФК у некротичній реакції бере участь оксид азоту NO.

За руйнуванням мембран відбуваються колапс і руйнування вмісту клітини. Можливо, основну роль у руйнуванні цитоплазми грають клітинні гідролази. Олігомери, які утворюються

Розділ 4

в результаті руйнування вмісту клітин, виступають додатковими ендogenous елісаторами, що підсилюють передачу сигналу про проникнення патогена в геном клітини.

Утворення PR-білків. Згідно з сучасними уявленнями про роль білкового обміну в імунитеті рослин щодо хвороб фізіологічна відповідь (HR і SAR) може включати синтез патогенпов'язаних білків – PR-білків (pathogenesis related proteins), що свідчить про початок системної набутої стійкості. Виявлено, принаймні, 14 класів таких PR-білків. Наприклад, кислі форми PR-1 (PR-1a, PR-1b, PR-1c); β -1,3-глюконази (PR-2a, PR-2b, PR-2c); клас II хітинази (PR-3a і PR-3b); хевінподібні білки (PR-4a і PR-4b); тауматинподібні білки (PR-5a і PR-5b); кислі і основні ізоформи II класу хітинази; позаклітинна β -1,3-глюконаза (PR-Q1) і основна ізоформа PR-1. Гени, що контролюють синтез PR-білків, виявлені в однодольних і дводольних рослин. Зокрема, до них належать *WCF*-гени пшениці, що кодуєть ліпогеназу, цистеїнову протеїназу і три інших білки, конкретна дія яких поки що не відома.

Реальна роль PR-білків у захисті рослин підтверджена створенням трансгенних рослин, стійких до хвороб. Так, тютюн, томати і капуста, трансформовані генами хітинази, проявляли високу стійкість до ґрунтового патогену *Rhizoctonia solani*, при цьому у трансгенних рослинах відбувалось руйнування хітинових стінок гіф гриба. Процес деградації посилювався за спільної дії хітинази з β -1,3-глюканазою, тому що у деяких грибів хіттинові шари вкриті шаром глюканів, які руйнує глюканаза. У рослинах тютюну, трансформованих генами PR-1-білків, спостерігалось зниження ураження грибоподібними мікроорганізмами *Peronospora tabacina* і *Phytophthora nicotiana*.

Функції PR-білків і способи їх індукції в даний час інтенсивно вивчають, цей напрямок вважається одним з найперспективніших в конструюванні стійкості рослин.

Генетика імунитету до збудників хвороб і шкідників

Фітоалексини – низькомолекулярні антибіотичні речовини, специфічні для різних видів рослин. Зокрема, у бобових це ізофлавоноїди, у пасльонових – сесквітерпеноїди, у складноцвітих – поліацетилени. Вперше ці речовини виявили німецькі вчені Мюллер і Боргер у бульбах картоплі, заражених несумісною расою *Phytophthora infestans*. К. Мюллер сформулював теорію індукованих антибіотиків, у якій фітоалексинам відвів роль основного захисного механізму рослин. З 60-х років XX ст. почалося інтенсивне виділення і вивчення цих сполук.

У даний час у рослинах різних родин, включаючи злаки (овес, рис, сорго та ін.), встановлено понад 300 речовин з фітоалексивною активністю, що беруть участь у захисті рослин. На сьогодні виявлено та ідентифіковано цілий ряд фітоалексинів у різних видів рослин: у картоплі та інших пасльонових (рішитин, любімін, фітуберин), у гороху (пізатін), у квасолі (фазеолін), у кінських бобів (віціатин, вісрон, вісронова кислота), у конюшини (трифоліризин, медікаприн), у моркви (ізокумарин), у бавовнику (гемігоссіпол, вергозин) та ін.

В утворенні фітоалексинів існують певні особливості:

1. Вони синтезуються як у стійких, так і в сприйнятливих до хвороби рослинах, проте стійкі синтезують їх значно швидше і в значно більшій кількості, ніж сприйнятливі. Загальним є те, що синтез їх знижується в міру старіння тканин рослин.

2. Фітоалексини не є специфічними щодо окремих мікроорганізмів речовинами, бо утворення їх в одного й того самого виду рослин спричиняють різноманітні мікроорганізми, серед яких є факультативні та облігатні паразити як патогенні, так і непатогенні для даного виду. Рішитин, любімін і фітуберин у бульбах картоплі утворюються як при ураженні їх *Ph. infestans*, так і *Erwinia carotovora*.

Розділ 4

3. Фітоалексини не є абсолютно необхідними для виникнення реакції надчутливості і системної надбаної стійкості.

4. Фітоалексини утворюються не тільки при ураженні рослин мікроорганізмами, а й під впливом різних речовин, у тому числі антибіотиків, іонів важких металів, неорганічних та органічних сполук тощо.

5. Утворення фітоалексинів може бути спричинене механічними і фізичними факторами. Зокрема, поступове механічне пошкодження листків кінського бобу спричиняло некроз і утворення фазеоліну впродовж 24 годин, а сильне пошкодження листків не призводило до цього; синтез фазеоліну стимулювало також проморожування бобів, у той час проколювання листків шпилькою або нанесення на них подряпин не зумовлювали синтезу цього фітоалексину.

Укріплення структурних бар'єрів.

Утворення морфологічних структур є однією зі захисних відповідей рослин на вторгнення фітопатогенних мікроорганізмів. Ступінь розвитку структурних утворень істотно відрізняється у різних комбінаціях. За часом прояву морфологічних утворень їх поділяють на три категорії:

- експресні цитологічні реакції у формі відкладень у місці спроби вторгнення патогенів;
- накопичення відкладень і посилення клітинних стінок після встановлення типу взаємовідносин (утворення папіл, капсул навколо інфекційних структур патогенів);
- пізні реакції, які призводять до формування гістологічних структур, які ізолюють патогенів від здорової тканини.

Цитологічні реакції рослин. У деяких патосистемах існують ранні та активні морфологічні реакції у вигляді відкладень на клітинній стінці рослини до проникнення патогена у місце контакту з інфекційними структурами грибів. Такі реакції мають місце як при спробах проникнення неспеціалізованих

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників грибів, так і при розвитку паразитів у ряді стійких комбінацій з рослинами-живителями.

За дослідження реакції епідермальних живих клітин ячменю на розвиток збудника борошнистої роси *Blumeria graminis*, проведених за допомогою мікровідеокамери, була виявлена швидка відповідь рослини через кілька хвилин після контакту з патогеном. У клітинах змінювалась структура цитоскелету, були відзначені посилення руху цитоплазми, збільшення кількості цитоплазматичних тяжів, міграція ядра до місця контакту з грибом. Інтенсивна реакція цитоплазми виявлялась вже під час утворення апресорія на поверхні рослини, тобто за 4 – 5 год. до проникнення гриба. У деяких стійких комбінаціях, наприклад з генами стійкості ячменю до борошнистої роси *mlo* і *mlg*, відкладення були настільки швидкими і потужними, що перешкоджали проникненню патогена до епідермісу стійких сортів. Відкладення на клітинних стінках рослин істотно розрізняються за видом і складом. Для них було запропоновано загальну назву «папіли». Основна функція папіл – репарація клітинного пошкодження, так як вони можуть регулювати проникність пошкоджених клітин. Формування потужних відкладень на клітинних стінках, як правило, пов'язано з високою несумісністю партнерів. Основну частину папіл становить калоза (β -1,3-глюкан). Посилення механічної і хімічної міцності клітинних стінок відбувається у результаті включення додаткових речовин і утворення між ними поперечних зв'язків. До таких речовин відносять: низькомолекулярні феноли, пектини, суберин, лігнін, структурні білки, кальцій і кремній. У клітинні стінки можуть включатися знову синтезовані захисні білки, у тому числі інгібітори ферментів і токсинів патогена.

Для багатьох патогенів бар'єром за проникнення через клітинну стінку служать відкладення лігніну, що утворюються на перших етапах взаємодії в процесі окисного вибуху. Лігнін є неспецифічним захисним полімером рослин, його синтез індукується за

Розділ 4
інфекції. Лігнін забезпечує стійкість тканин до мацерації.

Істотну роль у зміцненні клітинної стінки мають структурні білки рослин, зокрема оксипролін-насичені білки. Вони представляють собою лінійні полімери з високим вмістом основних амінокислот. Завдяки позитивному заряду цих амінокислот клітинна стінка перетворюється на полікатионний бар'єр, який пов'язує негативно заряджені частинки або клітини, подібні до бактеріальних.

Гістологічні захисні структури. Інфікування деякими грибами, бактеріями і вірусами стимулює поділ і утворення репараційних шарів клітин рослини поза місцем інфекції. Ці шари клітин (кірка) перешкоджають подальшому поширенню патогена, а також блокують переміщення токсичних речовин, які секретуються патогеном. До того ж, коркові шари зупиняють потік поживних речовин і води від здорових тканин до інфікованих і позбавляють патогена живлення. Мертві тканини з мікроорганізмом залишаються на поверхні рослини, утворюючи некротичні плями або бляшки. Так формуються коркові шари тканин за розвитку ризоктоніозу картоплі.

Ампутаційні шари формуються в молодому листі кісточкових плодів культур після інфікування різними збудниками хвороб. Ампутаційний шар складається з кругового шару клітин, що оточує місце інфекції. У міру розвитку інфекції середина пластинки розчиняється по всій товщині листа, повністю ізольовуючи центральну частину інфекційної плями від органу. У результаті зона зараження зморщується, відмирає і випадає разом з патогеном.

Тіли формуються в ксилемних судинах більшості рослин за ураження судинними патогенами. Вони є виростами протопластів сусідніх паренхімних клітин, які проникають до порожнини судини через отвори в клітинних стінках. Тіли мають целюлозну стінку і можуть

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників
за активного розвитку повністю закупувати судини.

Практичний блок

Вивчення впливу воскового нальоту на зараження рослин пшениці збудником борошнистої роси (*Blumeria graminis f. sp. tritici Golov.*)

Мета: Побачити як восковий наліт впливає на зараженість пшениці збудником борошнистої роси

Матеріал та обладнання. Рослини пшениці (будь-який сорт пшениці з восковим нальотом, який уражується збудником борошнистої роси); суспензія конідій *B. graminis*; пульверизатор для нанесення спор на рослину; мікроскопи, предметне і покривне скло.

Зміст завдання. Восковий наліт, який утворюється на листках, піхвах листків і стеблах рослин, більшості злакових, надає рослині блакитно-сизого відтінку. Він складається з зернистої маси воску, який просочує кутикулу і виходить назовні у вигляді крупинок. Як наслідок – зниження водонепроникності епідерми. Наліт перешкоджає проникненню патогена до рослини, тому що інфекційні краплі скочуються з поверхні воскового нальоту. Тому при зараженні молодих листків злаків у лабораторних умовах їх протирають пальцями.

Хід роботи. В умовах аудиторії чи теплиці для підготовки заняття вирощують яру чи озиму пшеницю з восковим нальотом на листках до початку фази кушіння (1-2 листка). Вазони з рослинами для штучного зараження борошнистою росою у день проведення заняття розставляють на аудиторні столи (по 2-4 вазони).

Одночасно збирають інфекцію (листки пшениці з конідіальною стадією збудника). Борошністу росу можливо підтримувати на сприйнятливих сортах озимої пшениці, рослини яких викопують з осінніх посівів у полі,

Розділ 4

пересаджують у вазони і продовжують вирощувати в умовах теплиці. У день проведення заняття декілька листків, уражених конідиальною стадією збудника борошнистої роси, поміщають у колбу з водогінною водою, збовтують до утворення суспензії – 15 конідій у полі зору мікроскопу (збільшення 7х40).

Перед початком зараження з рослин обережно вологим тампоном знімають восковий наліт.

Для контролю у деяких вазонах залишають рослини з восковим нальотом.

Рослини зі знятим восковим нальотом і контрольні обприскують суспензією збудника борошнистої роси, вкривають їх ізоляторами для попередження всихання крапель суспензії, етикують і залишають для зараження на 24 год. при температурі 10–15 °С.

Інкубаційний період у *B. graminis* нетривалий – 5-6 днів, тому на наступному занятті підраховують число подушечок з міцелієм і конідиальним спороношенням гриба на листках пшениці з восковим нальотом і вільних від нього.

Облік ураження борошнистою росю проводять у 10 рослин пшениці, які ростуть підряд, а результати обліку записують у табл. 4.5.1.

Таблиця 4. 5. 1. **Вплив воскового нальоту на зараження пшениці збудником борошнистої роси**

Сорт	Наявність воскового нальоту	№ рослини	№ листка	Подушечки борошнистої роси	
				Кількість, шт.	Розмір, мм
	З нальотом		1		
		1	2		
		і далі			
	Без нальоту		1		
		1	2		
		і далі			

Обговорення результатів. Наприкінці заняття складають підсумкову таблицю за результатами всіх студентів. За отриманими загальними даними роблять висновок про вплив воскового нальоту на зараження пшениці збудником борошнистої роси. Пропонується відповісти на наступні запитання:

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

1. На листках яких рослин швидше утворились подушечки борошнистої роси?

2. Який середній розмір подушечок борошнистої роси на листках і чи є різниця у розмірі подушечок між варіантами досліду?

3. Який механізм дії воскового нальоту у захисті рослин від захворювання?

Питання до самоконтролю:

1. У результаті чого порушується виборча проникність плазматичної мембрани і починається некероване витікання іонів з клітини?

- окислення ліпідів мембран
- утворення папіл
- некроз клітин
- накопичення лігніну

2. Основна функція папіл.

- репарація клітинного пошкодження
- лізис структур патогенна
- некроз клітин
- утворення фітоаклексинів

3. Приклад утворення ампутаційних шарів.

- ураження картоплі фітофторозом
- ураження яблуні паршею
- ураження вишні кокомікозом
- ураження сливи іржею

4. Які речовини завжди присутні у рослині, незалежно від зараження патогенами.

- H_2O_2
- PR-білки
- фітоалексини
- фітонциди

5. Фітоалексин пасльонових.

- рішитин
- пізатин
- вісон
- ізокумарин

Розділ 4

6. Комплексні білкові сполуки, які вибірково пов'язують вуглеводи, не викликаючи при цьому їх перетворення

- а) PR-білки
- б) фітоалексини
- в) фітонциди
- г) лектини

7. Який PR-білок відноситься до класу β -1,3-глюконаз?

- а) PR-2a
- б) PR-1a
- в) PR-5a
- г) PR-4a

8. Функції активних окиснювачів.

- а) лізис оболонки клітин
- б) репарація клітин
- в) активація каскаду генів
- г) антимікробна дія на патоген

9. Які речовини властиві не окремим групам рослин, а всьому рослинному світу – від бактерій до квіткових рослин?

- а) PR-білки
- б) фітоалексини
- в) фітонциди
- г) лектини

10. Які фактори забезпечують стійкість яблуні до збудника парші?

- а) дрібне листя
- б) восковий наліт на плодах
- в) потовщена шкірка плодів
- г) чорні плоди

Тема 4.6. Генетика стійкості рослин



4.6.1. Теорія спорідненої еволюції рослин і патогенів П.М. Жуковського, центри спорідненої еволюції та їх значення для

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників селекції на імунітет. У своїй роботі "Вчення про імунітет рослин до інфекційних захворювань" М.І. Вавилов (1935) висловив думку про те, що імунітет рослин щодо інфекційних захворювань історично склався в центрах походження видів культурних рослин і паразитів. П.М. Жуковський (1959, 1965, 1971) сформулював концепцію спорідненої еволюції рослини-живителя та паразита на їх спільній батьківщині: у центрах походження культурних рослин упродовж тривалого періоду, що вимірюється тисячоліттями, відбувається їх споріднена еволюція. Рослина-живитель утворює нові різновиди та форми, а паразит – нові раси та біотики. Еволюція живителя відбувається на перманентному інфекційному фоні, а споріднена еволюція живителя і паразита постачає величезний матеріал для природного і штучного доборів. Результатом спорідненої еволюції є виживання і збереження в природних умовах стійких форм живителя, незважаючи на те, що паразит утворює часто більш вірулентні раси і біотики. Мінливість та посилене формоутворення властиве як рослинам, так і мікроорганізмам.

Практичний висновок теорії: найцінніший вихідний матеріал для селекції слід шукати на спільній батьківщині рослини-живителя та паразита – у центрах їх походження, де на перманентному інфекційному фоні відбувається добір найстійкіших форм рослин. Таким чином, ця концепція є теоретичною базою пошуку джерел стійкості для селекції на імунітет.

На сьогодні визначено центри спорідненої еволюції більшості систем рослина-живитель – патоген.

Triticum spp. L. – Puccinia spp. Центром походження пшениці є Закавказзя, Іран, Мала Азія, Східне Середземномор'я. У цьому регіоні зустрічається найбільша різноманітність видів пшениці (більше тринадцяти) та найближчого її родича – роду *Aegilops spp.* (понад десять видів). Особливо добре вони збереглися в Нагірному Карабасі та в прикордонних з Іраном місцевостях, де не випасають худоби, а також

Розділ 4

на старих мусульманських кладовищах. Тут усюди зустрічаються природні гібриди *Triticum* x *Aegilops*. Історично в процесі добору у цих регіонах виникли види пшениці: *T. timopheevi*, *T. militinae*, *T. persicum*, *T. dicocum*, *T. fungicidum* тощо, імунні та з високим рівнем стійкості до збудників різних хвороб. Поряд з цим у цьому регіоні виявлено чи не найбільшу порівняно з іншими регіонами кількість рас і біотипів збудників іржастих хвороб. Це свідчить, що в центрі походження пшениці відбувається найінтенсивніше формоутворення паразитів, бо навіть такий рекордний за рівнем стійкості проти хвороб вид як *T. timopheevi* і новий вид *T. militinae* не є там абсолютно імунними.

4.6.2. Теорія Флора „ген до гена” та її значення для селекції на імунітет. Біффен першим повідомив, що стійкість рослин проти хвороб підпорядковується законам Менделя. У 1905 р. опублікував результати своїх дослідів з жовтою іржею пшениці (збудник – *Puccinia glumarum*). Він виявив, що після схрещування сприйнятливих сортів Мічиган Бронз і Ред Кінг з англійським сортом Рівет, стійкість якого щодо цієї хвороби була давно відомою, потомство F₂ розщеплювалося приблизно у співвідношенні три сприйнятливих рослини до однієї стійкої, що свідчило про наявність у сорту Рівет одного рецесивного гена стійкості до *P. glumarum*.

Споріднена еволюція рослин-живителів і їх паразитів на спільній батьківщині привела до виникнення комплементарних (взаємодіючих) генетичних систем у рослин і паразитів. Різноманіття генів стійкості, виявлених у вищих рослин у центрах їх формування, різноманіття рас паразитів, спеціалізованих щодо окремих генотипів рослинної популяції, свідчать про наявність взаємодіючих продуктів між певними парами генів патогенного організму і рослини-живителя.

Генетичним вираженням теорії спорідненої еволюції рослини-живителя і патогена є гіпотеза американського

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників фітопатолога Флора "ген проти гена", який сформулював її на основі детального вивчення генетичної взаємодії рослини-живителя і патогена в системі *Linum usitatissimum* – *Melampsora lini*.

Здійснивши гібридологічний аналіз успадкування стійкості різних сортів льону і вірулентності різних рас патогена, він дійшов висновку: кожному гену, що контролює стійкість рослини льону проти збудника іржі, відповідає специфічний ген, що контролює вірулентність патогена. Іншими словами, на кожний ген рослини-живителя, здатний мутувати так, щоб забезпечити їй стійкість, припадає ген паразита, здатний мутувати так, щоб цю специфічну стійкість подолати. Стан стійкості виникає лише в тому разі, коли взаємодіючі алелі рослини-живителя і патогена домінують. Якщо ж один з них перебуває в гомозиготному рецесивному стані, рослини стають сприйнятливими до патогена. Таким чином, гени вірулентності рецесивні, а гени авірулентності – домінують. Взаємовідносини рослини і паразита, що мають одну пару взаємодіючих генів, можна надати у вигляді схеми (табл. 4.6.1.).

Таблиця 4.6.1. *Взаємовідносини рослини і паразита, що мають одну пару взаємодіючих генів*

Паразит	Рослина-живитель		
	rr	Rr	RR
AA	+	—	—
Aa	+	—	—
aa	+	+	+

Взаємовідносини рослини і паразита, що мають по дві пари взаємодіючих цілком домінують генів, можна виразити таким чином (табл. 4.6.2.).

Кожна пара генів взаємодіє між собою незалежно. Якщо хоча б одна пара генів домінують, рослина буде стійкою незалежно від стану іншої пари генів.

Розділ 4

Таблиця 4.6.2. *Взаємовідносини рослини і паразита, що мають по дві пари взаємодіючих генів*

Паразит	Рослина-живитель			
	r1r1r2r2	R1r2r2	r1r1R2	R1R2
A1A2	+	—	—	—
a1a1A2	+	+	—	—
A1a2a2	+	—	+	—
a1a1a2a2	+	+	+	+

Примітка: R, r – гени стійкості і сприйнятливості рослини-живителя; A, a – гени вірулентності та авірулентності патогена; (+) – стан сприйнятливості, (–) – стан стійкості рослин

Флор виявив у льону 25 домінантних генів стійкості, а в збудника іржі – 25 рецесивних генів вірулентності. Крім того, він створив метод одержання ліній, що мають будь-яку комбінацію генів стійкості в межах алельності, і одержав 27 ліній льону, кожна з яких мала один ген стійкості до північноамериканських рас *M. lini* (ізогенні лінії).

Високу специфічність взаємовідносин "ген проти гена", крім системи льон – іржа, було доведено для систем кукурудза – збудник іржі; пшениця – збудники стеблової, бурої і жовтої іржі; овес – збудник стеблової іржі; соняшник – збудник іржі; пшениця, ячмінь – збудники борошнистої роси; пшениця – збудники твердої, карликової та летючої сажки; картопля – збудники фітофторозу і раку; яблуня – збудник парші тощо. Взаємовідносини "ген проти гена" існують навіть між пшеницею і гесенською мухою.

4.6.3. Теорія вертикальної і горизонтальної стійкості Ван дер Планка. Терміни вертикальна і горизонтальна стійкість було запропоновано і теоретично обґрунтовано Я. Ван дер Планком (1968, 1972).

Вертикальна стійкість зумовлена дією одного або кількох головних генів, спрямована проти певних рас патогена. Наприклад, сорти картоплі, похідні від *Solanum tuberosum*, не мають головних генів R і сприйнятливі до всіх рас *Phytophthora infestans* dBy. R-гени картопля одержала від *Solanum*

Genetica імунітету до збудників хвороб і шкідників demissum; гени Lr9 і Lr19 в м'яку пшеницю інтрогресовані, відповідно, від *Aegilops umbellulata* і *Agropyron elongatum*. Вертикальна стійкість вступає в дію переважно після того, як патоген проник до рослини, і може бути пов'язана з такими активними захисними реакціями рослин як надчутливість, утворення фітоалексинів, фізіолого-біохімічними змінами в тканинах рослин. Властива рослинам при ураженні біотрофами, але інколи виникає при ураженні некротрофами (факультативними паразитами).

Переваги і недоліки вертикальної стійкості. По-перше, її високий рівень. Сорти з таким типом стійкості характеризуються або цілковитим імунітетом щодо певних рас, або високим рівнем стійкості, що забезпечується дією сильних генів, які її зумовлюють. По-друге, з нею легко працювати селекціонерам; вона добре успадковується і рослини з таким типом стійкості легко виявити в гібридних поколіннях на ранніх етапах селекційного процесу (починаючи з F₂).

Основним недоліком вертикальної стійкості є її нестабільність, пов'язана з нетривалою ефективністю генів, що її зумовлюють, якщо сорти займають великі території.

Горизонтальна стійкість зумовлена багатьма малими генами (полігенами), дія яких спрямована проти всіх рас патогена. За такого типу стійкості можуть діяти різноманітні механізми, які протистоять проникненню патогена в тканини рослин і їх колонізації: восковий наліт на поверхні покривних тканин рослин; опушеність листя; будова, кількість і режим роботи продохів; товщина кутикули, спосіб цвітіння, будова квіткових лусок; наявність механічних перешкод для патогена у вигляді склеренхіми, коленхіми; нестача необхідних для живлення патогена поживних речовин.

Переваги та недоліки горизонтальної стійкості. Основною її перевагою є стабільність. Вона не втрачається при появі нових рас патогена і це забезпечує сортам з

Розділ 4

таким типом стійкості тривале існування у виробництві. Наприклад, сорт озимої пшениці Безоста 1 з горизонтальною стійкістю проти збудника бурої листової іржі, створений у середині 60-х рр. минулого століття, дотепер не втратив її, незважаючи на те, що за цей тривалий період відбулися істотні зміни в расовому і біотипному складі популяції патогена. Недоліки:

1. За рівнем стійкості вона значно поступається вертикальній. Сорти з горизонтальною стійкістю, як правило, мають середній рівень ураження.

2. Вона контролюється малими (слабкими) генами, тому значною мірою зазнає впливу факторів навколишнього середовища і проявляється у вузьких межах температури, вологості тощо;

3. З нею важко працювати селекціонерам; створення сортів з горизонтальною стійкістю пов'язане з великими методичними труднощами, бо поки що не існує ефективних способів виявлення і контролю її на ранніх етапах селекційного процесу.

Щодо стратегії використання вертикальної і горизонтальної стійкості існують як різні думки, так і компромісні:

- вертикальна стійкість корисна в багатолінійних сортах, які можна швидко "реконструювати" за подолання патогеном ефективності одного, двох і навіть кількох генів;

- горизонтальна стійкість має явні переваги при використанні її проти хвороб деревних порід, багаторічних культур тощо, особливо, коли відсутні сильні гени вертикальної стійкості;

- горизонтальній стійкості слід віддавати перевагу і тоді, коли йдеться про захист від патогенів, що відрізняються високим рівнем мінливості, внаслідок чого сорти з вертикальною стійкістю швидко втрачають її через виникнення нових рас;

- горизонтальна стійкість дає добрий ефект у поєднанні з іншими захисними

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників заходами, зокрема, з раціональним застосуванням фунгіцидів. Поєднання горизонтальної стійкості сорту з раціональним застосуванням агротехнічних прийомів значно знижує шкодочинність хвороби. Цю стійкість також можна значною мірою підвищити за застосування збалансованих за елементами живлення добрив, мікроелементів тощо;

- однібічне використання вертикальної стійкості призводить до так званого "ефекту Вертіфолії", коли в процесі доборів за селекції картоплі на вертикальну стійкість були цілком втрачені гени горизонтальної стійкості. Таке явище можливе і в селекції будь-якої культури, коли нехтують горизонтальною стійкістю.

4.6.4. Закономірності успадкування ознаки стійкості. Цікавість до вивчення стійкості рослин проявилась вже на початку розвитку генетики. Незабаром після перевідкриття законів Менделя Біфф (1905) продемонстрував моногенне успадкування стійкості пшениці до жовтої іржі *Puccinia striiformis*. Генетичні дослідження імунітету рослин мали велике теоретичне значення для ефективної селекції рослин на стійкість до патогенів. За вивчення інших ознак (урожайності, якості продукції, вегетаційного періоду і ін.) дослідники мають справу з геномом рослини, який взаємодіє з середовищем. Фенотипичний прояв стійкості є функцією взаємодії трьох факторів: рослини, патогена і умов середовища, завдяки чому різко ускладнюється вивчення ознаки. За вивчення стійкості до хвороб дослідник має справу не з одним індивідом, а з популяцією патогена, наданої генетично різними організмами. Різноманітність рослин-живителів, їх фітопатогенів, а також різноманітність описаних вище механізмів захисту рослин створюють складну картину успадкування ознаки стійкості рослин.

Традиційний спосіб вивчення генетики ознаки включає гібридологічний аналіз, заснований на схрещуванні різних за стійкістю рослин. Прояв ознаки вивчають за проявом стійкості гібридів. Для підвищення

Розділ 4

достовірності результатів зараження рослин необхідно проводити відносно однорідним інфекційним матеріалом (клоном, штамом або ізолятом).

Оскільки генетика традиційно вивчає статистичні закономірності успадкування ознак, часто не торкаючись фізіолого-біохімічних механізмів, утворився певний розрив між генетичними і фізіологічними результатами. Останнім часом спостерігається зближення цих двох великих наукових напрямків, прагнення об'єднати інформацію про закономірності успадкування ознак з молекулярно-біологічним розумінням механізмів стійкості рослин. У різних патосистемах стійкість рослин може контролюватися різною кількістю генів, до того ж, виявляються різні випадки взаємодії генів. Далі розглянуті приклади успадкування ознаки стійкості у різних патосистемах.

Моногенний контроль. Вертикальна стійкість часто визначається моногенно. Гени стійкості кодують рецептори, які впізнають елісители патогенів та запускають каскад імунних реакцій. У більшості випадків ці гени мають сильний якісний ефект (великі або головні гени стійкості).

У той же час за вивчення набору мутантів *Pto*-алелей стійкості томатів до бактерії *Pseudomonas syringae* було виявлено, що зміна структури гена і його продукту призводить до зниження активності захисної відповіді у мутантних рослин. Таким чином, гени вертикальної стійкості можуть мати слабкий кількісний ефект (малі або мінорні гени).

Характер прояву великих генів переважно домінантний. Так, домінантний характер успадкування спостерігається в більшості випадків стійкості зернових культур до іржі, борошністих рос та сажкових хвороб. Мутації як за геном стійкості, так і за геном авірулентності, які змінюють специфічність впізнавання, призводять до сумісної взаємодії і втрати стійкості сортом.

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

Деякі види досить спеціалізованих некротрофів (роди *Cochliobolus*, *Alternaria*) синтезують селективні токсини, які визначають характер хвороби. У таких випадках спостерігається моногенна взаємодія між сортами рослин і расами патогенів. Якщо мішенню токсину служить продукт гена, то стійкість рослин пов'язана з відсутністю продукту і визначається рецесивними генами. Так визначається стійкість сортів вівса (похідних сорту Вікторія) до рас *Cochliobolus victoriae*, які продукують токсин HV.

За вивчення деяких патосистем виявлені різні типи алельної і міжалельної взаємодії генів. Складна система успадкування стійкості до гомозу, що викликається бактеріями *Xanthomonas malvacearum*, показана у бавовнику. Так, гени, які використовуються у селекції, проявляли наступний характер дії: B_2 – домінантний, B_3 і B_7 – неповне домінування, B_6 – ген-модифікатор.

Цікаве дослідження характеру успадкування стійкості до вірусних хвороб провів Фрейзер (2000). Він проаналізував дані по 86 сортам, випадковим чином вибрані з наукової літератури. Стійкість домінувала в 42 %, неповне домінування або дозовий ефект виявлялися в 36 %, рецесивність – у 18%, сорти з незрозумілим успадкуванням склали 22% випадків. Домінантний контроль спостерігався в основному за пригнічення розмноження вірусів в клітинах.

Моногенна стійкість часто визначає стійкість лише до обмеженого кола рас, який несе відповідний ген *Avr*. Практика сільського господарства показала, що цей тип стійкості може досить швидко долатися в результаті еволюції ознаки вірулентності у патогенів. Але існують приклади «довголіття», коли ген стійкості зберігає ефективність протягом декількох десятків років і захищає сорти від будь-яких біотипів популяції.

Олігогенний контроль. У деяких випадках успадкування стійкості визначається олігогенно, як правило, переважають ефекти комплементарності, адитивності або

Розділ 4

модифікуюча дія генів, проте в деяких патосистемах продемонстрований епістаз.

Домінантні комплементарні гени забезпечують стійкість окремих сортів вівса до корончастої і стеблової іржі. У ряді сортів пшениці стійкість до збудника бурої іржі *Russinia tritricina* визначається взаємодією двох комплементарних генів *Lr27* і *Lr31*.

Гени-модифікатори беруть участь у розвитку імунних реакцій, знижуючи або посилюючи прояв функцій інших генів. Так, ген *bc-u* стійкості квасолі до вірусу звичайної мозаїки, присутній у багатьох сортах, не має самостійного ефекту, однак він необхідний для прояву специфічних рецесивних генів стійкості *bc-1*, *bc-2* та *bc-3*. В ячмені виявлено два модифікатори (*Rar1* і *Rar2*), які потрібні для прояву гена стійкості до борошнистої роси *Mla12*.

У результаті дії генів-модифікаторів можуть бути змінені складові локальної імунної відповіді: інтенсивність утворення активних форм кисню, синтез захисних білків і фітоалексинів, зміцнення клітинної стінки і тощо.

Більш рідкісний випадок – епістатична взаємодія генів, проте при широкомасштабних дослідженнях генетики стійкості вона виявляється практично для кожної патосистеми. Наприклад, епістатичну дію встановлено для деяких генів стійкості жита до стеблової іржі, а також у системі генів, які визначають стійкість до жовтої іржі ячменю.

Полігенний контроль. Полігенна стійкість привертає увагу імунологів і селекціонерів-практиків за рахунок її ефективності для зниження інтенсивності епіфітотій і продовження стійкості сортів. У багатьох патосистемах показано, що у визначенні кількісної стійкості беруть участь від 2 до 10 ефективних факторів. Особливістю успадкування кількісної стійкості є те, що в потомстві батьківських форм з різною стійкістю спостерігається безперервний спектр розщеплення гібридів. Безперервний розподіл вираження кількісної стійкості в гібридній

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників популяції – результат взаємодії генотипу рослин з популяцією патогена і факторами середовища. Чим більше генів і факторів середовища впливає на прояв стійкості, тим сильніше фенотипічний прояв кількісної стійкості наближається до середньої, яка виражається нормальним законом. За полігенного успадкування ознаки найчастіше проявляються ефекти адитивної і модифікуючої взаємодії генів. Полігенний контроль і кількісне вираження ознаки показані для стійкості пшениці до різних іржастих хвороб, ячменю до борошнистої роси, картоплі до фітофторозу і тощо.

У потомстві за схрещування стійких і сприйнятливих форм, а також за схрещування зразків з помірною стійкістю в поколіннях гібридів можуть спостерігатися відхилення від батьківських форм як у бік підвищення, так і в бік зниження стійкості – позитивні і негативні трансгресії. Трансгресивні форми спостерігалися за селекції різних сільськогосподарських культур на імунітет до збудників хвороб і шкідників (пшениці на стійкість до бурої і стеблової іржі, борошнистої роси, картоплі – до фітофтори тощо).

Цитоплазматичне успадкування. Як правило, гени стійкості локалізовані в ядрі, успадковуються за менделевськими законами. Але існують винятки, коли стійкість або сприйнятливість визначається генами, локалізованими в геномах мітохондрій і хлоропластів. Ця стійкість передається гібридам за допомогою материнських гамет. Так, сприйнятливість кукурудзи з цитоплазматичною чоловічою стерильністю техаського типу до раси *Cochliobolus heterostrophus*, яка утворює НС-токсин, була пов'язана з продуктом мітохондріального гена *T-urf13*. Продукт гена *T-urf13* – протеїн утворює комплекс з токсином гриба, що призводить до пошкодження мітохондрій і ураження рослин. У стійких форм продукт гена змінений у результаті зсуву рамки зчитування або делеції гена, і в такому вигляді не утворює комплекс з токсином патогена.

Розділ 4

Таким чином, за взаємодії видів культурних рослин з патогенними організмами спостерігаються різні варіанти успадкування ознаки стійкості, що є результатом взаємодії складних генетичних систем на популяційному і індивідуальному рівнях. За генетичних досліджень вертикальної стійкості було встановлено, що вона, як правило, визначається моно- або олігогенно, з різними типами взаємодії олігогенів. У деяких випадках стійкість визначається цитоплазматичними генами.

4.6.5. Організація та еволюція генів стійкості у геномі рослин. За допомогою методів молекулярної генетики було отримано великий обсяг інформації про структуру деяких генів, їх організації в геномі різних видів і напрямках еволюції. Такі дослідження проводять у рамках великих міжнародних програм з розшифрування генома культурних рослин.

Отримані результати дають можливість створювати детальні генетичні карти груп зчеплення, отримати уявлення про еволюцію генів стійкості, а також вивчити структуру генів споріднених видів.

Локалізація генів у групах зчеплення. Інтенсивні генетичні дослідження найважливіших сільськогосподарських культур продемонстрували, що типовою рисою багатьох геномів є утворення кластерів генів стійкості. Описано приклади алельних серій або кластерів генів:

- стійкість кукурудзи до рас північної іржі *Rhizoctonia solani* контролюють п'ять локусів. Два з них - *Rp1* і *Rp5* – тісно зчеплені, причому *Rp1*-локус несе, принаймні, 14 алелів з різною специфічністю, що позначаються як *Rp1*-... *Rp1*-*N*;

- *Mla*-локус, який контролює стійкість ячменю до борошністої роси, містить, принаймні, 28 різних расоспецифічних генів. Ці гени організовані у великій генний кластер, між деякими генами отримані рекомбінації.

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

Великі кластери генів виявлені також у льону до збудника іржі *Melampsora lini*, у конюшини до збудника борошністої роси *Erysiphe communis*, у томата до збудника бурої плямистості *Cladosporium fulvum*, у рису до збудника бактеріального опіку *Xanthomonas oryzae*, у латуку до збудника несправжньої борошністої роси *Bremia lactucae* тощо.

Молекулярно-генетичні дослідження модельних культур, зокрема арабідопсиса, показали, що кластери складаються з десятків повторень, аналогічних *R*-генам. Наприклад, у геномі арабідопсиса вони займають 1 – 2 % інформаційної ємності генома. Окрім того, одні й ті ж локуси в різних лініях рослин несуть різні алелі зі специфічністю до рас патогенів.

Таким чином, кластерна організація генів стійкості, ймовірно, є загальною закономірністю в побудові імунної системи рослин.

Еволюція генів стійкості. За рівнем накопичення інформації з'явилася можливість простежувати закономірності еволюції культурних рослин. Вперше це було зроблено для рослин з невеликим геномом (льону, кукурудзи, арабідопсиса). На сьогодні проводять роботу на видах з великими геномами (пшениця, картопля і ін.).

Механізми еволюційної мінливості локусів були вивчені на прикладі кластера *Rp1* кукурудзи, що кодує расоспецифічну стійкість до іржі. Деякі з алелей локусу мають високу частоту мутації в напрямку сприйнятливості. Якщо природна частота мутацій становить 10^{-6} - 10^{-7} , то деякі *Rp1*-алелі мутують з частотою 10^{-4} у покоління. Локус схильний нерівному кросинговеру, у результаті рекомбінації з'являються нові варіанти з'єднань генів специфічної стійкості проти колекції рас іржі кукурудзи.

Таким чином, мутації і рекомбінації є генетичними механізмами, що ведуть до зміни специфічності впізнавання за взаємодії партнерів. Такі зміни можуть служити компенсацією успіхів патогена в його коеволуції з рослиною-живителем. Патоген,

Розділ 4

який має величезну популяцію і високу швидкість розмноження, змушений втрачати домінуючу функцію (тобто ген авірулентності), щоб отримати можливість розвиватися на стійкому господарі. Навпаки, рослина має утворювати нові домінуючі гени для захисту проти сумісної раси. Кластери тісно зчеплених генів формують молекулярну базу для швидкої еволюції расоспецифічної стійкості рослини-живителя.

За вивчення порядку генів за допомогою молекулярних маркерів було встановлено, що для різних видів характерна різна ступінь консервативності (стабільності) порядку генів. Вперше консервативність у порядку генів спостерігали у пасльонових на прикладах геномів томатів і картоплі. Пізніше дивовижну схожість порядку генів було показано у зернових, включаючи пари культур: рис-пшениця, пшениця-жито, ячмінь-пшениця, кукурудза-сорго, кукурудза-рис, ячмінь-рис. Консервативність зберігалась, незважаючи на великі відмінності у розмірах геномів (кукурудза-сорго або пшениця-рис).

Завдяки консервативності порядку генів і композиції локусів, які містять гени стійкості, можна використовувати види з маленькими геномами (кукурудзу, сорго) в якості генетичної моделі рослин. Це дасть можливість більш точно локалізувати і за необхідності ізолювати локус з геном стійкості навіть для виду з великим геномом або поліплоїда.

На сьогодні клоновані десятки генів стійкості, вивчені їх структура і функції. Деякі клоновані гени були перенесені в інші види і показали свою ефективність. Прикладами результативної передачі генів стійкості служать:

- перенесення *N*-гена стійкості до ВТМ з тютюну у томати;
- передача гена *Pto* томатів в геном тютюну;
- перенесення *Sf*-генів стійкості томатів до бурої плямистості в тютюн і картоплю.

Збереження активності гена стійкості в нових видах дає можливість припускати

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників консерватизм у побудові ланцюгів сигнальної трансдукції у споріднених видів. Постає питання: чи реалізується багато різних механізмів стійкості або механізми схожі? Накопичені дані вказують, що після специфічного для виду первинного впізнавання шляху сигнальної трансдукції швидко зливаються в один або обмежене число шляхів, які координують загальну імунну відповідь.

Практичний блок

Вивчення генів стійкості рослин

Мета: навчитись знаходити інформацію про відомі гени стійкості рослин

Довідковий матеріал. Гени стійкості у рослин – *R*-гени. Продукти генів стійкості рослин називають *R*-білками. Структуру перших трьох *R*-білків (з томатів, арабидопсису і тютюну) встановили порівняно недавно – у 1993 р. *R*-білки складаються з кількох структур, що забезпечують взаємодію з еліситором і молекулами-мішенями (зокрема, з ДНК) і передавання сигналу на інші молекули, циклічні нуклеотиди, протеїнкінази та ін.

На сьогодні відомі послідовності більш ніж у 20 *R*-генів. Вони визначають стійкість рослин проти різноманітних типів патогенів (вірусів, бактерій, грибів, тварин) і мають схожість, що свідчить про однакову природу виникнення і формування захисних реакцій. Всі ці гени згруповано у 5-8 класів (у залежності від автора).

Кожний клас об'єднує *R*-гени, що кодують синтез певних продуктів, які "запускають" певні захисні реакції в клітинах рослин і передавання сигналів. Зокрема, до першого класу входить ген *Hm1*, що контролює стійкість кукурудзи до раси 1 *Helminthosporium maydis*; він кодує синтез ферменту NADPH-залежної НС-токсинредуктази, яка інактивує НС-токсин *Helminthosporium maydis*. Гени стійкості томатів *Pto*, *PtH*, *Pti4*, *Pti5*, *Pti6* щодо *Pseudomonas syringae* p.v. *tomato* кодують

Розділ 4
синтез позаклітинної серин-треонін-специфічної протеїнази, здатної до аутофосфорилування. Саме цей продукт гена *Pto* "запускає" каскадну реакцію фосфорилування, що зумовлює передавання сигналу. Передавання сигналу всередині клітини контролюють і гени *N*, *L6M*, *Rpp5*, відповідно, тютюну, льону і арабідопсису, які зумовлюють стійкість цих рослин, відповідно, проти вірусу тютюнової мозаїки, *Melampsora lini*, *Peronospora parasitica*. Продуктами цих генів є внутрішньоклітинний білок з TIR-доменом, NBS, гідрофобним доменом і LRRs-доменом. Ген *Xo21*, що належить до п'ятого класу і зумовлює стійкість рису до *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, кодує синтез позаклітинного LRRs-білка з поодиноким трансмембранним районом і цитоплазматичним серин-треонінкіназним доменом.

Таким чином, у розпізнаванні і передаванні сигналів за патогенезу в рослин беруть участь гени певного типу, що збігається з фактом неможливості передбачення структури *R*-білка з огляду на природу патогена, або – навпаки.

Різноманіття *R*-генів пов'язане з їх геномною організацією. Різні *R*-локуси можуть мати багато алелів. Зокрема, *L*-локус рослин льону має 13 алелів, що зумовлюють стійкість проти різних рас *M. lini*. Відомо також, що у багатьох рослин *R*-локус має тандемні повтори тісно зчеплених гомологічних *R*-генів з різною специфікою. Наприклад, *M*-локус рослин льону має сім тісно зчеплених генів стійкості проти збудника іржі. Крім того, виявлено асоціації *R*-генів, які називають головними комплексами стійкості (MRCs – major resistance complexes). Зокрема, у арабідопсису виявлено п'ять *R*-ген багатих районів.

Для генів, що кодують продукти *R*-генів, характерне не випадкове розміщення на хромосомах. Поширені три типи локалізації: поодинокі діалельні (один локус з двома алелями, які контролюють сприйнятливість і стійкість, що, як правило, домінують); поодинокі мультиалельні (один локус з

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників багатьма кодомінантними алелями, що контролюють стійкість проти різних видів і рас патогена); зчеплені (велике число ді- або мультиалельних локусів, що зчеплені й утворюють блок фенотипово схожих генів, що визначають стійкість проти однієї або кількох хвороб).

Завдання 1. Знайти інформацію про гени стійкості до шкідливих організмів певного виду рослини

Виберіть вид рослини, визначте основні хвороби та шкідників, які є поширеними у вашій місцевості, знайдіть інформацію про гени стійкості рослин (база даних генів стійкості рослин (PRGdb; <http://prgdb.org>).

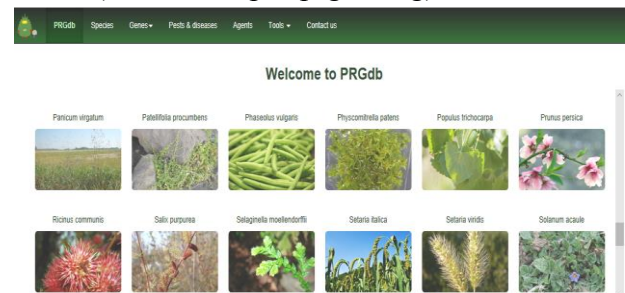


Рис. 4.6.1. Сайт бази даних генів стійкості рослин (PRGdb; <http://prgdb.org>)

Знайдені дані оформити у вигляді декількох слайдів презентації.

Ознайомлення з молекулярними маркерами для виявлення стійких форм соняшнику до вовчка (за Солоденко, 2011)

Мета: ознайомлення з ідентифікацією мікросателітних маркерів гена *Or3*, який визначає стійкість соняшнику до вовчка раси С

Довідковий матеріал. Гібриди соняшнику обов'язково повинні мати стійкість до рослини-паразита – вовчка (*Orobancha crotanensis* Wallr.). Створення інбредних ліній з генетичною стійкістю до вовчка є основною запорукою захисту від поширення паразита та ураження гібридів. Вовчок є рослиною з високим рівнем генетичної мінливості, з чим пов'язана постійна поява нових більш патогенних рас паразита. На даний час в

Розділ 4

Україні вовчок представлений в основному расою С. В Європі ідентифіковані раси D, E, F, стійкість до яких детермінована окремими генами *Or*. Більшість досліджень підтверджено моногенно-домінантне успадковування стійкості до рас А – Е. Дослідження з генетики стійкості дозволяють вважати, що гени *Or* формують кластер.

За останні роки створено значну кількість ДНК-маркерів для використання у генетико-селекційних програмах. Саме мікросателітні послідовності геномів рослин є найбільш привабливими з точки зору їх застосування в MAS-технологіях. Стійкість соняшнику до вовчка являє собою майже «ідеальну модель» для молекулярної селекції.



Рис. 4.6.2. *Orobanche cumana* (<http://www.agroatlas.ru/>)

Підтвердженням тому є низка розроблених RFLP, RAPD та SCAR маркерів. Аналіз поліморфізму довільно ампліфікованої ДНК рослин популяцій F₂ дозволив ідентифікувати п'ять охарактеризованих за своєю послідовністю SCAR-маркерів гена стійкості до вовчка раси Е (*Or5*), що зчеплені з ним на відстані від 5,6 до 22,5 сМ. Розробка молекулярно-генетичної карти геному соняшнику, що вміщує більш ніж тисячу мікросателітних локусів, дозволила спрямувати дослідження з ефективного ДНК-маркування генів стійкості *Or* у напрямі використання SSR маркерів. Маркерний до *Or5* фрагмент ампліфікації UBC120_660, отриманий за допомогою довільно праймованої полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та картований на третій групі зчеплення (LG 3) генетичної карти

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників соняшнику, сконцентрував увагу дослідників на мікросателітних послідовностях з LG 3. За алелями чотирьох мікросателітних локусів, що картовані на LG 3, розрізнили контрастні за станом гена *Or5* рекомбінантні інбредні лінії, отримані від схрещування двох комерційних генотипів соняшнику, що належать Pioneer Hi-Bred International.

Завдання 1. Ознайомитись із ідентифікацію мікросателітних маркерів гена *Or3*, що визначає стійкість соняшнику до вовчка раси С

Матеріалом для досліджень були 13 інбредних ліній (Оранж, Одол 1, Одеська 391, Одеська 973, Одеська 1318, Одеська 1295, материнські та батьківські форми гібридів Сівер, Ковчег, Ной, Етюд, Дарій) та 29 гібридів, занесених до Реєстру сортів рослин України 2008 р.: Одор, Олівер, Сапфір (селекції Селекційно - генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення НААНУ, Одеса); Карат, Сівер, Ясон, Всесвіт, Дарій, Етюд, Ковчег, Ной, Оскіл, Псьол (Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААНУ, Харків); Оберіг, Славутич (Незалежна аграрна індустрія, Запоріжжя); Лакомка, Мастер, Роднік, Флагман (Агро-Інтер, Київ); Онікс, Час (НАУ, Суми); Златибор, Сержан (Нові Сад, Югославія); Іберіко, Латіно (Лімагрейн, Франція); ПР 64 Г 91 (Піонер Холдінг, Австрія); Тайфун (ДНУ, Росія); Макао (Маїсадур, Франція); КВС Гелія 06 (КВС, Німеччина); а також лінії селекції Інституту олійних культур НААНУ (ІОК, Запоріжжя) ВА 1 та К 811, контрастні за стійкістю до вовчка (раса С), та популяція F₂ (ВА 1 x К 811). Для тестування стійкості батьківських форм, а також окремих рослин F₂ і F₃ до вовчка раси С використовували метод (Панченко, 1975). Рослини соняшнику заражували вовчком у ящиках (6×40×15 см) з ґрунтово-пісчаною сумішшю. Оцінку проводили на 25-й день після сходів за інфекційного навантаження 0,2 г насіння вовчка на 1 кг субстрату. Рослини вирощували в умовах 16-годинного світлового

Розділ 4

дня за температури 24-28°C протягом дня та 18-23°C вночі. За результатами тестування вибірок насіння кожної родини F₃ відносили вихідні стійкі рослини F₂ до гомо- та гетерозиготних за локусом *Or3*. Виділення рослинної ДНК, ПЛР-аналіз із використанням праймерів, що фланкують мікросателітні послідовності, електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації та документування результатів проводили згідно з (Саналатий и др., 2006). Інформацію про нуклеотидні послідовності праймерів для аналізу мікросателітних локусів, які локалізовані на третій групі зчеплення генетичної карти геному соняшнику, отримали з бази даних (Tang, Knapp, 2003). Для ампліфікації ДНК використовували праймери, синтезовані у відділі молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру.

Таблиця 4.6.3. Алелі, що виявлені у досліджених інбредних ліній, за мікросателітними локусами, п.н. (Солоденко, 2011)

Генотип	Локус		
	ORS820	ORS683	ORS1036
Оранж	237	350	252
Одол 1	237	350	252
Одеська 391	237	350	252
Одеська 973	237	350	252
Одеська 1318	237	350	252
Одеська 1295	237	350	252
Материнська форма гібрида Сівер	237	350	242
Материнська форма гібрида Ковчег	237	350	242
Материнська форма гібрида Ной	237	350	242
Материнська форма гібрида Етюд	237	350	242
Материнська форма гібрида Дарій	237	350	242
Батьківська форма гібридів Етюд, Сівер, Ковчег, Ной	219	350	252
Батьківська форма гібрида Дарій	237	350	252
ВА 1	237	350	242
К 811	237	357	252

Дослідження гібридів та інбредних ліній соняшнику різного походження з контрастним проявом стійкості до вовчка раси С проводили за SSR локусами ORS1036, ORS1040, ORS1112, ORS683, ORS1130, ORS820, які, за даними Tang et al. (2003), картовані на LG3 на відстані не більш ніж 20,1 сМ від *Or5*. Проаналізовані генотипи не розрізнялись за алелями мікросателітних локусів ORS1040, ORS1130 та ORS1112.

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

Таблиця 4.6.4. Алелі, що виявлені у досліджених гібридів, за мікросателітними локусами, п.н. (Солоденко, 2011)

Генотип	Локус		
	ORS820	ORS683	ORS1036
Час	237	350	242-252
Славутич	237	350	242-252
Карат	237	350	242-252
Латіно	237	350	242-242
Онкс	237	350	242-252
Іберіка	237	350	242-252
Оберіг	219-237	350	242-252
Сапфір	237	350	242-252
Ясон	237	350	242-252
Весвіт	237	350	242-252
Сержан	237	350	242-252
Оскіл	219-237	350	242-252
Псьол	237	350	242-252
Роднік	237	350	242-252
Олівер	237	350	242-252
ПР64Г	237	350	242-252
Загибор	237	350	242-252
Тайфун	237	350	242-252
КВС Гелія	237	350	242-252
Лакомка	237	350	242-252
Мастер	237	350	242-252
Флагман	237	350	242-252
Одор	237	350	242-252
Дарій	237	350	242-252
Етюд	219-237	350	242-252
Сівер	219-237	350	242-252
Ковчег	219-237	350	242-252
Ной	219-237	350	242-252
Макао	237	350	242-252

У контрастних за стійкістю генотипів соняшнику виявлено поліморфізм за локусами ORS820, ORS683 та ORS1036 (табл. 4.6.3, 4.6.4). За локусом ORS820 у батьківської форми гібридів Етюд, Сівер, Ковчег, Ной виявлено фрагмент 219 п.н., в інших досліджених 14 ліній – фрагмент 237 п.н. (рис. 4.6.3). Серед досліджених простих гібридів соняшнику гетерозиготними за даним локусом виявилися Етюд, Сівер, Ковчег, Ной, Оскіл, Оберіг (алелі 219 та 237 п.н.). У досліджених ліній та гібридів соняшнику за локусом ORS683 показано наявність двох алелів: у лінії К 811 – алель 357 п.н., у всіх інших генотипів – алель 350 п.н.



Рис. 4.6.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній соняшнику за локусом ORS820. 1 – Оранж; 2 – Одол 1; 3 – Одеська 391; 4 – батьківська форма гібридів Етюд, Сівер, Ковчег, Ной; 5 – батьківська форма гібрида Дарій; 6 – материнська форма гібрида Сівер; 7 – материнська форма гібрида Ной; 8 – материнська форма гібрида Етюд; 9 – материнська форма гібрида Ковчег; 10 – материнська форма гібрида Дарій; 11 – Одеська 973; 12 – Одеська 1318; 13 – Одеська 1295; 14 – ВА 1; 15 – К 811 (Солоденко, 2011)

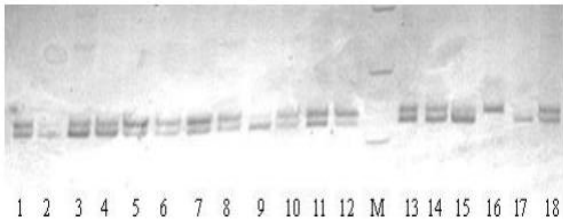


Рис. 4.6.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній та гібридів соняшнику за локусом *ORS1036*. 1 – Одор; 2 – Латіно; 3 – Олівер; 4 – Санфір; 5 – Дарій; 6 – Етюд; 7 – Ковчег; 8 – Лакомка; 9 – материнська форма гібрида Ковчег; 10 – Сержан; 11 – Тайфун; 12 – Макао; 13 – Іберіко; 14 – Ной; 15 – материнська форма гібриду Ной; 16 – К 811; 17 – ВА 1; 18 – КВС Гелія 06; М – маркери молекулярної маси (Солоденко, 2011)

За локусом *ORS1036* виявлено поліморфізм у досліджених генотипів соняшнику, зокрема у інбредних ліній ВА 1 та К 811 (рис. 4.6.3, 4.6.4). Ампліфікація ДНК батьківських ліній ВА 1 та К 811, контрастних за стійкістю до вовчка раси С, за мікросателітним локусом *ORS1036* дозволила отримати алелі 242 п.н. та 252 п.н., відповідно. Серед 50 рослин популяції F_2 у восьми з десяти стійких гомозиготних рослин ідентифіковано аллель 242 п.н., який є характерним для стійкої батьківської лінії ВА 1; у 19 з 21 нестійкої гомозиготної рослини – аллель 252 п.н., характерний для нестійкої батьківської лінії К 811. Виявлено чотири рекомбінантних рослини F_2 . Стійкі до вовчка рослини F_2 розподілені на гомо (*Or3Or3*) та гетерозиготні (*Or3or3*) за результатами тестування стійкості рослин з відповідних родин F_3 . Для всіх рослин F_2 з генотипом *Or3or3* за мікросателітним локусом *ORS 1036* показано наявність двох алелів: 242 п.н. та 252 п.н. Обмежена кількість рослин популяції не дозволила виявити всі фенотипні класи рекомбінантів та провести гібридологічний аналіз. Проте, дані генотипування за локусом *ORS 1036* та фенотипового прояву стійкості до вовчка раси С, отримані для рослин популяції F_2 , дозволяють вважати певні алелі мікросателітного локусу *ORS 1036* асоційованими з проявом стійкості до вовчка раси С. Маркуючу здатність мікросателітного локусу *ORS1036* перевірено на 13 інбредних

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників ліній та 29 гібридах. Встановлено алельний склад досліджених генотипів за локусом *ORS1036*. За винятком гібрида Латіно, усі інші виявилися гетерозиготними (алелі 242 та 252 п.н.), що відповідає очікуваному, оскільки селекція вихідних форм для створення гібридів ведеться таким чином, що якнайменше одна похідна форма гібрида повинна бути стійкою до вовчка. Для всіх батьківських ліній показано гомозиготний стан локусу *ORS1036* (алель 252 п.н., що є маркерним щодо алеля *or3*). Материнські лінії гібридів Одол 1, Одеська 391, Одеська 973 виявили наявність алеля 252 п.н. за локусом *ORS1036*. Для інших материнських форм гібридів показано наявність у гомозиготному стані алеля 242 п.н., що є маркером до алеля *Or3*. Таке сполучення маркерного алеля та алеля гена, що контролює стійкість до вовчка, є цілком очікуваним, оскільки при селекційному створенні материнських форм гібридів соняшнику обов'язковим є наявність у генотипі материнської лінії гена стійкості *Or3* в гомозиготному стані. У 90,7 % проведених тестувань мікросателітний маркер *ORS1036* виявився ефективним, оскільки для 39 генотипів з 42 не виявлено невідповідностей у сполученні маркер – ознака.

Питання до самоконтролю:

- Автор концепції спорідненої еволюції рослини-живителя та паразита на їх спільній батьківщині?
 - М.І. Вавилов
 - П.М. Жуковський
 - І.І. Мечников
 - Т.Д. Страхов
- Який ген контролює стійкість кукурудзи до раси 1 *Helminthosporium maydis*?
 - Pto*
 - Xo21*
 - Hm1*
 - Rpp5*

Розділ 4

3. Яка стійкість зумовлена багатьма малими генами, дія яких спрямована проти всіх рас патогена?

- а) горизонтальна
- б) вертикальна
- в) індукована
- г) расоспецифічна

4. Флор сформулював гіпотезу "ген проти гена" на основі вивчення генетичної взаємодії рослини-живителя і патогена у системі...

- а) кукурудза – *Puccinia sorhi*
- б) пшениця – *Blumeria graminis*
- в) соняшник – *Puccinia helianthi*
- г) льон – *Melampsora lini*

5. Основний недолік вертикальної стійкості рослин.

- а) низький рівень стійкості
- б) нетривала дія
- в) залежність від метеоумов
- г) складність визначення успадкування

6. Який характер успадкування спостерігається у більшості випадків стійкості зернових культур до іржі, борошнистих рос та сажкових хвороб?

- а) домінуючий
- б) неповне домінування
- в) рецесивний

7. Два гени - модифікатори в ячмені, які потрібні для прояву гена стійкості до борошнистої роси *Mla₁₂*.

- а) *Rar1* і *Rar2*
- б) *Hm1* і *Hm0*
- в) *Xo21* і *Xo22*
- г) *Lr27* і *Lr31*

8. *Mla*-локус контролює стійкість ячменю до збудника

- а) борошнистої роси
- б) сітчастої плямистості
- в) летючої сажки
- г) кореневої гнилі

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

9. У яку рослину ефективно перенесли *N*-ген стійкості до ВТМ з тютюну?

- а) томат
- б) соняшник
- в) пшеницю
- г) кукурудзу

10. Великі кластери генів виявлені у томата до збудника

- а) бурі плямистості (кладоспоріозу)
- б) септоріозу
- в) фітофторозу
- г) альтернаріозу

Тема 4.7. Генетика патогенності збудників

рослин



Завдяки розвитку методів молекулярної біології з'явилась можливість вивчення механізмів патогенності. З одного боку вивчаються фактори вірулентності і агресивності, мінливості і еволюції паразитів, а з іншого боку накопичується інформація про механізми стійкості рослин.

Еволюційні процеси у популяціях мікроорганізмів спрямовані у бік вдосконалення ознаки вірулентності для подолання генів стійкості рослин та агресивності – для збільшення популяції.

4.7.1. Генетичний аналіз вірулентності.

Генетична диференціація заснована на концепції «ген-на-ген» і передбачає взаємодію ізоляту або раси з сортами-диференціаторами або лініями з точно відомими генами стійкості.

Вперше цей принцип використали Блек зі співавторами (1953) для ідентифікації збудника фітофторозу картоплі *Phytophthora infestans*. Сорти-диференціатори містили різні гени стійкості і їх сукупність. Відповідно до

Розділ 4

цієї шкали расою 0 позначені ізоляти, вірулентні для універсально-сприйнятливого сорту, рецесивного за всіма генами стійкості. У позначенні інших рас уведені номери генів стійкості, до яких ізолят вірулентний окрім універсально-стійкого сорту. Наприклад, ізолят 1.2 вірулентний до диференціаторів і сортів з генами *R1* й *R2*, а також з групою генів *R1R2* і т.д.

Для опису вірулентних властивостей рас Грін запропонував застосовувати *формулу вірулентності*, у якій у чисельнику наводять гени авірулентності патогена, що відповідають ефективним генам стійкості рослин, а в знаменнику – гени вірулентності (комплементарні перебореним генам стійкості). Наприклад, звичайну для Канади расу C18 можна описувати формулою вірулентності: *Sr6,8,9a,9b, 13,15/5,7,9,10,11,14,16*. Це означає, що раса C18 авірулентна до сортів, що мають гени *Sr6, Sr8, Sr9a, Sr9b, Sr13, Sr15*, і вірулентна до сортів з генами *Sr5, Sr7, Sr9, Sr10, Sr11, Sr14, Sr16*. Формула вірулентності показує, що для створення стійких сортів потрібно використати гени, що перебувають у чисельнику дробу.

4.7.2. Застосування молекулярних методів дослідження. Завдяки розвитку молекулярної біології з'явилась можливість перейти до вивчення механізмів вірулентності на молекулярному рівні.

Історія використання молекулярних методів дослідження популяції збудника бурої іржі пшениці.

RAPD аналіз (випадково ампліфікована поліморфна ДНК). Даний метод заснований на полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР) ДНК організму з випадковими короткими (10 н.п.) олігонуклеотидами (праймерами) з подальшим фракціонуванням ампліфікованих фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу. Для RAPD аналізу достатньо дуже малої кількості ДНК (вимірюваного в нг), яка не потребує додаткового очищення. Також не потрібно

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників знання нуклеотидної послідовності ДНК, яка тестується, для конструювання праймерів, оскільки використовують праймери з випадковою нуклеотидною послідовністю. RAPD-метод дозволяє оцінити велику кількість ізолятів за порівняно короткий час. RAPD маркери для вивчення популяцій *P. trititcina* вперше були використані у Північній Америці у середині 1990 років. Було підтверджено припущення про наявність у Канаді двох географічних популяцій патогена, яке виникло за результатами багаторічного моніторингу вірулентності. З 1995-2000 рр. аналогічні дослідження показали різну ступінь подібності між популяціями з Австралії, Нової Зеландії, Європи, Америки, Азії та Африки. Російські популяції збудника бурої іржі з Північно-Кавказького регіону, вивчені О. А. Кудіновою з використанням трьох RAPD праймерів (UBS 450, UBS 517 і OPA 18), виявились поліморфними.

О.І. Гультяєва та ін. дослідили російські популяції *P. trititcina* з семи регіонів РФ з використанням шести RAPD і одного УП праймера. Порівняли результати молекулярних досліджень популяції з вивченням її вірулентності. Так, за даними двох аналізів високий рівень подібності мали популяції Західного Сибіру і Уралу, що пояснювалось вирощуванням у цих регіонах генетично подібних сортів. Центральноєвропейські популяції збудника найбільше відрізнялись від інших.

AFLP аналіз. Висока чутливість RAPD маркерів до змін умов реакцій і можливість порівняння тільки фрагментів ампліфікації з однієї ПЛР реакції є обмеженням для широкого використання даного методу в популяційних дослідженнях. На початку 2000-х років для аналізу популяції збудника бурої іржі був використаний AFLP аналіз (поліморфізм довжин ампліфікованих ДНК-фрагментів). AFLP маркери, як і RAPD, відносяться до групи домінантних маркерів. Перевагою AFLP, у порівнянні з RAPD, є відтворюваність результатів і рівень виявлення поліморфізму.

Розділ 4

Однак для його проведення потрібні більш дорогі витратні матеріали. F.J. Keiper та ін. порівняли інформативність молекулярних маркерів отриманих методами, заснованими на ПЛР (AFLP, SAM (селективно ампліфіковані сателіти), S-SAP (поліморфізм специфічно ампліфікованих послідовностей ДНК)) для ідентифікації видів іржастих грибів та вивчення їх внутрішньопопуляційного різноманіття. Був зроблений висновок, що всі маркери задовільно диференціювали види грибів, однак різноманітність всередині груп ізолятів одного виду, яку визначили всіма цими методами, була низькою. З використанням AFLP маркерів проведені обмежені дослідження популяцій *P. triticina* у Канаді, у Німеччині та Ефіопії, Ірані. Через дорожнечу та методичні складнощі, які можуть обмежити відтворюваність результатів за проведення AFLP-аналізу, даний метод не отримав масового застосування у популяційних дослідженнях збудника бурої іржі пшениці.

Мікросателітний аналіз (SSR).

Найбільший прорив у молекулярних дослідженнях *P. triticina* стався в 2003–2007 рр., чому сприяло секвенування ДНК декількох ізолятів гриба, виявлення мікросателітних повторів у геномі патогена і конструювання на основі цього SSR-праймерів, ефективних у визначенні внутрішньовидового поліморфізму популяцій даного патогена. SSR (мікросателітні) маркери є кодомінантними і можуть виявляти відмінності між гомозиготними і гетерозиготними генотипами, порівняно з RAPD і AFLP-маркерами. З використанням підібраних SSR-маркерів був вивчений молекулярний поліморфізм популяцій *P. triticina* у Північній і Південній Америці, Західній Європі Середній і Центральній Азії і Закавказзі. Результатом цих досліджень у Північній і Південній Америці було визначення джерела первинної появи гриба на двох континентах і напрямків його подальшого поширення, а також оцінка впливу генетично різнорідних сортів пшениці на диференціацію популяцій гриба. Отримані дані дозволили охарактеризувати мікроеволюцію *P.*

Genetica імунітету до збудників хвороб і шкідників triticina на території Північно- та Південноамериканського континентів і розробити комплексну стратегію захисту пшениці від бурої іржі. Дослідження західно-європейських популяцій дозволили оцінити вплив генетично різнорідних сортів пшениці, які вирощуються у різних країнах Європи, на молекулярно-генетичну мінливість популяції, визначити шляхи міграції ізолятів у Європі та за її межами. Було показано можливе занесення спор патогена у Західну Європу з Близького Сходу. Підтверджено високу схожість по мікросателітним локусам між зразками кавказьких популяцій з території Азербайджану, Грузії і Вірменії, і їх спорідненість з середньоазіатськими популяціями. Популяції Північного і Південного Казахстану диференціювалися від кавказьких і середньоазіатських, що обумовлено наявністю географічного бар'єру (Тянь-Шанських гір), який перешкоджає занесенню спор на територію Казахстану.

Значення індексів генетичних відстаней між російськими популяціями (F_{st} , R_{st} , K_{Bm}) по мікросателітним маркерам вказували на диференціацію ізолятів *P. triticina* за географічним походженням на три групи: 1) західноазіатські, 2) європейські, 3) північнокавказькі. Північнокавказькі ізоляти з Краснодарського і Ставропольського країв характеризувалися меншими відмінностями з європейськими, ніж дагестанські. Проведений аналіз підтвердив раніше висунуте на підставі аналізу вірулентності припущення про наявність у Росії декількох популяцій гриба.

Вивчення поліморфізму популяції колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Центром походження колорадського жука (*L. decemlineata*) вважають територію, обмежену східними схилами Скелястих гір і північними районами сучасної Мексики. Ареал виду за 150 років розширився більш ніж у 3 тис. разів. На 2009 р ареал жука в Північній Америці, Європі та Азії становив понад 16 млн. км² проти початкових 5 тис. км². Колорадський жук характеризується значним

Розділ 4
внутрішньовидових поліморфізмом і екологічною пластичністю.

Методом RFLP було покладено початок вивченню поліморфізму мітохондріальної ДНК (мтДНК) *L. decemlineata* (Azeredo-Espin et al., 1996). При цьому рестрикції 15 ферментами піддавались препарати очищеної мтДНК з популяцій США і Мексики. Розмір мтДНК попередньо оцінений в 20 т.п.н. Три рестриктази (EcoRI, HpaI і PstI) дозволили дискримінувати поліморфізм мтДНК: було виділено 16 мітотипів, у тому числі один мітотип, характерний для гетероплазмії. Найбільшим поліморфізмом відрізнялась популяція з Техасу, в якій зустрічалось 14 мітотипів, найменшим – популяції з Вашингтона, Огайо і Майна – за 1 мітотипом. У двох популяціях (Техасу і Меріленду) зустрічалися особини з наявністю гетероплазмії.

У роботі з аналізу ядерного генома колорадського жука **методом AFLP** було отримано 297 фрагментів довжиною від 50 до 220 п.о. (Grapputo et al., 2005), з них 99% були поліморфними. Кластеризація на основі генетичних відстаней D показала як наявність значної віддаленості європейських популяцій від північноамериканських, так і наявність двох добре диференційованих груп серед європейських зразків – західних (Іспанія, Франція, Італія) і східних (Польща, Естонія, Фінляндія і Росія) груп популяцій. Європейські популяції характеризувались деяким зниженням рівня поліморфізму – 48% проти 67% поліморфних локусів у північноамериканських популяціях, а також меншим значенням очікуваної гетерозиготності.

Існує поки тільки одна робота, яка поклала початок вивченню **мікросателітних повторів** у геномі колорадського жука (Grapputo, 2006). Було виділено 11 мікросателітних повторів, які були поліморфними у популяціях колорадського жука (проаналізовані вибірки з популяцій Росії, Естонії та США). Так, мікросателітний локус

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників
LdAC5-22 (GenBank Ass. No DQ424877) у геномі колорадського жука може бути представлений числом від 2 (TCGT-TCGT) до 5 повторів (TCGT-TCGT-TCGT-TCGT-TCGT) і варіюватись при ампліфікації у ПЛР від 147 до 160 п.н. у довжину.

Практичний блок

Ідентифікація рас *Cladosporium fulvum* (син. *Passalora fulva*) – збудника кладоспоріозу томату

Мета: навчитися визначати раси шляхом генетичного аналізу вірулентності

Довідковий матеріал. Поняття фізіологічних рас було введено Барусом у 1911 р. **Фізіологічні раси** – це спеціалізовані форми збудників хвороб, що відрізняються своєю здатністю паразитувати на певних генотипах (сортах) рослини. З виявленням фізіологічних рас зрозуміли явище втрати сортами стійкості до збудників хвороб.

Таким чином, епіфітотія хвороб на сортах, які були стійкими у даному регіоні, свідчить про появу нової, більш агресивної фізіологічної раси збудника. З іншого боку, зараження стійких сортів при їх вирощуванні в іншому регіоні свідчить не про зміну імунітету під впливом зовнішніх умов, як вважалося раніше, а про наявність у цьому регіоні інших фізіологічних рас, які є вірулентними до цього сорту.

Ідентифікація фізіологічних рас складається з наступних етапів: отримання моноспорових ізолятів, визначення вірулентності ізолятів до набору диференціаторів та встановлення раси збудника. Генетична диференціація заснована на концепції «ген-до-гену» і передбачає взаємодію ізоляту або раси з диференціаторами або лініями з добре відомими генами стійкості.

Зміст завдання. Провести генетичний аналіз вірулентності *C. fulvum* (син. *P. fulva*) – збудника кладоспоріозу томату.

Розділ 4

Хід роботи.

1. Грибні культури (моноспорові ізоляти) висівають на КГА у чашки Петрі діаметром 9 см і культивують при 23 °С впродовж 14-21 днів у темних умовах.

2. Три або чотири рослини кожного генотипу томатів на етапах 4-5 справжніх листочків заражають ізолятами *P. fulva* шляхом обприскування приблизно 30 мл конідиальної суспензії (105 конідій / мл) під та на листки.



Рис. 4.7.1. Ідентифікація раси *C. fulvum* 2.5 (Altin, 2016)

3. Інокульовані рослини поміщають у скляні колби для підтримки 100% відносної вологості, а потім інкубують у камері росту при 23 °С впродовж 13–21 днів.

4. Інфіковані рослини оцінюють візуально як стійкі або сприйнятливі залежно від розвитку хвороби.

5. За даними оцінки заповнюють табл. 4.7.1.

Таблиця 4.7.1. **Визначення рас *C. fulvum***

Тест-сорт томату з певним геном стійкості	Раса <i>Cladosporium fulvum</i>		
	1 моноізолят-	2 моноізолят-	3 моноізолят-
Potentate None			
Stirling Castle I.M.B. 1 (Cf-1)			
Vetomold (Cf-2)			
V-121 (Cf-3)			
Purdue 135 (Cf-4)			
Moneymaker-Cf-5 (Cf-5)			
Ontario 7818 (Cf-6)			
Moneymaker-Cf-9 (Cf-9)			
Ontario 7716 (Cf-4, Cf-11)			

Питання до самоконтролю:

1. Чисельник – гени авірулентності патогена, що відповідають ефективним генам стійкості рослин, а в знаменнику – гени вірулентності. Це формула

- а) агресивності
б) вірулентності

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників
в) патогенності

2. До сортів з якими генами вірулентний ізолят *Phytophthora infestans* 1.2?

- а) *R4*
б) *R1R2*
в) *R1*
г) *R5*

3. Для цього аналізу достатньо дуже малої кількості ДНК та не потрібно знання нуклеотидної послідовності ДНК, яка тестується, для конструювання праймерів.

- а) *RAPD* аналіз
б) *AFLP* аналіз
в) мікросателітний аналіз (*SSR*)

4. Причина втрати сортами стійкості.

- а) зміна клімату
б) нова вірулентна раса
в) зміна технології вирощування культури

5. Генетичний аналіз вірулентності заснований

- а) на концепції «ген-до-гену»
б) на аналізі агресивності
в) на пошуку генів авірулентності

6. Якою буквою позначають сорти-диференціатори, які заражаються збудником за визначення рас?

- а) *S*
б) *R*
в) *T*
г) *N*

7. До сортів з якими генами вірулентний ізолят *Cladosporium fulvum* 2.5?

- а) *Cf-2*
б) *Cf-4*
в) *Cf-9*
г) *Cf-5*

8. Який сорт томату має *Cf-2* ген стійкості до збудника бурої плямистості?

- а) *Vetomold*
б) *Ontario 7818*

Розділ 4
в) *Potentate*
з) *Purdue*

9. Ген авірулентності

- а) *Avr9*
- б) *Cf-2*
- в) *R4*
- з) *Sr6*

10. Який молекулярний метод виявляється найбільш ефективним для вивчення популяцій *P. triticina*?

- а) *RAPD* аналіз
- б) *AFLP* аналіз
- в) мікросателітний аналіз (*SSR*)
- з) *AP-PCR*.

1. Гордеева Е.И., Крюкова А.В., Курбатова З.И. Иммуниет растений: учебное пособие. Великие Луки, 2011. 127 с.

2. Гульятяева Е.И., Казарцев И.А. Молекулярно-генетические подходы в изучении популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы. *Вестник защиты растений*. 2018. 2(96). С. 5–12

3. Імунітет рослин: Підручник / МД. Євтушенко, М.П. Лісовий, В.К. Пантелеев, О.М. Слюсаренко; за ред. М.П. Лісового. К.: Колобіг, 2004. 304 с.

4. Курченко И.Н. Амилолитическая активность штаммов *Fusarium Lk:Fr.* и *Alternaria Nees:Fr.* *Мікробіологічний журнал*. 2012. Т.74. № 3. С. 36–43.

5. Кокаева Л.Ю. Микобиота поражённых листьев *Solanum tuberosum L.*, *S. lycopersicum L.* и *S. dulcamara L.* : дис. ... кандидата б. наук : 03.02.12 / Московский гос. ун-т им. М.В. Ломоносова. Москва, 2016. 197 с.

6. Лемеза Н.А. Сидорова С.Г. Иммуниет растений: практикум для студентов биол. фак. Минск: БГУ, 2008. 96 с.

7. Общая и молекулярная фитопатология: Учеб. пособие / Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. М.: Изд-во Общества фитопатологов, 2001. 302 с.

8. Панченко А.Я. Ранняя диагностика заразиоустойчивости при селекции и улучшающем семеноводстве подсолнечника. *Вестник с.-х. науки*. 1975. № 2. С. 107–115.

9. Плотникова Л.Я. Иммуниет растений и селекция на устойчивость к болезням и вредителям. М.: Колос, 2007. 359 с.

10. Саналатий А., Солоденко А., Сиволап Ю. Идентификация генотипов подсолнечника украинской селекции с помощью *SSRP*-маркеров. *Цитология и генетика*. 2006. Т. 40, № 4. С. 37–43.

11. Солоденко А.Є. Оцінка стійкості соняшнику до вовчка раси С за допомогою молекулярних маркерів. *Вісник Харківського*

Розділ 4

національного аграрного університету. Серія Біологія. 2011. Вип. 3 (24). С. 61–66.

12. Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Популяционная генетика колорадского жука: от генотипа до фенотипа. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Том 15. № 1. С. 156–172.

13. Шамрай С.Н. Гены устойчивости растений: молекулярная и генетическая организация, функция и эволюция. Журнал общей биологии. 2003. Том 64, № 3. С. 195–214.

14. Altin N. Identification of race 2.5 of leaf mold (*Passalora fulva*, syn. *Cladosporium fulvum*) on tomato. *J. Plant. Dis. Prot.* 2016, 123. P. 279–284.

15. Azeredo-Espin A.M.L., Schroder R.F.W., Roderick G.K. et al. Intraspecific mitochondrial DNA variation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biochem. Genet.* 1996. V. 34. № 7/8. P. 253–268.

16. Bebber D. P., Ramotowski M. A. T., and Gurr S. J. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nat. Clim. Chang.* 2013. 3. P. 985–988.

17. Dinglasan E., Hickey L., Ziems L., Fowler R., Anisimova A., Baranova O., Lashina N., Afanasenko O. Genetic characterization of resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in the international barley differential canadian lake shore. *Frontiers in Plant Science.* 2019. Vol. 10. P. 326.

18. Grapputo A. Development and characterization of microsatellite markers in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Mol. Ecol. Notes.* 2006. № 6. P. 1177–1179.

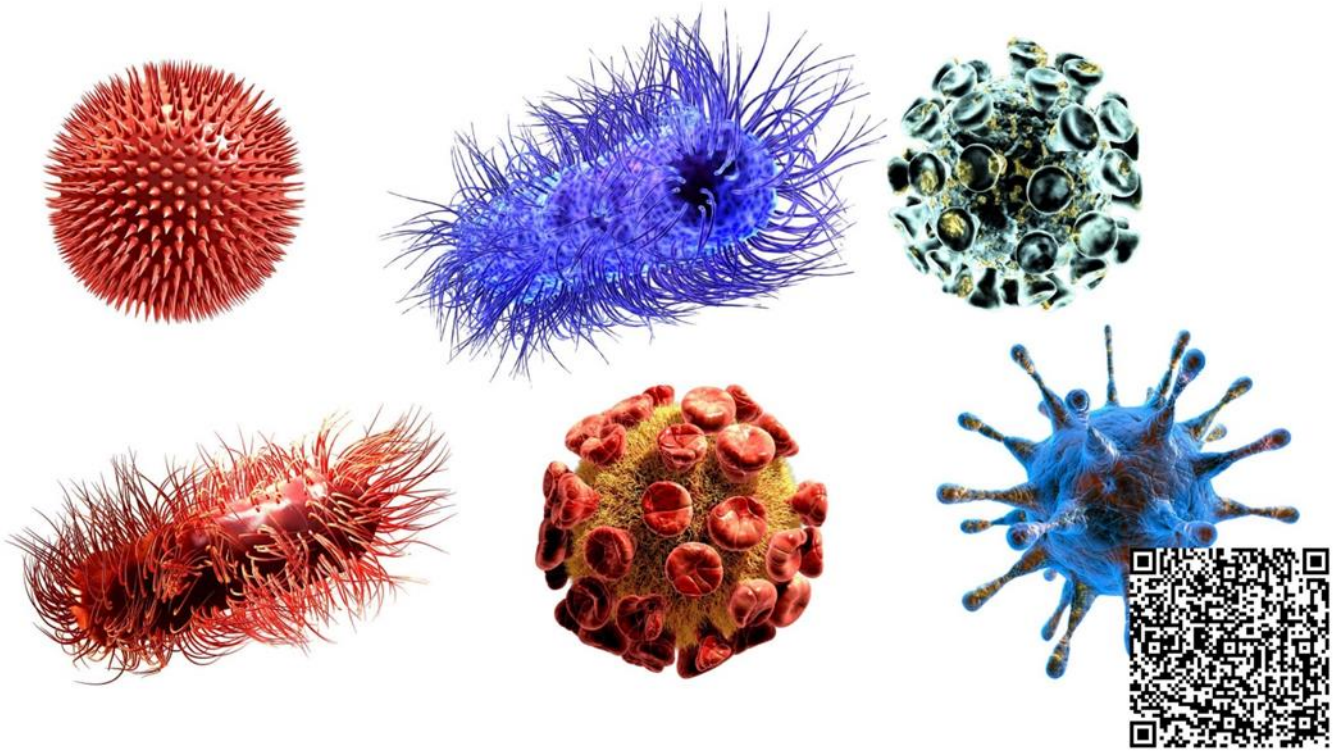
19. Grapputo A., Boman S., Lindström L. et al. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle population. *Mol. Ecol.* 2005. № 14. P. 4207–4219.

20. Kubota M. et al. First occurrence of tomato leaf mold caused by the novel races 2.5.9 and 4.5.9 of *Passalora fulva* in Japan. *Journal of General Plant Pathology.* 2015. 81. P. 320–323.

Генетика імунітету до збудників хвороб і шкідників

21. Oerke E. C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 2006. 144. P. 31–43.

22. Tang S., Knapp S. J. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild population of cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 990–1003.



5

МОЛЕКУЛЯРНА ВІРУСОЛОГІЯ

Розділ 5

Тема 5.1. Історія розвитку вчення про віруси і введення в вірусологію



5.1.1. Предмет вірусології, її місце серед біологічних наук. Вірусологія – наука про віруси – мікроскопічні надмолекулярні структури, які є інфекційними агентами.

Виникнувши у кінці XIX століття як гілка патології людини і тварин, з одного боку, і фітопатології – з іншого, вірусологія стала самостійною наукою, що займає одне з основних місць серед біологічних наук.

Загальна вірусологія вивчає природу вірусів, їх будову, реплікацію, біохімію, генетику. Медична, ветеринарна і сільськогосподарська вірусологія досліджують патогенні віруси, їх інфекційні властивості, розробляє заходи попередження, діагностики і лікування захворювань, що викликаються ними. Вірусологія вирішує фундаментальні і прикладні задачі і тісно пов'язана з іншими науками. Відкриття і вивчення вірусів, зокрема бактеріофагів, внесло величезний вклад в становлення і розвиток молекулярної біології. З молекулярною біологією також тісно пов'язані питання реплікації вірусів. Розділ вірусології, що вивчає спадкові властивості вірусів, тісно пов'язаний з молекулярною генетикою. Віруси є не лише об'єктом вивчення, але і інструментом молекулярно-генетичних досліджень, що зв'язує вірусологію з генетичною інженерією.

Проте на кінець 19-го століття з'ясувалося, що низка захворювань людини, таких як сказ, віспа, грип, жовта лихоманка є інфекційними, проте їх збудники не виявлялися бактеріологічними методами. У 1890 р. на X конгресі гігієністів Р. Кох вимушений був заявити, що «при перерахованих хворобах ми маємо справу не з бактеріями, а з організованими збудниками, які належать до зовсім іншої групи мікроорганізмів». Таким

Молекулярна вірусологія

чином, була сформульована думка про існування групи збудників інфекційних захворювань небактеріальної природи. Залишалося експериментально довести їх існування. Успіх був досягнутий не в царині інфекційних хвороб людини і тварин, а в галузі інфекційних хвороб рослин, тобто у фітопатології. Посадкам тютюну значної шкоди завдавало захворювання, що викликало мозаїчність листя. У 1886 р. німецький вчений *Адольф Майер*, що працював в Голландії, показав, що сік рослин, хворих на мозаїчну хворобу, при іноку-ляції викликає у здорових рослин таке ж захворювання. В цей же час мозаїчною хворобою тютюну займалися вчені Російської імперії, серед яких був *Дмитро Йосипович Івановський*. Працюючи у Микитському ботанічному саду, Івановський показав, що сік хворих рослин тютюну, пропущений через свічку Шамберлана (рис. 5.1.1), яка затримувала усі відомі бактерії, залишається інфекційним. Прогрівання соку при 60–70 °С позбавляло його інфекційності, що свідчило про біологічну природу збудника. Результати роботи *Д. Й. Івановського* були опубліковані в книзі «Про дві хвороби тютюну» в 1892 році. Цей рік і вважається роком відкриття вірусів. Проте сам Івановський вважав, що збудник є бактерією, тільки дуже маленькою, і назвав такий тип збудників «бактерії, що фільтруються». У 1898 році голландець *Мартін Бейерінк* повторив експерименти по фільтрації екстрактів з рослин тютюну, які були уражені мозаїкою. Як і Івановський, Бейерінк показав, що фільтрація не допомагає утримати збудника захворювання тютюнової мозаїки на керамічних фільтрах, які мали найменші на той час пори і вважалися стандартом для ультрафільтрації розчинів від бактерійних організмів. Бейерінк також показав, що патоген здатний ре-продукуватися і поширюватися в клітинах хазяїна, але не може бути культивованим в розчині подібно до бактерій. Бейерінк уперше ввів поняття **вірус** для позначення особливої, небактерійної природи збудника. Бейерінк вважав, що вірус є

Розділ 5

якоюсь рідкою матерією і називав вірусний розчин *contagium vivum fluidum* – заразною живою рідиною. Слід зазначити, що Бейерінк визнавав пріоритет Івановського у факті відкриття вірусів.

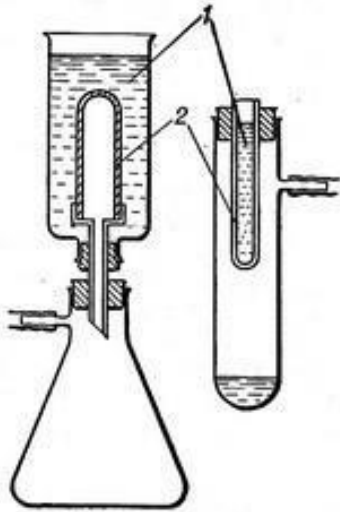


Рис. 5.1.1. Свічка Шамберлана. 1 - фільтрована рідина, 2 - свічка. Шарль Едуард Шамберлан (Ch. E. Chamberland, 1851-1908).

Латинське слово вірус (*virus*) означає отрута. Треба сказати, що на початку і середині 19 віків терміни «вірус» і «бактерія» використовували практично як синоніми; вірусом могли називати будь-який хвороботворний агент. Тільки після того, як стала зрозуміла природа бактерій, грибів, отрут і токсинів, термінами «ультравірус», а надалі просто «вірус» стали означати новий тип збудника, що фільтрується. Остаточо термін «вірус» укорінився в 30-і роки XX століття.

У кінці XIX – початку XX ст. основним методом ідентифікації вірусів був метод фільтрації через бактерійні фільтри (свічки Шамберлана), які використовувалися як засіб розділення збудників на бактерії і небактерії. З використанням здатності до фільтрації через бактеріологічні фільтри в цей час були відкриті ціла низка вірусів :

- 1892 р. – вірус тютюнової мозаїки;
- 1898 р. – вірус ящуру;
- 1899 р. – вірус чуми рогатої худоби;
- 1900 р. – вірус жовтої лихоманки;
- 1902 р. – вірус віспи птахів і овець;
- 1903 р. – вірус сказу;

Молекулярна вірусологія

- 1904 р. – вірус віспи людини;
- 1905 р. – вірус чуми собак;
- 1907 р. – вірус лихоманки денге;
- 1909 р. – вірус поліомієліту;
- 1911 р. – вірус саркоми Рауса;
- 1915 р. – віруси бактерій (бактеріофаги);
- 1916 р. – вірус кору;
- 1917 р. – вірус простого герпесу;
- 1926 р. – вірус везикулярного стоматиту;
- 1931 р. – вірус грипу свиней.

У 1931 р. в якості експериментальної моделі для виділення вірусів стали використовувати курячі ембріони, які мають високу чутливість до вірусів грипу, віспи, лейкозу, саркоми курей і деяких інших вірусів. Нині курячі ембріони широко використовують для виділення вірусів грипу.

У 1932 р. англійський хімік *В. Елфорд* створює штучні дрібнопористі колоїдні мембрани – основу для методу ультрафільтрації, за допомогою якого стало можливим проводити ви-значення розміру вірусних часток і диференціювати віруси за цією ознакою.

У 1935 році американський біохімік *У. Стенлі* вперше отримав чистий препарат вірусу тютюнової мозаїки у вигляді кристалічного білку. Оскільки приготованим з кристалів розчином білку можна було заразити рослини, Стенлі зробив висновок, що віруси складаються з білку.

У 1937 році англійські біохіміки *Ф. Боуден і Н. Пірі* знайшли помилку у визначенні *У. Стенлі* і встановили, що на 94% вірус тютюнової мозаїки складався з білку, а на 6% – з нуклеїнової кислоти. Таким чином, було встановлено, що вірус насправді є нуклеопротеїном.

У 1939 р. для вивчення вірусів уперше був застосований електронний мікроскоп, що започаткувало вивчення структури віріонів.

У 1949 р. була відкрита можливість культивування клітин тваринних тканин в штучних умовах, що надалі дозволило

Розділ 5

використати культури клітин тварин з метою культивування вірусів. Введення у вірусологію методу культури клітин стало важливою подією, що дала можливість отримання багатьох вакцин.

5.1.2. Визначення вірусів як особливих форм організації.

Після робіт Стенлі по кристалізації вірусів у формі білкових кристалів не вщухає дискусія, чи можна вважати віруси живими організмами? Віруси не є ані живими об'єктами, ані організмами; вони не мають більшості властивостей, які біологи вважають притаманними живим організмам, таких як здатність отримувати і запасати енергію, або обумовлена наявністю метаболічної активності автономність. Віруси не можуть самовідтворюватися, замість цього їх реплікує з використанням своєї метаболічної активності клітина, яку вони заразили. Таким чином, з боку вірусів їх відтворення є пасивним, а не активним, процесом. Реплікація вірусів складається з процесів копіювання, які виконують певні компоненти клітин хазяїна. Впродовж свого циклу реплікації вірус приймає різні форми, наприклад він може бути у вигляді вірусної частки поза клітиною хазяїна або у вигляді нуклеїнової кислоти, яка реплікується усередині клітини хазяїна. Такі характеристики, як розмір, форма, маса або хімічний склад вірус має тільки тоді, коли він представлений віріоном. Проте на інших стадіях циклу реплікації, наприклад коли ДНК вірусу вбудовується в хромосому хазяїна, ці характеристики втрачають сенс, і вірус набуває інших властивостей.

1. Віруси мають геном, що містить гени. Геном усіх живих організмів представлений дволанцюговою ДНК, проте геном вірусів може являти собою як ДНК, так і РНК, причому нуклеїнова кислота може бути у одноланцюговій або дволанцюговій формі. У загальному випадку геном вірусів набагато менше генома живої клітини.

Молекулярна вірусологія

2. Віруси є паразитами. Віруси відрізняються від клітин способом репродукції. Нові віріони утворюються в процесі реплікації, який здійснюється усередині клітини-хазяїна і включає синтез компонентів віріона, за яким йде їх збирання в готовий віріон. Таким чином, віруси є паразитами клітин, які залежать від своїх хазяїв у більшості своїх потреб.

3. Віруси можуть організувати свою реплікацію тільки усередині відповідних клітин хазяїв.

4. Реплікація вірусів зрештою зводиться до синтезу множинних копій їх білків і нуклеїнової кислоти, який повністю залежить від дії відповідних біохімічних систем клітини хазяїна і локалізується в сайтах, не відокремлених від вмісту клітини ліпопротеїновою мембраною.

5. Збирання нових вірусних часток відбувається за допомогою самозбирання (можливо при певній участі клітини хазяїна) наново синтезованих молекул нуклеїнової кислоти і білків вірусу.

6. Реплікація вірусів дає безперервний початок різним варіантам за допомогою змін в нуклеїновій кислоті.

5.1.3. Будова вірусів. Основні вірусологічні терміни. Вірусний геном пакується у білкову оболонку. Білки оболонки виконують важливі функції:

- захищають нуклеїнові кислоти від руйнування нуклеазами і механічних розривів;
- мають елементи ідентифікації, які дозволяють вірусам розпізнавати придатну для за-раження клітину (відсутні у вірусів рослин, які потрапляють в клітину через ушко-дження або безпосереднім введенням);

мають систему вивільнення генома, яка гарантує, що вірусний геном буде вивільне-ний з віріона тільки у потрібному місці в потрібний час

Окрім білкової оболонки, низка складніше влаштованих віріонів має ліпідний компонент, який є присутнім зазвичай на

Розділ 5

поверхні віріона і утворює ліпопротеїнову оболонку. Схематичне узагальнене зображення структури віріона наведено на рис. 5.1.2. Усередині віріона знаходиться одна або декілька молекул нуклеїнової кислоти — геном вірусу. Геном оточений білковими молекулами, які формують зовнішній чохол або футляр, що утворює замкнуту оболонку навколо нуклеїнової кислоти, який зветься **капсидом** (від лат. *capsa* – вмістище, ящик).

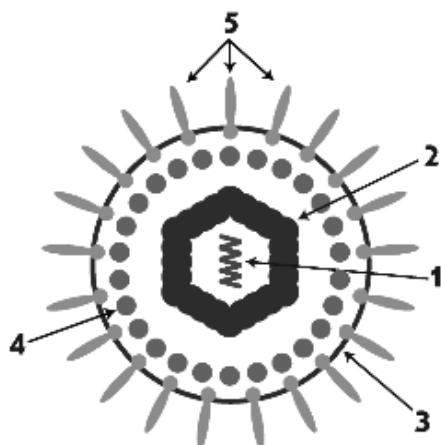


Рис.5.1.2. Схематичне зображення віріона. 1 - нуклеїнова кислота (геном вірусу); 2 - капсид (нуклеокапсид); 3 - ліпопротеїнова оболонка (суперкапсид, *непелос*); 4 - білкові молекули матриксу; 5 - білкові вирости на оболонці (*непеломери*, "шипи"). (Гудзь С. П., Перетятко Т. Б., Павлова Ю. О. *Загальна вірусологія*. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 264 с.)

У багатьох вірусів, що мають прості віріони, ці два компоненти і складають зрілу вірусну частку.

У складніше влаштованих вірусів капсид оточений ліпопротеїною мембраною, що формує оболонку навколо капсиду. Цю оболонку іноді називають **суперкапсид** або **непелос** (дв.-грец. *πέπλος*, *πέπλον*, лат. *perlum*, покрив). Простір між капсидом і ліпідною оболонкою може містити додаткові білкові молекули – білки **матриксу**. На білковій оболонці можуть бути присутніми помітні в електронний мікроскоп білкові вирости. Ці поверхневі вирости носять назву **непеломери**. Спочатку їх називали шипами. Проте вони виявилися не гострими і не жорсткими, тому слово «шип» до деякої міри водить в оману.

Молекулярна вірусологія

Проте цей термін у вірусологічній літературі іноді використовується і нині.

Капсиди просто і складно влаштованих віріонів можуть називати також нуклеокапсидами (нуклеїнова кислота + капсид).

При описі морфології віріонів використовують ще низку термінів, з якими слід ознайомитися. Капсиди складаються з **білкових субодиниць** – згорнутих певним чином поліпептидних ланцюгів. Субодиниці можуть складати **структурну одиницю** (структурний елемент) – білковий ансамбль більш високого порядку, утворений декількома пов'язаними ідентичними або неідентичними субодиницями.

5.1.4. Морфологія віріонів. Білки вірусів.

Віріони мають дуже різноманітну форму. Вони можуть бути паличкоподібними, ниткоподібними, або мати вигляд правильних багатогранників. Віріони, оточені ліпопротеїною оболонкою, можуть мати кулясту або неправильну форму. Складну будову віріона мають деякі бактеріофаги.

Групи: структурні та неструктурні. Структурні – входять до складу віріонів і бувають капсидні та суперкапсидні. Їх кількість коливається від одного (вірус тютюнової мозаїки), 2-3 у фагів, 3-4 у парвовірусів, 7 у вірусів грипу, 10-14 у аденовірусів, 20-32 у герпесвірусів, 30-33 у поксвірусів. Капсидні білки складаються в білкові субодиниці (капсомери) з 1 – 6 молекул поліпептидів і формують капсомер. Такі білки мають властивість до самоскладання. Завдяки принципу субодиничності у побудові капсиду досягається величезна економія генетичного матеріалу, при самоскладанні капсиду закладена можливість контролю за повноцінністю вірусних білків: дефектні та чужорідні відкидаються автоматично.

Функції капсиду:

- основна – захисна від дії клітинних ферментів;

Розділ 5

- адресна – розпізнавання чутливої клітини, яка здатна забезпечити продукцію повноцінного вірусного потомства, прикріпна;
- злиття капсиду з плазмолемою клітини;
- регуляторна – регулюють функції вірусного геному;
- ферментативна – беруть участь у репродукції вірусів;
- антигенна – індукують синтез специфічних противірусних антитіл.

Суперкапсидні білки – є тільки у складних вірусів і подібні за структурою до внутрішньомембранних білків клітин (білки плазмолем). Це найчастіше глікопротеїни. Оскільки глікозилювання відбувається у клітині при взаємодії з клітинними вуглеводами, то вірус, репродукований у різних типах клітин, може мати неоднакові вуглеводні залишки (склад вуглеводів різний). У окремих складних вірусів на внутрішній поверхні суперкапсиду міститься проміжний білок – матриксний (мембранний) білок – М-білок. Він є медіатором складання віріонів потомства та посередником між білками капсиду та суперкапсиду.

Суперкапсидні глікопротеїни виконують такі функції:

- прикріпну;
- білки злиття;
- основні антигени.

Неструктурні білки – не входять до складу віріонів, вони забезпечують процес репродукції вірусів, вивчені значно гірше. Неструктурні білки розділяють на такі групи:

1. ферменти синтезу вірусних нуклеїнових кислот (ДНК- та РНК-полімерази);
2. регулятори експресії вірусного геному впливають на вірусну нуклеїнову кислоту, запускаючи синтез одних білків та гальмуючи синтез інших;
3. попередники вірусних білків нестабільні, з них утворюються структурні вірусні білки в результаті посттрансляційних модифікацій;

Молекулярна вірусологія

4. ферменти модифікацій вірусних білків – протеїнази та протеїнкінази;
5. інгібітори клітинного біосинтезу та індуктори руйнування клітини дестабілізують клітинні мембрани, що зумовлює лізис клітини і вивільнення вірусного потомства;
6. нефункціональні пептиди утворюються в результаті нарізання поліпептиду, не виконують вірусоспецифічної функції.

Практичний блок**Організація вірусологічних лабораторій**

Основні правила організації вірусологічної лабораторії базуються на загальних біологічних властивостях вірусів як неклітинної форми життя.

Основні правила організації вірусологічної лабораторії базуються на загальних біологічних властивостях вірусів як неклітинної форми життя.

Віруси є автономними генетичними структурами, які можуть функціонувати та репродукуватися в сприйнятливих до них клітинах.

Мають субмікроскопічні розміри, obligatні внутрішньоклітинні паразити.

При роботі у вірусологічній лабораторії треба суворо дотримуватися правил асептики та антисептики.

Асептика – система профілактичних заходів та прийомів, які попереджають попадання мікроорганізмів та вірусів з оточуючого середовища в організм людини і досліджуваний матеріал, і спрямовані на створення безмікробних умов для запобігання зараженню. Вона передбачає використання стерильних інструментів та матеріалів, обробку рук, дотримання особливих санітарно-гігієнічних правил та прийомів роботи.

Антисептика – комплекс заходів, спрямованих на хімічне та біологічне знешкодження хвороботворних та інших

Розділ 5

мікроорганізмів та вірусів, щоб запобігти зараженню при попаданні на ушкоджені і неушкоджені ділянки шкіри та слизових оболонок.

При роботі з вірусвмісним матеріалом необхідно забезпечити виконання таких вимог:

- не допускати виходу вірусів у зовнішнє середовище;
- запобігати контамінації вірусів сторонньою мікрофлорою;
- забезпечити особисту безпеку роботи.

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я («Руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях», 1985) запропонувала розділити вірусологічні лабораторії на 3 категорії:

1) *Базові лабораторії* (основні або загального типу); в зв'язку з конкретними особливостями роботи вони можуть бути обладнаними різними захисними засобами та устаткуванням. Це – лабораторії учбові, служби охорони здоров'я, лікарень, діагностичні лабораторії, університетські лабораторії. В них працюють зі збудниками інфекції III (віруси лімфоцитарного хориоменінгіту, грипу, поліомієліту, вісповакцини, енцефаломіокардиту) та IV груп (ентеровіруси, риновіруси, аденовіруси, коронавіруси, реовіруси, віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору, червоної висипки, везикулярного стоматиту, герпесу, вітряної віспи, цитомегалії людини), вірусами рослин та бактерій.

2) *Режимні лабораторії* (ізолювані) або лабораторії утримання. Це – спеціальні діагностичні лабораторії, де працюють зі збудниками інфекцій II групи, а саме арбовірусами, аренавірусами, які не увійшли в I групу, вірусами сказу (дикий штам) та натуральної віспи, вірусами гепатитів B та C, ВІЛ.

3) *Лабораторії особливого режиму* (максимально ізолювані) або лабораторії максимального утримання. Це – лабораторії для роботи з особливо небезпечними патогенними вірусами I групи, такими як: віруси

Молекулярна вірусологія

геморагічних гарячок Ебола та Марбург (родина філовірусів), Ласса, Хунін та Мачупо (родина аренавірусів).

Вірусологічну лабораторію треба розташовувати в місцях, де відсутня вібрація будинку, яка може привести до неспроможності працювати з мікроскопами, оптичними та аналітичними приладами. Не можна розміщувати лабораторію поблизу димових труб, котельні, місць, де можливе забруднення повітря пилом або хімічно активними газами. Це може руйнувати точні прилади, утруднюючи при цьому проведення досліджень.

Вірусологічну лабораторію слід розташовувати у світлому ізолюваному приміщенні з окремими входом та виходом.

Площа лабораторії повинна відповідати санітарній нормі – 14 м² в середньому на одного працівника. Приміщення повинні бути достатньо просторими для безпечного проведення лабораторних досліджень з шириною проходів до робочих місць 1,5 м.

В структурі базової вірусологічної лабораторії обов'язковими є такі підрозділи: мийна, стерилізаційна та препаратозна кімнати, кімнати для вирощування культур клітин, для серологічних досліджень, віварій. В залежності від умов роботи вірусологічної лабораторії доцільно мати термальні та морозильні кімнати. Мийна кімната площею біля 10 м², з розрахунку 5 м² на одного працівника, повинна мати прилади для миття посуду та прання білизни, раковини з гарячою та холодною водою, столи, газові та електричні плити, сушильні шафи. Посуд та інструментарій, забруднені інфекційним матеріалом, миють після обеззаражування дезінфекційними речовинами.

В стерилізаційній кімнаті розташовані дистильатор, автоклав, парові стерилізатори, сушильні шафи та інша апаратура для сушіння та стерилізації посуду, інструментарію, одягу, живильних середовищ, води, буферних розчинів. Для кожного парового стерилізатора

Розділ 5

за правилами техніки безпеки треба відводити площу 7,5 м².

Препараторська кімната призначена для зберігання посуду, діагностичних препаратів, хімічних реактивів.

Віварій (приміщення для утримання тварин) повинен мати карантинний відділ, кімнати (ізолювані одна від одної з окремими виходами) для здорових та інфікованих тварин з витяжними шафами, для миття та дезінфекції кліток, інвентаря та спецодягу, приготування кормів, кладову, кремаційну та інші.

Кімнати, призначені для роботи з вірусами, повинні мати добре природне і штучне освітлення. Вікна повинні виходити на північ або бути зробленими з матового або молочного скла, оскільки віруси інактивуються прямим сонячним світлом. Ці кімнати повинні складатися з двох відділень – боксу площею не менше 9 м² та передбокснику площею біля 4 м², розділених скляною перегородкою з розсувними, а не на петлях дверима, для економії площі та для того, щоб уникнути колювань повітря та запобігти зайвому попаданню повітря в бокс.

Обладнання вірусологічних лабораторій. Крім устаткування та посуду, який використовується в бактеріологічній та хімічній роботі, у вірусологічних лабораторіях обов'язкова наявність спеціального обладнання. Для інкубування курячих ембріонів та культур клітин необхідні термостати (сухоповітряні та водяні). Вірусологічній лабораторії необхідні центрифуги на 1500 – 3000 об./хв. для осадження великих часток подрібненого вірусологічного патологічного матеріалу та трипсинізації тканин. Повна очистка вірусів від баластних речовин та їх концентрація здійснюється за допомогою високошвидкісних центрифуг на 30 000 об./хв. і більше з пристроями для охолодження та створення вакууму в робочій камері (°C), холодильні кімнати з внутрішньою температурою до +4°C), холодильники (+4°C), холодильні камери (-20°C, -170°C. Це – камери глибокого та

Молекулярна вірусологія

надглибокого заморожування (-30°C до -170°). Для тривалого зберігання в незмінному стані вірусомісного матеріалу, розчинів, сироваток, вакцин, антигенів тощо, необхідно мати холодильні установки з інтервалом температури від +4.

Для зараження та розтину лабораторних тварин та курячих ембріонів і для відбору вірусомісного матеріалу потрібний набір різних спеціальних інструментів – шприці різних розмірів (туберкулінові на 1 мл, Льюера на 2, 5, 10, 20 мл), голки, шпатель, скальпелі, пінцети анатомічні та хірургічні, ножиці, корнцанги, тощо.

Для подрібнення патологічного матеріалу використовують гомогенізатор тканин, фарфорові ступки з товчачиками.

У вірусологічній лабораторії в достатній кількості повинні бути емальовані відра, тази, металеві бікси, бактеріальні фільтри, скляний посуд (бажано з боросилікатного скла); матраси, чашки Карреля, пробірки Лейтона та інший скляний та пластмасовий посуд для вирощування культур клітин, флакони, склянки, колби різного об'єму зі шліфами та без них, круглодонні та плоскодонні, конічні (Ерленмейєра), круглі (Кольрауша), з патрубками (Бунзена – для відсмоктування, Вюрца – для дистиляції), мензурки, бюретки, фарфорові тиглі, чашки Петрі, градуйовані піпетки різного об'єму (1, 2, 5, 10 мл), піпетки Мора, Пастера, мікропіпетки, флакони з пробками, що загвинчуються та притираються, пробірки хімічні, біологічні, серологічні, бактеріологічні, центрифужні, автоматичні (самплери), ампули різних розмірів, ексикатори, воронки, мірні циліндри.

Для постановки серологічних реакцій необхідні полістиролові планшети. В лабораторіях такого типу повинні бути різні терези: хімічні, аналітичні, торсіонні, центрифужні для зрівноваження пробірок. Необхідним обладнанням є мікроскопи різних типів: біологічний світловий, біологічний інвертований, біологічний бінокулярний,

Розділ 5

біологічний стереоскопічний, люмінесцентний, електронний.

В лабораторії у достатній кількості мають бути різні металеві та пластмасові штативи для пробірок, гумові пробки з силіконової та звичайної гуми різних розмірів (№№ 11,12,14), олівці або чорнила для скла, фільтрувальний папір, лейкопластир, тощо.

Значна кількість всього описаного обладнання використовується у стерильному вигляді. Для цього згідно різних методів обробки інструментарій та посуд, піддають чистці, миттю, дезінфекції та стерилізації.

Сучасні вірусологічні лабораторії мають необхідні прилади та устаткування для проведення експрес-діагностики вірусних інфекцій, а саме імуноферментного аналізу, імунофлуоресцентного аналізу, імуноелектроблотингу, електронної мікроскопії, імуноелектронної мікроскопії, полімеразної ланцюгової реакції.

Правила роботи в учбових вірусологічних лабораторіях:

1. Вхід у вірусологічну лабораторію дозволяється лише особам, які пройшли інструктаж по техніці безпеки.
2. Працювати дозволяється лише у спецодезії.
3. Не дозволяється ходити і розмовляти під час роботи з вірусним матеріалом.
4. Категорично забороняється приносити особисті речі, палити, приймати їжу та зберігати продукти і воду, користуватися косметикою.
5. Проводити відсмоктування інфекційного матеріалу тільки за допомогою автоматичних та напівавтоматичних піпеток чи гумових балонів. Категорично забороняється всмоктувати в піпетку досліджуваний матеріал ротом.
6. Для виключення випадкових уколів вміло та обережно користуватися шприцами та голками під час зараження курячих ембріонів та лабораторних тварин.

Молекулярна вірусологія

7. Після закінчення роботи використані предмети (піпетки, шпателі, предметні та накривні скельця, тощо) помістити в дезінфікуючий розчин на 1 добу, після чого промити та прокип'ятити.
8. Посуд з використаними живильними середовищами, кров'ю, мокротинням та іншим інфікованим матеріалом зібрати в банки і продезінфікувати в автоклаві (30 хв. при 1,5 атм.) або обробити дезінфікуючим розчином, прокип'ятити чи спалити.
9. Після заняття обов'язково помити руки та при необхідності продезінфікувати їх спиртом.
10. Забороняється викидати та виливати відходи у каналізаційну мережу.
11. При аварії під час роботи з вірусомісним матеріалом обов'язково попередити викладача або лаборанта.

Практична частина

1. Ознайомитися з лабораторією молекулярної діагностики та її основним обладнанням.
2. Вивчити санітарно-епідемічні правила роботи лабораторії.
3. Вивчити правила роботи з вірусомісним матеріалом.
4. Ознайомитися з інструктажем з охорони праці та правилами роботи з лабораторним обладнанням.
5. Вивчити основні типи посуду, інструментарію, приладів та обладнання, які використовуються у лабораторії молекулярної діагностики

Питання до самоконтролю:

1. Зберігання вірусів на тривалий час здійснюється за таких умов:
 - а) При температурі -70°C
 - б) При температурі -196°C
 - в) При температурі 4°C
 - г) При температурі -20°C

Розділ 5

2. Яку умовну назву носять кінці ланцюгів нуклеїнових кислот:

- а) 4' та 5'
- б) 2' та 3'
- в) 1' та 3'
- г) 5' та 3'

3. Засновником вірусології вважається:

- а) Вавілов
- б) Пастер
- в) Івановський
- г) Дженер

4. Носієм генетичної інформації вірусів є:

- а) білок
- б) ліпіди
- в) нуклеїнова кислота
- г) вуглеводи

5. Запис (-)РНК свідчить, що молекула РНК:

- а) безпосередньо не володіє матричною активністю
- б) фрагментована
- в) кільцева
- г) має негативний заряд

6. Що може виступати резервуарами вірусних інфекцій?

- а) Бур'яни
- б) Багаторічні рослини
- в) Хворі рослини
- г) Переносники

7. Антисептика це:

- а) комплекс заходів, спрямованих на хімічне та біологічне знешкодження хвороботворних та інших мікроорганізмів та вірусів, щоб запобігти зараженню
- б) система профілактичних заходів та прийомів які попереджають потрапляння мікроорганізмів та вірусів з оточуючого середовища в організм людини та досліджуваній матеріал
- в) система заходів спрямованих на знезараження або повне знищення мікроорганізмів та вірусів у різних матеріалах
- г) Правильна відповідь відсутня

Молекулярна вірусологія

8. Рух вірусу на далекі відстані в рослині здійснюється по

- а) плазмодесмах
- б) перидермі
- в) апопласту
- г) провідних тканинах

9. Структурні білки вірусів це:

- а) білки, що входять до складу віріону
- б) білки, що синтезуються до реплікації нуклеїнової кислоти
- в) білки, що синтезуються після реплікації нуклеїнової кислоти
- г) білки, що відповідають за поширення вірусу по рослині

10. Нуклеокапсид вірусу - це:

- а) комплекс капсиду і нуклеїнової кислоти
- б) комплекс ліпідів та білків вірусу
- в) комплекс вуглеводів та нуклеїнової кислоти
- г) комплекс металів та білків

Тема 5.2. Хімічний склад вірусів



5.2.1. Хімічні та фізичні властивості вірусів. Хімічний склад віріонів. Основними хімічними сполуками, які входять до складу віріонів усіх вірусів, є білки і нуклеїнові кислоти. До складу низки вірусів входять ще ліпіди і вуглеводи, а також деякі інші компоненти.

5.2.2. Нуклеїнові кислоти вірусів. Клітини усіх живих організмів містять два види нуклеїнової кислоти – ДНК (дволанцюгова ДНК клітинного генома) і РНК (мРНК, тРНК, рРНК і деякі інші лабільні форми РНК). На відміну від клітин, віріони містять тільки один вид нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК. І та і інша зберігають спадкову інформацію і

Розділ 5

виконують функції генома. Зберігання генетичної інформації у вигляді РНК – унікальна властивість вірусів. Слід враховувати, що наявність одного виду нуклеїнової кислоти є характеристикою віріону, але не вірусу. У циклі реплікації вірусу його геномна нуклеїнова кислота транскрибується, тобто віруси, що містять ДНК, утворюють РНК. У свою чергу низка вірусів, які містять РНК, мають в циклі репродукції стадію зворотної транскрипції і синтезують ДНК на матриці РНК. Приблизно 20% усіх **вірусів** мають ДНК-геном, 80% – РНК-геном.

Кожна молекула нуклеїнової кислоти вірусного генома є або одноланцюговою (ол), або дволанцюговою (дл); таким чином, вірусні геноми мають чотири типи: ДНК, ДНК, РНК і РНК. І якщо ДНК вірусів являє собою такий же тип спадкового матеріалу, як і в усіх живих організмів, то інші три типи генома є унікальними для вірусів. Цікаво відмітити, що більшість вірусів грибів мають в геномі РНК, у більшості вірусів рослин геном представлений РНК, а більшість бактеріофагів мають геноми у вигляді длДНК. Причина такого розподілу, можливо, пов'язана з різним походженням вірусів у цих хазяїв, що дуже розрізняються.

Розмір геномів вірусів варіює в надзвичайно широких межах. Цирковіруси свиней (ол-ДНК) і вірус гепатиту дельта (олРНК) мають геноми розміром близько 1,7 тисяч нуклеотидів. З іншого боку, максимальний розмір вірусних геномів залежить від типу нуклеїнової кислоти. Найбільш великі РНК-геноми виявлені у коронавірусів і складають близько 33 тисяч нуклеотидів олРНК. Усі найбільші вірусні геноми представлені длДНК і досягають більше 1,2 млн. пар нуклеотидів у мімівірусів і мегавірусів.

Більшість **вірусних геномів** складаються з єдиної молекули нуклеїнової кислоти, але у деяких вірусів геноми складаються з двох або більше сегментів. Такі сегментовані геноми частіше зустрічаються у РНК-вмісних вірусів у

Молекулярна вірусологія

порівнянні з ДНК-вмісними. Більшість вірусів, що містять длРНК, мають сегментовані геноми.

Геноми вірусні кодують вірусні білки, а також містять додаткову інформацію, таку як сигнали для контролю експресії генів. Частина такої інформації міститься в нуклеотидних послідовностях, проте геноми, представлені одноланцюговими нуклеїновими кислотами, можуть містити сигнали у вигляді вторинних і третинних структур, які формуються за рахунок спаровування комплементарних основ усередині молекули нуклеїнової кислоти.

За рахунок внутрішньомолекулярного спаровування формуються регіони нуклеїнової кислоти, що мають вторинні структури типу стеблопетля або псевдовузли. Ланки одноланцюгових нуклеїнових кислот з вторинними структурами також можуть згортатися в третинні структури, що мають специфічні форми, які важливі для реплікації вірусів. Окрім утворення вторинних і третинних структур, для реплікації вірусів є важливими деякі модифікації кінців їх геномів. Так, деякі віруси містять нуклеїнові кислоти, які на 5'-кінці ковалентно пов'язані з молекулою білку. Деякі РНК-геноми мають модифікації, які характерні для матричних РНК клітини – структуру кепа на 5'-кінці і поліаденіловий (поліА) хвіст на 3'-кінці. Усі ці особливості геномів вірусів детальніше розглядатимуться у відповідних розділах.

Пакування генома у віріон: взаємодія білків з нуклеїновою кислотою. Нуклеїнові кислоти і асоційовані з ними білки формують в капсиді суперспіральні складні структури.

Цілком зрозуміло, що білки капсиду повинні так чи інакше взаємодіяти з нуклеїновою кислотою генома. Ця взаємодія очевидна для вірусів зі спіральною симетрією, у яких кожна субодиниця білку однаковим чином взаємодіє з ланцюгом нуклеїнової кислоти, укладеної спіралью.

Проте у віріонів з ікосаедричною симетрією усе складніше. Проблемою є фізична упаковка відносно великої молекули нуклеїнової кислоти у відносно маленький

Розділ 5

капсид. Просте згортання генома для пакування в такий обмежений простір є в деякому роді дивом топології саме по собі, але проблема посилюється фактом, що взаємне відштовхування сукупних негативних електростатичних зарядів фосфатних груп нуклеотидного остову означає, що геном чинить опір спробі втиснути його в обмежений простір. ДНК мають основні подібні гістонам білки, тісно пов'язані з ДНК. Деякі з цих білків кодуються самими вірусами. В інших випадках віруси використовують білки хазяїна

5.2.3. Загальна характеристика вірусних білків. Найпомітніші білки, які входять до складу віріонів, – це білки, що становлять вірусний капсид. Проте, окрім білків капсиду, віріони можуть містити і інші білки.

Віріон вірусу тютюнової мозаїки, геном якого невеликий, містить тільки один вид молекул білку, що формує його спіральний капсид. Віріони парвовірусів, також вірусів з невеликим геномом, містять від двох до чотирьох різних видів молекул білку. У міру збільшення розмірів генома, кількість видів молекул білку у віріоні зростає, і наприклад віріон вірусу простого герпесу 1 містить 39 видів молекул білку, а віріон вірусу водоростей *Paramecium bursaria Chlorella virus* 1 містить більше 100 видів молекул білку.

Білки, що є компонентами віріонів, виконують цілий ряд функцій. Найбільш очевидна функція – побудова капсиду для захисту вірусного генома. Крім того, у багатьох вірусів білки забезпечують прикріплення віріону до клітини хазяїна, злиття оболонки віріонів (для покритих оболонкою вірусів) з плазматичною мембраною і так далі.

Білки вірусів виконують і багато інших функцій в циклі реплікації вірусів. Наприклад, вони можуть бути ферментами (протеазами, зворотними транскриптазами та ін.), факторами транскрипції, праймерами для реплікації нуклеїнової кислоти, засобами пригнічення імунної відповіді хазяїна і тому подібне. Білки,

Молекулярна вірусологія

що кодуються геномом вірусу, розділяють на дві групи: структурні білки і неструктурні білки.

Структурні білки (VP, Virion Proteins)

– білки, які входять до складу зрілого віріону, незалежно від того, чи беруть участь вони в побудові капсиду чи ні. До них належать білки капсиду, ферменти, упаковані в капсиді, компоненти ліпідної мембрани, білки матриксу, геномні білки, пов'язані з нуклеїновою кислотою і інші. **Неструктурні білки (NS, Non-Structural)** – білки, які кодуються геномом вірусу і син-тезуються в зараженій клітині, але не пакуються в зрілу вірусну частку. Це попередники структурних білків, регуляторні білки і ферменти, які обслуговують процес внутрішньоклітинної репродукції вірусу тощо. Вони не входять до складу вірусної частки.

Вірусні РНК в ДНК-геномних вірусах

Вірусні РНК є присутніми у низці віріонів ДНК-геномних вірусів. Гепаднавіруси і кау-лімовіруси містять короткі послідовності РНК, ковалентно прикріплені до їх ДНК. Ці РНК функціонують як праймери при синтезі ДНК і залишаються прикріпленими до геномів в зрілих віріонах.

Є також докази, що вірусні мРНК пакуються в геноми герпесвірусів, але роль цих молекул залишається невідомою.

Раніше було згадано, що віріони деяких вірусів містять ліпідні мембрани, які мають клітинне походження. До інших молекул клітини, які включаються до складу віріонів, відносяться наступні:

- **Транспортні РНК.** Молекули тРНК хазяїна включаються у віріони ретровірусів.

- **Білки.** При зборці віріонів деякі білки хазяїна можуть включатися до його складу. Наприклад, у віріони вірусу імунодефіциту людини 1 включається низка клітинних білків, до числа яких входять циклофілін А, асоційований з капсидом, і антигени лейкоцитів людини, що входять до складу оболонки віріону.

Розділ 5

- **Поліаміни і катіони.** У віріони ряду вірусів входять спермідін і інші поліаміни, а також катіони, такі як Na^+ , K^+ , Zn^{2+} і Mg^{2+} . Єдиною вірогідною функцією поліамінів і катіонів є нейтралізація негативного заряду вірусного генома при пакуванні нуклеїнової кислоти в капсид.

- **Ліпіди.** Ліпідів у складі суперкапсиду може бути 4% як у вірусу вісповакцини, 22% - вірус простого герпесу людини, 15-37% у РНК-геномних вірусів. Ліпіди формують подвійний ліпідний шар суперкапсиду, який пронизують глікопротеїни. Ліпіди вірусів мають клітинне походження (крім поксвірусів, ліпіди яких синтезуються в клітині і є вірусоспецифічними).

Функції ліпідів:

- забезпечують взаємодію глікопротеїнів;

- ізолюють внутрішні компоненти віріонів від гідрофільних речовин зовнішнього середовища, екстракція ліпідів призводить до втрати інфекційної активності вірусів.

Вуглеводи. Прикріплюються до певних амінокислот, їх кількість може досягати 10-13% від сухої маси вірусу. Найчастіше виявляють такі цукрові залишки: фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, нейрамінова кислота, глюкозамін.

Функції вуглеводів:

- каркас для збереження конформатції білкових молекул;

- захист білків від протеолітичних ферментів;

- впливають на антигенні властивості.

Практичний блок**Методи виявлення та ідентифікації вірусів у клітинних культурах****Теоретична частина**

Існують наступні основні методи індикації (виявлення) вірусів у культурі клітин:

Молекулярна вірусологія

- за цитопатичним ефектом чи цитопатичною дією (ЦПЕ, ЦПД);

- за виявленням внутрішньоклітинних включень;

- електронною мікроскопією;

- в реакціях імуноферментного та радіоімунного аналізу (ІФА, РІА);

- в реакції гемадсорбції (РГАд);

- в реакції імунофлюоресценції;

- за виявленням інтерференції вірусів;

- за пригніченням метаболізму клітин (кольорова проба);

- за утворенням бляшок.

Цитопатична дія. Найбільш широко та часто про розмноження вірусу в культурі клітин роблять висновок за цитопатичним ефектом чи цитопатичною дією (ЦПЕ, ЦПД). ЦПД – це явище, що призводить до руйнування структури клітин під впливом вірусів.

Причини ЦПД:

- порушення нормальної життєдіяльності клітин в результаті механічного пошкодження клітинних структур вірусними компонентами (дефекти цитоплазматичної мембрани, які виникають в результаті проникнення чи виходу вірусів із клітини);

- руйнування лізосом і вихід їх ферментів у цитоплазму (автоліз клітин);

- виснаження білкових та енергетичних ресурсів клітин за рахунок «переключення» клітинних ферментів та білок-синтезуючого апарату на синтез вірусспецифічних компонентів;

- порушення клітинного моношару.

Для характеристики деструктивних змін одношарових культур клітин, що заражені різними вірусами, найчастіше використовується робоча класифікація ЦПД (О.Г. Анджапарідзе, 1962):

1 група. Рівномірно розподілена дрібнозерниста деструкція клітин – виникає при ураженні клітин вірусами поліомієліту, Коксакі, ЕСНО (рис.5.3.2 а, б), ЕСМО, віспи, грипу та ін.

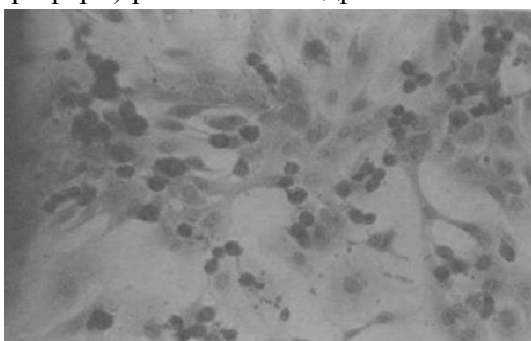
Розділ 5

2 група. Вогнищева дрібнозерниста деструкція клітин з тяжами незмінених клітин між ними - виникає при ураженні клітин вірусами весняно-літнього енцефаліту, вірус хвороби Ауескі (псевдосказу), спумавірусами та ін.

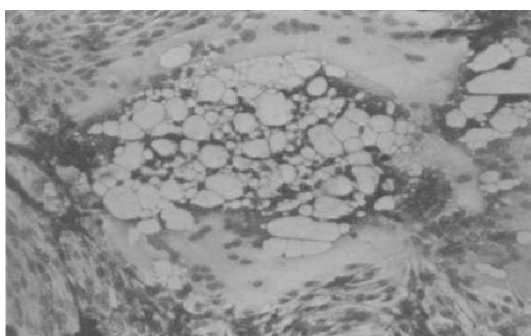
3 група. Осередкові скупчення заокруглених клітин, що нагадують грона винограду - виникає при ураженні клітин аденавірусами.

4 група. Рівномірно-розподілена крупнозерниста деструкція клітин (клітини збільшені у розмірі, заокруглені) - виникає при ураженні клітин вірусом простого герпесу.

5 група. Утворення гігантських багатоядерних клітин – симпластів та синцитіїв - виникає при ураженні клітин вірусами кору, вісповакцини, герпесу та ін (рис.5.2.2.). При цьому типі ЦПД відбувається розчинення клітинних оболонок, внаслідок чого цитоплазма сусідніх клітин зливається, утворюючи єдине ціле, в якому (в основному по периферії) розташовані ядра клітин.



а



б

Рис.5.2.2. Заокруглення клітин у випадку зараження культури клітин вірусом ЕСНО (а) та цитопатична дія спумавірусу на клітини (б).

<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/echovirus>
http://medicaldictionary.thefreedictionary.com/_/mdict.aspx?h=1&word=Retroviridae

Молекулярна вірусологія

Слід розрізнити термін симпласт та синцитії. Різниця між цими поняттями полягає в тому, що синцитії виникають у результаті часткового злиття цитоплазматичної мембрани клітин, на відміну від повного злиття мембрани при утворенні симпластів. Таким чином, синцитії – це група клітин, які з'єднані між собою протоплазматичними відростками, а симпласти мають загальну масу протоплазми, в якій міститься багато ядер.

Кількість вірусу неможливо виразити у звичайних одиницях об'єму, маси та ін., застосовують вимір одиниць дії чи одиниць активності (інфекційні, гемаглютинуючі, бляшкоутворюючі одиниці). У випадку прояву інфекційної активності вірусу у вигляді утворення бляшок кількість вірусу може бути виміряна у бляшкоутворюючих одиницях (БУО). **1 БУО** – те найбільше розведення вірусу, яке в культурі клітин здатне утворити 1 бляшку.

Для визначення титру вірусу в БУО декілька культур клітин у матрасах заражують точно відміряними однаковими об'ємами дослідного вірусмісного матеріалу. Потім вираховують, скільки бляшок утворилося в кожному з них і розраховують середнє арифметичне цієї кількості. Воно дорівнює кількості БУО, яке міститься в дозі вірусмісного матеріалу, що вносили в культуру.

$$T = n / (V \times a),$$

де n – середнє арифметичне кількості бляшок на один матрас; V – об'єм вірусмісного матеріалу, який вносили в культуру; a - розведення вірусмісного матеріалу, яке використовували для зараження.

Цей приклад титрування вірусу – спрощений, оскільки він не враховує випадків високої концентрації вірусу в матеріалі, при якій бляшки в культурі клітин можуть зливатися між собою і їх буде важко порахувати. Вважається, що підрахуванню піддаються бляшки, якщо їх кількість не перевищує 50 на матрас. Тому готують декілька розведень досліджуваного матеріалу (звичайно з коефіцієнтом 10) і кожним розведенням в

Розділ 5

однакових дозах заражують рівні групи культур клітин. Після цього розраховують середнє арифметичне кількості бляшок для кожного розведення, відкидаючи ті, де підрахунок виявився неможливим. Титр вірусу тоді розраховують за формулою

$$T = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_n)}{(V \times (a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n))}$$

де n – середнє арифметичне кількості бляшок на один матрас; V – об'єм вірусмісного матеріалу, який вносили в культуру; a – розведення вірусмісного матеріалу, яке використовували для зараження.

Титрування вірусу в пробірочних культурах передбачає визначення 50% інфекційної дії (за одиницю кількості вірусу приймається така його доза, яка здатна викликати ефект у 50 % заражених тест-об'єктів, ED_{50}). Прикладом ED_{50} може бути $ЦПД_{50}$ (доза вірусу, яка викликає появу цитопатичного ефекту у 50 % заражених клітин в культурі).

Розрахунок дози (розведення) вірусу, яке дає 50%-ий ефект, може бути проведений таким чином:

а) за Рідом та Менчем

$$\lg ED_{50} = \lg B - [(b - 50) / (b - a)] \times \lg d,$$

де ED_{50} – розведення вірусу, що розраховується; B – розведення, яке дає ефект більше 50 %; b – відсоток, який відповідає розведенню B ; a – відсоток, який відповідає розведенню, що дає ефект менше 50 %; d – коефіцієнт розведення.

б) за Кербером

$$\lg ED_{50} = \lg D + \lg d / 2 - \lg d \Sigma (r/n),$$

де D – найбільше розведення вірусу, яке ще дає 100% - ий ефект; d – коефіцієнт розведення; $\Sigma (r/n)$ – сума відношень позитивно реагуючих тест-об'єктів до заражених для усіх розведень, що дають ефект від 0 до 100%; r – кількість позитивно реагуючих тест-об'єктів на кожне розведення; n – кількість заражених тест-об'єктів на кожне розведення.

Молекулярна вірусологія

Питання до самоконтролю:

- Які з вказаних методів дозволяють розглянути вірусні включення в клітині?
 - світлова мікроскопія
 - електронна мікроскопія
 - реакція преципітації
 - імуноферментний аналіз
- Неперсистентні віруси:
 - не передаються переносниками
 - передаються переносниками протягом короткого часу
 - репродукуються у переноснику
 - передаються переносниками протягом всього життя комахи
- Визначення нуклеотидної послідовності це:
 - клонування
 - секвенування
 - кепування
 - рекомбінування
- Процес біосинтезу білку називають:
 - транскрипцією
 - транскрипцією
 - реплікацією
 - трансформацією
- Який тип симетрії не властивий вірусам?
 - спіральный
 - ізометричний
 - кубічний
 - сферичний
- Кодуючими послідовностями геному є:
 - нейрони
 - інтрони
 - екзони
 - віріони
- Віруси рослин не викликають:
 - карликовість
 - мозаїку
 - анемію
 - скручування листя

Розділ 5

8. Білки, що входять до складу віріону, називають:

- а) ранніми
- б) глобулярними
- в) фібрилярними
- г) структурними

9. Які інфекційні довірусні агенти викликають деякі захворювання у рослин?

- а) Ретровіруси
- б) Дельта-вірус
- в) Пріони
- г) Віроїди

10. Живильні середовища застосовуються для вирощування культур клітин стерилізують наступним методом:

- а) автоклаві за 120 °С
- б) автоклаві за 110°С
- в) дробове при 100 °С
- г) фільтруванням

Тема 5.3. Систематика і номенклатура

вірусів



5.3.1. Принципи класифікації і таксономії вірусів. Число відомих сьогодні вірусів перевищує 7000. Вочевидь, є необхідність якось упорядкувати усе це різноманіття, виділити загальні властивості та відмінності близьких груп вірусів, які б дозволили детально вивчати характерних представників кожної групи, а не кожен вірус окремо.

1. Класифікація на основі типу захворювання
2. Класифікація на основі виду хазяїна
3. Класифікація Д. Балтимора.
4. Сучасна класифікація і номенклатура вірусів

Після відкриття вірусів, була відома єдина їх фізико-хімічна особливість – здатність

Молекулярна вірусологія

проходити через бактерійні фільтри. По суті, це була оцінка розміру віріонів вірусів, яка ставила їх окремо від мікроорганізмів. У той час визначення інших властивостей вірусів було неможливим, тому дослідження були спрямовані на вивчення інфекційного процесу і реакції на зараження з боку організму. З цієї причини перші спроби класифікації ґрунтувалися на схожості патогенних властивостей вірусу, наприклад, виділяли віруси гепатиту, або на їх органотропності, наприклад «респіраторні віруси». У міру проникнення в природу вірусів, з 1950-х років робилися різноманітні спроби їх класифікації, на основі різноманітних властивостей. Були запропоновані ціла низка класифікацій, часто взаємовиключних.

Класифікація на основі типу захворювання. Першою і найбільш загальною рисою вірусів є та, що вони є інфекційними агентами, і можливо згрупувати віруси відповідно до природи хвороби, з якою вони асоційовані. Так, можна розглядати віруси, що викликають гепатит, або віруси, що викликають застуду. Такий підхід притягає своєю простотою. Проте цей метод групування вірусів, хоча і відбиває важливі характеристики, має великі недоліки. Він є антропоморфним, приділяючи увагу хворобі, яку ми розпізнаємо, оскільки вона впливає на людей або наших домашніх тварин. Проте при цьому ігнорується факт, що більшість вірусів або не викликають захворювань, або викликають захворювання, які нам невідомі, оскільки у нас немає повного розуміння хазяїв; наприклад, ми мало що знаємо про вірусні хвороби риб або амфібій. Також є можливим, що єдиний вірус викликає більш ніж одне захворювання; хорошим прикладом може слугувати вірус вітряної віспи, який викликає вітрянку при першому зараженні, проте при реактивації в подальшому викликає оперізуючий лишай (оперізуючий герпес). Ця проблема посилюється, якщо розглядати віруси, які заражають більше одного хазяїна. У такому випадку часто спостерігається, що вірус

Розділ 5

практично не викликає хвороби у одного хазяїна, але дуже сильно вражає іншого, або викликає різні захворювання у різних хазяїв. Класифікація, заснована на захворюванні, хоча і може бути корисна в деяких ситуаціях, не може передбачити загальні фундаментальні особливості вірусу. Наприклад, у випадку гепатитів і застуди, їх викликають багато вірусів, що мають найрізноманітнішу молекулярну будову, і вивчення одного вірусу практично нічого не може повідомити нам про інших.

Класифікація на основі виду хазяїна.

Альтернативним підходом є групування вірусів відповідно до видів хазяїв, яких вони інфікують. Такий підхід є привабливим, оскільки підкреслює паразитичну природу взаємодії вірус-хазяїн. Проте при практичному застосуванні він викликає утруднення. Деякі віруси мають дуже обмежений круг хазяїв і вражають тільки один вид живих організмів, наприклад вірус гепатиту В заражає тільки людей. Інші віруси мають вузький круг хазяїв, наприклад поліовіруси вражають декілька видів приматів. Проте віруси можуть вражати абсолютно різних хазяїв. Наприклад, багато вірусів рослин можуть реплікуватися і в комах-переносниках, і в рослинах-господарях. З цієї причини класифікація вірусів на основі видів хазяїв, що вражаються, часто призводить до неоднозначності. Крім того, навіть якщо віруси вражають єдиний вид, це не означає, що вони подібні один до одного в сенсі захворювань, що викликають, або генетичної структури. З цієї причини, детальне вивчення одного вірусу, який вражає окремих видів живого організму або навіть тільки клітини конкретного типу в організмі, нічого не скаже про фундаментальні властивості інших вірусів, які вражають цей же вид і клітини цього ж типу.

Класифікація на основі морфології вірусних часток. Коли вірусні частки було розглянуто в електронному мікроскопі, класифікація груп вірусів на підставі спостережуваної форми або морфології віріону

Молекулярна вірусологія

виявилася відносно простою. Ключовою структурною особливістю є наявність або відсутність ліпідної оболонки у вірусної частки.

Якщо віріон не має оболонки, то можливі три морфологічні категорії: чи є він ізометричним, нитчастим або комплексним. **Ізометричні віруси**, які мають округлу форму, підрозділяються на істинно ікосаедричні та ікосадельтаедри, які мають симетрію ікосаедра. Нитчасті віруси мають просту спіральну морфологію. Комплексна структура вірусної частки може бути представлена комбінацією ізометричного і нитчастого компонента, як наприклад у деяких **бактеріофагів**, або не мати відповідності простим геометричним правилам і бути неправильною за формою.

У віріонів з оболонкою подальші рівні класифікації можливі при описі нуклеокапсиду, що знаходиться усередині оболонки: він може бути ізометричним або спіральним.

Хоча класифікація на основі морфології проста і враховує особливості вірусів (а саме структуру віріонів), що не міняються, вона не є досить повною і вичерпною. Передусім, морфологія вірусної частки нічого не може повідомити нам стосовно молекулярній біології вірусних часток, що мають подібну форму, а також стосовно патології захворювань, що викликаються ними. Дві вірусні частки однакової морфології можуть мати інші фундаментальні характеристики такі, що кардинально розрізняються.

Незважаючи на зазначене, первинний опис вірусу по морфології його віріону є важливим загальним прийнятим підходом.

5.3.2. Класифікація ДНК- і РНК-вмісних вірусів. *Класифікація Девіда Балтимора на основі складу нуклеїнових кислот і синтезу мРНК.* Як було відмічено раніше, віруси виявляють дивовижну різноманітність щодо їх морфології, структури генома, способу інфікування, круга хазяїв, типів захворювань, що викликаються, і так далі. Хоча кожна з цих властивостей можна використати для поділу

Розділ 5

вірусів на групи, проте якщо в основу класифікації покласти одну або навіть дві з таких властивостей, це не приведе до системи, в якій вивчення одного вірусу конкретної групи дозволяє зробити узагальнення стосовно інших членів тієї ж самої групи. Крім того, подібна класифікація не створить хорошої основи для уніфікованого обговорення процесу реплікації вірусів.

Для вирішення цієї проблеми, лауреат Нобелівської премії Девід Балтімор в 1971 році запропонував класифікацію вірусів, в основі якої лежить природа їх генома і спосіб їх реплікації і експресії генів. Ця система дозволяє робити висновки і передбачати фундаментальні особливості усіх вірусів в межах кожної групи. Класифікація Д. Балтімора базується на фундаментальному значенні матричних РНК в циклі реплікації вірусу. Віруси не містять молекул, необхідних для трансляції мРНК, і використовують механізми клітини-хазяїна для синтезу своїх білків. З цієї причини віруси вимушені синтезувати мРНК, які розпізнавати-муть рибосоми хазяїна. У класифікації Балтімора, віруси групуються згідно з типом геному і використовуваними механізмами синтезу мРНК

За прийнятою угодою, усі мРНК називають позитивно-смысловими РНК або (+)РНК. Важливо, що на (+)РНК в клітині хазяїна відразу можуть синтезуватися вірусні білки. Ланцюги РНК або ДНК, які являються комплементом мРНК, називають негативно-смысловими або (-)РНК чи (-)ДНК. З урахуванням сучасних даних в класифікації Д. Балтімора виділяють сім класів вірусів

1) включає віруси, які мають в геномі дволанцюгову ДНК. Реплікація відбувається в ядрі з використанням ферментів клітини-хазяїна. Проте реплікація членів сімейства вірусів віспи цього класу відбувається в цитоплазмі з використанням ферментів, що кодується вірусом.

2) включає віруси з одноланцюговою ДНК. Перед синтезом мРНК ДНК

Молекулярна вірусологія

перетвориться в дволанцюгову форму. Реплікація відбувається в ядрі.

3) включає віруси, геном яких представлений дволанцюговою РНК. Усі відомі на сьогодні віруси цього класу мають сегментований геном. Матрична РНК синтезується на одному з ланцюгів кожного сегменту. Оскільки клітини хазяїна не мають ферментів для синтезу мРНК на геномній РНК-матриці вірусу, ці ферменти повинні кодуватися геномом вірусу і входити до складу віріону.

4) включає віруси, геном яких представлений одноланцюговою (+)РНК. Фактично геном вірусів цього класу є матричними РНК. Синтез комплементарного ланцюга РНК передуює синтезу мРНК. Синтез РНК здійснюється ферментами вірусу, які не входять до складу вірусної частки, а відразу ж після зараження утворюються при трансляції геномної (+)РНК вірусу.

5) включає віруси, які мають в геномі одноланцюгову (-)РНК. Синтез мРНК вимагає кодованого вірусом ферменту, який міститься у віріоні. Реплікація відбувається в цитоплазмі або ядрі.

6) включає віруси, які містять в геномі одноланцюгову (+)РНК. Проте, на відміну від класу 4, перед реплікацією за участю вірусного ферменту зворотної транскриптази на цій РНК синтезується дволанцюгова ДНК.

7) включає невелику групу вірусів, званих реверсивірусами (reversivirus), які спочатку були віднесені до класу 1, оскільки їх геном представлений дволанцюговою ДНК. Проте їх реплікація здійснюється через стадію формування одноланцюгової РНК, а потім за допомогою зворотної транскриптази вірусу знову синтезується дДНК, яка і служить основою для синтезу мРНК.

Недоліком класифікації Балтімора є та обставина, що в ній об'єднуються в класи віруси з однаковими механізмами реплікації, проте не беруться до уваги біологічні особливості вірусів. Наприклад, в клас 1 входять бактеріофаг Т2 і вірус віспи, хоча вони

Розділ 5

сильно розрізняються по структурі і біології. Так само встановлення того факту, що геном вірусу складається, наприклад, з одноланцюгової (+)РНК, не дозволяє однозначно класифікувати вірус, оскільки він може належати до класу 4 або 6.

5.3.3. Сучасна класифікація і номенклатура вірусів.

Впродовж тривалого часу вірусологи уникали використання в класифікації вірусів таксономічних груп, таких як сімейство, рід або вид, які широко використовуються для класифікації живих організмів. Спроби створити загальноприйнятту класифікацію вірусів привели до консенсусу, і в 1966 році на міжнародному мікробіологічному конгресі в Москві був заснований Міжнародний комітет з номенклатури вірусів, який в 1973 р. був перейменований в Міжнародний комітет таксономії вірусів.

Відповідно до прийнятої класифікації, віруси підрозділяються на родини, підродини, роди і види. Деякі родини вірусів об'єднують в ряди. Більш високі таксономічні одиниці, такі як класи, типи (відділи) або царства, в класифікації вірусів не використовують. Класифікація, що розробляється МКТВ, нагадує класифікацію живих організмів. Проте слід підкреслити, що класифікація вірусів не побудована на основі філогенезу.

При розподілі вірусів по таксономічних групах МКТВ враховує низку характеристик. До їх числа входять круг хазяїв (еукаріоти або прокаріоти, тварини, рослини тощо), морфологічні особливості віріону і природа геномної нуклеїнової кислоти. Враховуються також до-даткові особливості, такі як довжина хвоста у фагів, наявність або відсутність певних генів.

Ряд – група родин з деякими загальними характеристиками, назва ряду закінчується на *-virales*. Приклад – ряд *Mononegavirales*.

Родина (підродина) – об'єднує роди, представники яких мають один тип генома і схожу структурну організацію вірусної

Молекулярна вірусологія

частки. Родини (підродини) вірусів позначаються словами, що закінчуються на *-viridae* для родини і *-virinae* для підродини. Приклад – родина *Paramyxoviridae*, підродина *Paramyxovirinae*.

Рід об'єднує віруси на основі структури генома, феномену генетичних взаємовідносин, архітектури віріону, кола сприйнятливих хазяїв, патогенності, географічного поширення, способу передавання. Назви родів закінчуються на *-virus*. Приклад – рід *Morbillivirus*.

Особливої згадки заслуговує категорія **виду** у вірусів. Концепція виду складна і невизначена у біології взагалі (немає ніякого єдиного однозначного визначення виду для усіх живих організмів). Тим більше невизначеною вона виявляється стосовно вірусів, які є просто мо-більними генетичними елементами.

У 1991 року МКТВ прийняв наступне визначення виду у вірусів: вид вірусів визначається як політетичний клас¹, що утворює низку поколінь, які реплікуються і займають окрему екологічну нішу.

1 – Політетичний клас – той, що має великий набір ознак, більшість з яких є у кожного представника даного класу, але немає жодної ознаки, яку обов'язково повинен мати кожний представник класу.

Назва виду має бути максимально короткою і повинна однозначно характеризувати вид і відрізнити його від інших видів. Приклад – *Measles virus* (вірус кору).

У класифікації вірусів не застосовується класична бінарна номенклатура, яку використовують в класифікації живих організмів. Наприклад, в латинській назві вірусу кору (*Measles virus*) не є присутньою назва роду (*Morbillivirus*).

Цифри, букви або їх комбінації можуть бути використані в якості видових епітетів. При описі нових видів, нумерація може бути продовжена. Є припустимими, наприклад, *Bovine adenovirus A*, *Bovine adenovirus B* тощо, або *Human herpesvirus 1*, *Human herpesvirus 2*,

Розділ 5

Human herpesvirus 3. Але є неприпустимими назви на кшталт "11" або "A4"

МКТВ не класифікує таксони вірусів нижче виду, проте в практиці і наукових дослідженнях використовують внутривидову диференціацію вірусів за антигенами, серотипами, генотипами, електрофоретипами – залежно від вживаних методів дослідження.

5.3.4. Класифікація вірусів з урахуванням нуклеотидних послідовностей геномів.

При сучасному розвитку методичної бази вірусологічних досліджень, фактично рутинною процедурою є отримання даних стосовно послідовностей нуклеотидів в окремих генах або повних геномах вірусів (секвенування геномів) і визначення будови їх геномів. Це дозволяє отримати також відомості стосовно послідовності амінокислот, з яких складаються білки, що кодується цими генами. Ступінь спорідненості між вірусами може бути оцінена з використанням комп'ютерних програм і наведена у вигляді діаграм, які знані як філогенетичні дерева, оскільки вони показують вірогідні філогенетичні зв'язки між вірусами.

Філогенетичні дерева можуть бути різних типів. Зокрема, вони можуть бути вкорінені або не вкорінені. Вкорінені починаються з кореня, який, як припускають, є предком інших вірусів філогенетичного дерева. Для не вкоріненених дерев відсутні припущення щодо предка.

Практичний блок

Методи виявлення та ідентифікації вірусів у клітинних культурах

Завдання: розглянути препарати культури клітин тварин *in vitro*, ознайомитись з їх морфологічними особливостями та класифікацією. Навчитися визначати тип ЦПД вірусів у культурі клітин.

Матеріали та обладнання: світловий мікроскоп, забарвлені мікропрепарати

Молекулярна вірусологія

первинних, постійних та диплоїдних клітинних культур, забарвлені мікропрепарати клітинних культур з різними типами ЦПД та включень, таблиці, слайди.

Хід роботи

1. Продивитися під світловим мікроскопом неінфіковані вірусом культури клітин, які відносять до первинних, диплоїдних та постійних. Визначити їх морфологію, тип клітин, вказати ступінь щільності популяції клітинного моношару.
2. Дослідити фіксовані забарвлені препарати інфікованих вірусами культур клітин для виявлення ознак цитопатичної дії, описати їх.
3. Знайти внутрішньоклітинні включення при інфекціях, що викликані різними вірусами.
4. Замальовати препарати здорових та вірусінфікованих клітинних культур.
5. Порівняти морфологію неінфікованих та інфікованих вірусами клітинних культур.

Контрольні завдання:

1. Поясніть різницю між поняттями «багатоядерна клітина», «симпласт» та «синцитій».
2. Визначте титр вірусу методом кольорової реакції, якщо при її постановці шоста пробірка ще має жовте забарвлення. Розведення вірусу в першій пробірці 10^{-1} , а в кожній наступній - зменшується в 10 раз.
3. Необхідно визначити титр вірусу в суспензії. Для достовірного виявлення концентрації вірусу в дослід узяли декілька розведень вірусної суспензії: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. По 0,2 мл розведеної суспензії внесли в рівні об'єми культур клітин у матрасах. Кожне розведення вірусу досліджували на 3 матрасах. Через 5 днів інкубації отримали наступні результати: в матрасах, в які вносили вірусну суспензію в концентрації 1:10, неможливо було провести розрахунок бляшок, оскільки відбувалося їх злиття; в матрасах з концентрацією вірусної суспензії 1:100

Розділ 5

спостерігали утворення 135, 128 та 140 бляшок; в матрасах з концентрацією вірусної суспензії 1:1000 – 35, 40, 37 бляшок; в матрасах із концентрацією вірусної суспензії 1:10000 – 5, 7, 8 бляшок.

Питання до самоконтролю:

1. Як відбувається адсорбція вірусу на клітині?
 - а) скарифікація клітинної оболонки
 - б) дифузія вірусних часток
 - в) катіонно-аніонний обмін
 - г) за рахунок комплементарної взаємодії білків вірусу, що прикріплюються до клітинних рецепторів
2. Що таке віропексис?
 - а) звільнення вірусного геному від суперкапсиду
 - б) варіант рецепторного ендоцитозу
 - в) злиття мембран
 - г) транскрипція вірусних нуклеїнових кислот
3. Що таке депротейнізація?
 - а) транскрипція вірусних нуклеїнових кислот
 - б) проникнення вірусу в клітину
 - в) звільнення вірусного геному від суперкапсиду і капсиду
 - г) реплікація вірусної ДНК
4. Найбільш актуальна гіпотеза походження вірусів:
 - а) від древніх доклітинних форм життя (протобіонтів)
 - б) від бактерій, що зазнали регресивної еволюції
 - в) від компонентів клітини (нуклеїнових кислот, епісом, хлоро- пластів, мітохондрій), які набули відносної автономності
 - г) усі перелічені
5. Як називається зовнішня ліпопротеїнова оболонка віріона?
 - а) білкова мембрана
 - б) капсид
 - в) суперкапсид (непелос);
 - г) прокапсид

Молекулярна вірусологія

6. Віріони просто організованих вірусів складаються:
 - а) з нуклеїнової кислоти
 - б) з нуклеокапсиду
 - в) з нуклеокапсиду, оточеного суперкапсидом
 - г) з нуклеоїда (серцевини), оточеного суперкапсидом
7. Форми вірусних ДНК:
 - а) одноланцюгові
 - б) дволанцюгові
 - в) лінійні та кільцеві
 - г) усі перелічені
8. Форми вірусних РНК:
 - а) одно- і дволанцюгові
 - б) лінійні та кільцеві
 - в) фрагментовані
 - г) усі перелічені
9. Яке значення для вірусів має кільцева форма дволанцюгової ДНК?
 - а) забезпечує стійкість ДНК до нуклеаз
 - б) обов'язкова для процесу інтеграції вірусної ДНК із клітинним геномом
 - в) ефективний спосіб регуляції транскрипції та реплікації
 - г) усі перелічені
10. Назвіть просто організовані ДНК-вмісні віруси:
 - а) покс- і герпесвіруси
 - б) іридо- та асфарвіруси
 - в) гепаднавіруси
 - г) адено-, папілома-, поліома-, парво- і цирковіруси

Тема 5.4. Особливості вірусів бактерій,

грибів, рослин



5.4.1. Віроїди. Загальна характеристика віроїдів. У 1920-х роках фермери штатів Нью-Йорк і Нью-Джерсі помітили у рослин картоплі симптоми невідомого захворювання. Бульби уражених рослин втрачали звичну форму і ставали веретеновидними, тому ця хвороба отримала назву веретеновидності бульб картоплі. Симптоми захворювання з'являлися у рослин, які контактували з фрагментами уражених екземплярів, отже, хвороба викликала агентом, який міг передаватися від однієї рослини до іншої. Однак в уражених рослин не було виявлено незвичайного гриба або бактерії, тому припустили, що хвороба викликається вірусом (рис.5.4.1.). Незважаючи на численні спроби ізолювати й очистити цей вірус з екстракту веретеновидної картоплі з використанням більш досконалих методів, виділити його так і не вдалося.



Рис. 5.4.1. Віроїдна хвороба (готика): захворювання картоплі, яке викликає віроїд веретеновидності бульб картоплі (ВВБК) - *Potato spindle tuber viroid (PSTV)*. (<https://gd.eppo.int/taxon/PSTVD0/photos>)

У 1971 році Теодор О. Дінер показав, що цей інфекційний агент не був вірусом, а патогеном абсолютно нового типу, розмір якого становив одну вісімдесятю від розміру типового вірусу, і запропонував для його назви

термін «віроїди» (тобто «вірусоподібні»). Таким чином, в 1971 році відкрито збудника захворювання картоплі - *potato spindle tuber viroid* або PSTV. Дінер і надалі вивчав властивості й функції віроїдів. Паралельно велися як сільськогосподарські дослідження особливостей віроїдів, так і фундаментальні наукові дослідження, спрямовані на вивчення їх фізичних, хімічних і макромолекулярних властивостей. У 1976 р. Зенгер з колегами довели, що патоген, який викликає веретеновидність бульб картоплі, є «одноланцюговою, ковалентно замкненою, кільцевою молекулою РНК, яка завдяки спарюванню основ набуває щільної паличкоподібної структури». Це був перший опис природи віроїдів.

Повна послідовність генома віроїда веретеновидності бульб картоплі (PSTVd) була встановлена в 1978 році Хансом Гросом з колегами. Цей віроїд став першим патогеном еукаріот, для якого була визначена повна молекулярна структура. В Україні це захворювання під назвою «готика» відомо з початку 40-х років. Однак економічно вагомий втрати від нього почали фіксувати, коли було налагоджено виробництво безвірусної картоплі, технологія отримання якої не передбачала ідентифікації та очищення картоплі від ВВБК. В результаті у багатьох регіонах посадковий матеріал виявився інфікований цим патогеном. Крім картоплі ВВБК уражаються й інші рослини родини Пасльонових, зокрема томати. Рослини цієї родини інфікуються й іншими віроїдами, наприклад, віроїдами екзокортиса цитрусових (ВЕЦ), «планто мачо» томата. Віроїди мають високу стійкість до дії різних хімічних сполук і факторів навколишнього середовища, що виключає можливість лікування уражених ними рослин. Тому основні заходи захисту повинні бути спрямовані на виключення можливості зараження рослин при селекції і промислового насінництва. За оцінками вчених, більше третини вірусних захворювань рослин викликаються віроїдами.

Розділ 5

До теперішнього часу вивчено понад 30 збудників віроїдних захворювань, багато з яких вражають економічно важливі культури - картоплю, томати, цитрусові, виноград, фруктові та декоративні рослини. Деякі віроїди (збудники екзокортиса цитрусових, веретенovidності бульб картоплі, хвороби каданг-каданг кокосових пальм, карликовості хризантем, латентної мозаїки персика) істотно (іноді на 100%) знижують урожай, погіршують товарні якості продукції і в багатьох країнах входять в список організмів, що мають карантинне значення.

5.4.2. Біологічні властивості віроїдів як патогенів рослин. Віроїди відрізняються від вірусів низкою ознак:

- не мають білкової оболонки і не мають антигенних властивостей;
- РНК відзначається малими розмірами (довжина близько 1×10^{-6} мм), складається з 300-400 нуклеотидів;
- геном представлений кільцевою одноланцюговою РНК. Серед вірусів хребетних подібну структуру має тільки геном вірусу гепатиту Дельта (гепатиту D);
- віроїди не кодують власних білків і їх розмноження відбувається або автокаталітично, або залежить від клітини-господаря.

У рослин віроїди часто викликають значні зміни метаболізму, що призводять до порушень росту і розвитку, однак механізм віроїд – індукованої патології рослин поки що не відомий.

У рослин томатів, уражених ВВБК, були знайдені маленькі РНК (близько 25 нуклеотидів), що мають подібність з 207 віроїдами, проте їх вміст не корелював зі ступенем прояву захворювання. Присутність подібних РНК вказує на можливість функціонування механізму сайленсинга РНК, здатного репресувати експресію генів рослини-господаря за допомогою деградації сиквенс-специфічної РНК, індукованої дволанцюговими

Молекулярна вірусологія

або шпильковими фрагментами РНК віроїдів. Ці фрагменти розщеплюються ферментом, подібним до рибонуклеази III і здатним гідролізувати дволанцюгові субстрати на короткі РНК (21-25 нуклеотидів), названі маленькими інтерфериративними РНК (small interfering RNAs, siRNAs, siРНК). Ці siРНК розплітаються АТФ-залежною геліказою і включаються в комплекс siРНК-рибонуклеази (RNA-induced silencing complex – RISC), який взаємодіє з відповідною одноланцюговою РНК і гідролізує її. ВВБК здатний передаватися з бульбами, пилом і насінням, а також контактним-механічним способом.

На сьогодні немає ефективних методів оздоровлення картоплі від ВВБК. Найбільш надійним способом залишається жорсткий негативний клоновий добір. Велику роль відіграють методи діагностики віроїдів. При вибраківуванні рослин і бульб картоплі, що містять ВВБК, діагностика, електрофорез, молекулярна гібридизація із застосуванням радіоактивних і нерадіоактивних к-ДНК- і к-РНК-проб, RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction – зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція. При інфікуванні рослин віроїдами спостерігається явище крос-захисту. Крос-захист має місце між різними штамами одного віроїда або віроїдами з дуже близькими геномними послідовностями. Рослина, інфікована одним віроїдом, не дає можливості реплікуватися і викликати захворювання іншим видам віроїдів. Механізм крос-захисту у віроїдів невідомий. Згідно з деякими гіпотезами, для реплікації, транспорту з клітини в клітину і накопичення необхідний обмежувальний фактор клітини-господаря. Різна спорідненість віроїдних РНК до цього віроїда може визначати – який з віроїдів, що одночасно потрапили в клітину, буде переважати; крім того, взаємодія віроїдної РНК з цим фактором може визначати його патогенність. Поширення віроїдів по рослині відбувається по провідній системі – по судинах флоєми. Ймовірно, цей транспорт

Розділ 5

супроводжується реплікацією віроїдів, оскільки у флоемі було виявлено реплікативні форми ВВБК. Можна припустити, що поширення віроїдів по рослині відбувається з потоком речовин від органу-донора до органу-акцептора, оскільки в рослинах апікальні меристеми, генеративні органи, молоде листя і запасуючі тканини представляють собою атрагуючі центри. Дані щодо транспорту віроїдів по ксилемі поки що відсутні.

5.4.3. Шляхи зараження віроїдами.

Патогенність і симптоми. Найбільш ймовірним способом передачі віроїдів є проникнення через механічні пошкодження. Такий механізм передачі поширений серед патогенів рослин. Інфекційний агент потрапляє в незаражені рослини при безпосередньому контакті з зараженими, при використанні заражених садових інструментів, через насіння, пилок або через комах-переносників. Передбачається також можливість передачі віроїда веретеновидності бульб картоплі разом з вірусом скручування листків картоплі (рід *Polerovirus* родина *Luteoviridae*). В цьому випадку віроїд може оточуватися вірусним капсидом, так що утворюється вірусна частка, яка містить всередині віроїд. Це значно полегшує поширення віроїдів і ускладнює контроль за їх розповсюдженням. Потрапивши в нову рослину, віроїди переходять до реплікації й розмноження, переміщуючись в інші клітини за допомогою *плазмодесм*. При віроїдних інфекціях спостерігаються різноманітні симптоми, які можуть зачіпати як всю рослину в цілому, так і окремі органи: листки, плоди, квітки, корені, органи запасання. До числа таких симптомів можна віднести знебарвлення листя, карликовість, появу помаранчевих плям, посилене утворення плодів, з яких лише деякі дозрівають тощо. На ступінь вираженості симптомів впливають послідовність і будова геномної РНК віроїдів, стан рослини-господаря і умови навколишнього середовища. Господарями можуть бути

Молекулярна вірусологія

трав'янисті й деревинні рослини, овочеві та декоративні культурні рослини. Деякі рослини можуть бути безсимптомними носіями віроїдів. Наприклад, віроїди веретеновидності бульб картоплі зустрічаються в основному на декоративних рослинах родин Пасльонові і Айстрові, у яких не викликають будь-яких симптомів, однак у помідорів і картоплі цей патоген викликає серйозне захворювання. Можливо, що адаптація віроїдів до безсимптомних господарів викликала невеликі зміни в його послідовності або структурі, що значно збільшило ступінь вираженості симптомів. Оскільки віроїди не кодують білків, їх дія на рослину має бути наслідком безпосередньої взаємодії віроїдної РНК і клітини-господаря. Молекулярний механізм, за допомогою якого віроїди викликають захворювання у рослин, залишається до кінця нез'ясованим. Припускають, що першими мішенями віроїдів є нуклеїнові кислоти і білки клітини-господаря. Геноми деяких віроїдів містять ділянки, комплементарні деяким клітинним РНК. У зв'язку з цим передбачається, що захворювання починається через пригнічення функцій цих клітинних РНК або їх розривання, що спрямовується віроїдною РНК. Наприклад, послідовність частини РНК віроїда веретеновидності бульб картоплі має подібність з послідовністю РНК U1 ссавців, а деякі віроїди можуть комплементарно спаровуватися з 7S рРНК. У віроїдному патогенезі також може бути задіяна РНК-інтерференція. Рослини використовують механізми РНК-сайленсінгу для захисту від вірусних інфекцій. Ферменти клітини можуть розпізнавати чужорідні дволанцюгові РНК або одностанцюгові РНК з розвиненою просторовою структурою і розрізати їх на *малі РНК (siРНК)* довжиною 21-26 нуклеотидів. У заражених рослинах були виявлені малі РНК, ідентичні ділянкам віроїдної РНК, і показано, що ці siРНК утворилися в результаті роботи ферментів клітини після проникнення вірусу. Розвиток симптомів віроїдної інфекції може бути обумовлений активацією або негативною

Розділ 5

регуляцією клітинних генів-мішеней під дією siРНК, проте до цього часу не було ідентифіковано специфічних генів-мішеней. Можливо, існують білки клітини-господаря, які розпізнають і взаємодіють з різними віроїдними структурами. Дволанцюгова РНК-залежна **протеїнкіназа** ссавців активується віроїдами веретеновидності бульб картоплі, а її вторинна структура нагадує дволанцюгову РНК. Було показано зв'язок між рівнем активації цього ферменту і ступенем вираженості симптомів захворювання у рослин. Активована протеїнкіназа фосфорилує альфа-субодиницю еукаріотичного фактора ініціації синтезу білка, в результаті чого відбувається пригнічення синтезу білка в клітині. Активація рослинного гомолога протеїнкінази може запускати віроїдний **патогенез**, оскільки в клітинах ссавців активність протеїнкінази індукується інтерферонами і активується дволанцюговою РНК. Розвиток віроїдної інфекції може залежати і від інших білків клітини-господаря. Взаємодія білків клітини з віроїдами надзвичайно складна, тому що висока частота мутацій віроїдів може мати значний вплив на їх геномну послідовність і структуру.

5.4.4. Віруси бактерій. Загальна характеристика бактеріофагів. Багато вірусів бактерій (бактеріофаги) мають капсиди з ікосаедричною симетрією. Проте унікальною для низки бактеріофагів є морфологія голівка-хвіст (рис. 5.4.2). В межах цієї морфології є значні варіації, і бактеріофаги можуть бути розділені на ті, що мають короткий хвіст, довгий хвіст, що не скорочується, і складний хвіст, що скорочується.

У віріону може бути присутнім ряд інших структурних елементів, таких як базальна пластинка, комірці і т. д. Незважаючи на складну структуру, принципи дизайну віріонів фагів з організацією голівка-хвіст подібні розглянутим вище. Голівки зазвичай мають ікосаедричну симетрію, тоді як

Молекулярна вірусологія

хвосту зазвичай мають спіральну симетрію. Інші структури, типу комірців і базальних пластинок, також мають певний тип симетрії. Походження структури голівка-хвіст в еволюційному аспекті може бути пов'язано зі способом, яким бактерійні віруси заражають сприйнятливі клітини.

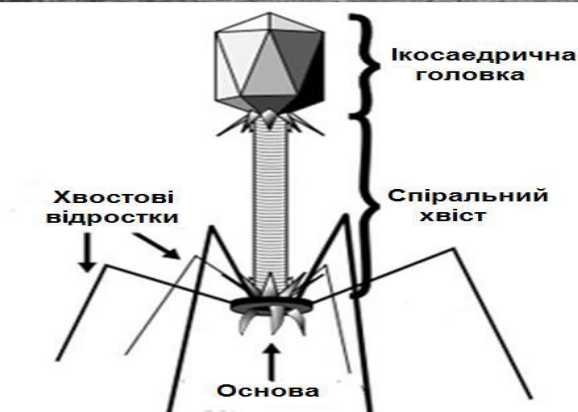
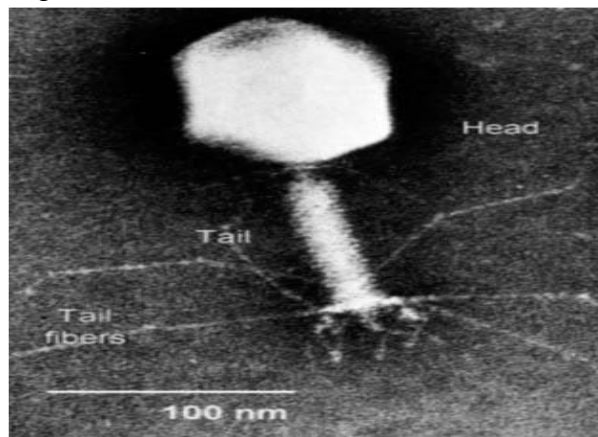


Рис.5.4.2. Віріони, що мають морфологію голівка-хвіст. Ліворуч - електронна мікрофотографія бактеріофага, праворуч - схема будови віріону бактеріофага. (<https://www.pherecydes-pharma.com/natural-phages.html>)

Бактеріофаги, що мають голівку і хвіст. Хвостовий відросток деяких **бактеріофагів**, наприклад T2 і T4 (так звані "Т-парні" фаги), може скорочуватися. Він складається з 24 кілець, що оточують стрижень. Ці кільця утворюють чохол навколо стрижня. Кожне кільце складається з декількох великих і малих субодиниць.

Після прикріплення до поверхні бактерії, хвіст скорочується, завдяки об'єднанню великих і малих субодиниць, так що залишається тільки 12 кілець. Порожнистий стрижень усередині хвостового відростка не може скорочуватися, і він проходить через

Розділ 5

зовнішні шари бактерії хвилеподібними рухами. Цей процес, ймовірно, полегшується ферментом-лізозимом, який асоційований з хвостом фага. Далі стискання голівки призводить до уприскування ДНК фага в клітину бактерії. З чохлам фага пов'язані 144 молекули АТФ, і ймовірно їх гідроліз до АДФ забезпечує енергію для скорочення чохла хвостового відростка. Спосіб введення ДНК в клітину у фагів цього типу часто порівнюють з введенням ліків за допомогою шприца (рис. 5.4.3.).

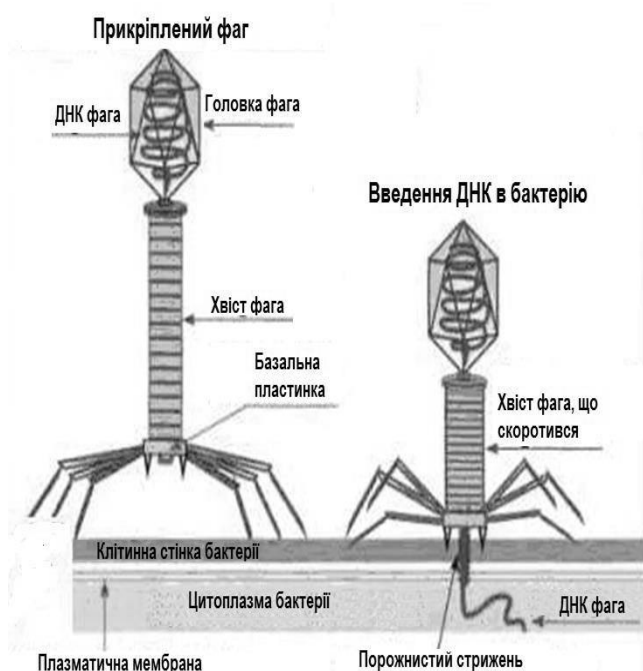


Рис. 5.4.3. Вхід геному *T*-парних бактеріофагів в клітину бактерії. (<https://www.pherecydes-pharma.com/natural-phages.html>)

5.4.5. Віруси рослин. Шляхи передачі вірусів рослин в природі:

- механічним контактом (пряма передача);
- в процесі вегетативного розмноження;
- за допомогою насіння;
- за допомогою пилку;
- за допомогою переносників:
- комах;
- нематод;
- грибів;
- за допомогою повитиці.

Особливості взаємодії вірусів рослин з чутливими клітинами неописана стадія специфічної адсорбції на поверхні чутливих

Молекулярна вірусологія

клітин рослин; - первинне інфікування можливе лише при порушенні цілісності целюлозної оболонки та цитоплазматичної мембрани; - від клітини до клітини вірус передається через плазмодесми; - більшість вірусів рослин передаються векторами; - при взаємодії з комахами-векторами деякі віруси рослин здатні розмножуватися в тканинах переносників.

Інфікування рослин. Клітинна стінка, що оточує плазматичну мембрану рослинної клітини, запобігає прикріпленню і входу вірусів в клітину способами, аналогічними для вірусів тварин. Віруси здатні потрапити в цитоплазму рослинної клітини, тільки якщо рослинні тканини пошкоджені. З цієї причини рослини заражаються або за допомогою переносників, або через механічні ушкодження, викликані вітром або іншими причинами. Переносниками вірусів рослин можуть бути попелюхи, що живляться на рослинах, трипси, цикадки, кліщі, нематоди, фітопатогенні гриби. Круг рослин, що вражаються вірусом, зазвичай визначається видами рослин, на яких може житися переносник.

Потрапивши в клітину рослини, вірусна частка в цитоплазмі роздягається, завдяки зв'язуванню білків капсиду з білками цитоплазми рослинної клітини; на цей процес впливають також двовалентні катіони типу іонів кальцію. Вивільнений геном вірусу або цілі віріони переміщуються в рослині з клітини в клітину через плазмодесми, забезпечуючи поширення інфекції по рослині. Важливою особливістю фітопатогенних вірусів є кодування вірусами так званих *транспортних білків*, переміщенню вірусних геномів в прилеглі клітини. На значні відстані в рослині віруси поширюються по флоемі.

Фітопатогенні віруси, що циркулюють на території України:

Зернові культури – вірус жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ), вірус смугастої мозаїки пшениці (ВСПП), вірус штрихуватої мозаїки ячменю (ВШМЯ)

Бобові культури – вірус мозаїки люцерни (ВМЛ), вірус жовтої мозаїки квасолі

Розділ 5

(ВЖМК) Овочеві культури – вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), вірус огіркової мозаїки (ВОМ), вірус плямистого зів'янення томатів (ВПЗТ)

Цукрові буряки – вірус жовтяниці цукрових буряків (ВЖБ), вірус мозаїки цукрових буряків (ВМБ) Картопля – У-вірус картоплі (УВК), Х-вірус картоплі, вірус скручування листя картоплі (ВСКЛ).

Плодові - вірус мозаїки яблуні (ВМЯ).

Економічне значення вірусних інфекцій рослин. Середні значення втрат врожаю від вірусних інфекцій при розвитку епідемій (епіфітотій): Зернові культури – 15-80% Бобові культури – 10-70% Овочеві культури – 15-90% Картопля – 20-40% Плодові – 15-60%.

5.4.5. Епідеміологія фітовірусних інфекцій.

Біологічні системи як резервуари вірусів у природі Екологічні аспекти існування вірусів у біосфері. Поняття про епізоотичний процес. Основні терміни та визначення.

Біосфера – область поширення життя на Землі. **Ареал** – область поширення виду (тварин, рослин) **Біоценоз** – еволюційно складена сукупність живих організмів (багатоклітинних, одноклітинних, вірусів), що населяють територію з однаковими умовами існування. **Біотоп** – ділянка земної поверхні з однотипними умовами середовища, яку займає певне угруповання живих організмів. **Біогеоценоз** – складна природна система, що об'єднує пов'язані між собою обміном речовин і енергії сукупності живих організмів (біоценоз) з неживими компонентами – умовами життя (біотопом). **Мікробоценоз** – біоценози мікроорганізмів.

Типи співіснування (симбіозу) організмів:

- **Мутуалізм** – симбіоз організмів, при якому кожен з них дає один одному користь.
- **Коменсалізм** – симбіоз організмів, при якому один живе за рахунок іншого, не завдаючи йому шкоди.
- **Паразитизм (антагоністичній симбіоз)** – пригнічення розвитку організму

Молекулярна вірусологія

хазяїна (*факультативний та облігатний паразитизм*).

- **Метабіоз** – форма взаємовідношень між мікроорганізмами, коли одні підготовлюють умови, потрібні для існування інших.

- **Сателізм** – форма взаємовідношень між мікроорганізмами, коли один мікроорганізм здатен стимулювати репродукцію іншого виду.

Біоценози мікроорганізмів (мікробоценози):

- Мікрофлора ґрунту.
- Мікрофлора води.
- Мікрофлора повітря.
- Мікрофлора тіла тварин, людини, рослин (мікрофлора ШКТ ; мікрофлора дихального тракту; мікрофлора сечостатевого тракту. Тварини, які вирощені в особливих умовах: такі, що не містять патогенних збудників (SPF-тварини) та гнотобіоти (безмікробні, стерильні). **Конвертованість** – можливість обміну інформацією – це властивість усього живого на Землі. Це означає:

- обмін енергією у клітинних організмів можливий завдяки схожості будови ліпідно-білкових мембран, білок-синтезувального апарату та апарату спадковості;

- обмін генетичною інформацією у клітинних організмів: у бактерій – за рахунок епісом та плазмід; у інших клітинних організмів – за рахунок статевого процесу ;

- віруси – це фактори вибухоподібного переносу генетичного матеріалу від однієї особи до іншої, а також від одного виду до іншого (всього відомо 95 родин вірусів; у хребетних паразитують віруси 31 родини; з них у хребетних і безхребетних – віруси 10 родин; у хребетних, безхребетних і рослин – віруси 3 родин).

Екологія вірусів вивчає загальні закономірності та особливості, притаманні вірусам як біологічним видам у їх взаємовідносинах з хазяями (клітинними

Розділ 5

організмами). Найважливіші напрями екології вірусів є такі:

- місце популяцій вірусів у біосфері і їх роль в еволюції живих організмів на Землі;
- екологічна ніша вірусів – це клітинні організми (від бактерій до багатоклітинних організмів);
- причини виникнення і розповсюдження вірусних хвороб;
- закони підтримки та зберігання вірусів у міжепідемічний період;
- причини періодичних змін вірусної популяції та розвитку пандемій та панзоотій;
- причини змін вірусів та появи нових підтипів, варіантів та видів вірусів;
- еволюцію вірусів та прогнозування розвитку вірусних хвороб.

Концепція співіснування клітинних організмів з вірусами:

- регулюючими чинниками є чисельність популяції клітинних організмів та неоднорідність популяції вірусів;
- збільшення кількості чутливих організмів викликає підвищення вірулентності вірусів;
- зменшення кількості чутливих організмів викликає зниження вірулентності вірусів та появу авірулентних варіантів вірусів;
- збільшення часу перебування вірусів у навколишньому середовищі знижує вірулентність вірусів, а передавання вірусу без виходу у зовнішнє середовище може збільшувати вірулентність.

Місце вірусів у біосфері визначається тим, що віруси є автономними генетичними структурами і можуть виконувати роль внутрішньобіосферних передавачів генетичної інформації:

1. Бактеріофаги (фаги) можуть захоплювати частину геному однієї бактерії і переносити її в іншу (помірні фаги інтегрують в ДНК бактерій і можуть «відривати» ділянки ДНК бактерій під час репродукції).

Молекулярна вірусологія

2. Популяція вірусів рослин, найпростіших, тварин і людини швидко передає генетичну інформацію під час інфікування більшості особин конкретного виду.

Епізоотичний процес – процес взаємодії популяцій збудників хвороб та тварин, що характеризується чергуванням виникнення, поширення та згасання інфекційних захворювань. Закони епізоотичного процесу вивчає наука **епізоотологія**. **Антропонози** – інфекційні захворювання людини. **Антропозоонози (зооантропонози, в медичній літературі зоонози)** – інфекційні захворювання, спільні для людини і тварин. **Епізоотія** – широке поширення інфекційного захворювання в області чи країні. **Панзоотія** – поширення інфекційного захворювання в кількох країнах чи континентах. **Міжепізоотичний період** – період між епізоотіями.

Схема циркуляції вірусів у природі (Ланки епізоотичного процесу):

- джерело збудника інфекції – тварини, в організмі яких є збудник (клінічно хворі тварини, вірусоносії, резервуари вірусу в природі);
- фактори передачі – об'єкти неживої природи, де є збудник (предмети, вода, повітря, ґрунт);
- механізми (шляхи) передачі – еволюційно сформований спосіб переміщення збудника від джерела збудника інфекції до сприйнятливої тварини: аліментарний, контактний, аерогенний, трансмісивний, вертикальний.

Механізми передавання вірусів: трансмісивний шлях (векторний) – передавання кровосисними членистоногими, при лікувальних процедурах.

Вертикальний: трансплацентарний (савці), трансваріальний, трансфазний (птахи, членистоногі). Аліментарний (фекально-оральний) – з їжею та водою. Контактний – при безпосередньому контакті тварин або через предмети. Аерогенний (повітряно-крапельний) – з повітрям, яке тварини вдихають.

Практичний блок

Способи передачі вірусів рослин. Рослини-індикатори

Мета роботи. Опанувати методику механічного ураження вірусом рослин-індикаторів різними способами.

Матеріали та обладнання: здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорт Імунний 580, дурману *Daturastramonium* L, лободи *Chenopodium amaranticolor*, квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* L. у стадії 4-х справжніх листків; віруси – вірус тютюнової мозаїки, Х-вірус картоплі; абразив – карборунд; скляні палички; 0,5л колби з дистильованою водою; фосфатний буферний розчин рН 7,4; 0,5-1,0 л склянки з дезрозчином; етикетки для рослин; маркери.

Хід роботи

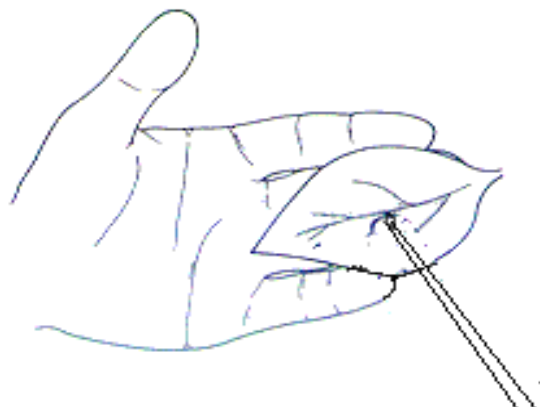
1. Провести маркування дослідних та контрольних рослин із зазначенням вірусу, яким проводиться інокуляція, способу механічного ураження та дати ураження. (Наприклад: ВТМ, укол в центральну жилку листку, 23.01.03). При механічному ураженні рослин методом втирання інокулюму у листову пластинку умовно поділити її на дві половини, одна з яких буде контрольною, інша дослідною.
2. Посипати листову пластинку карборундом, втерти скляною паличкою в контрольну половинку буферний розчин, у дослідну – вірусний препарат (рис. 5.4.1а).
3. Після 10 хв інкубації карборунд та надлишок вірусного матеріалу змити дистильованою водою у стакани з дезрозчином.
4. Іншу рослину уразити уколом в центральну жилку (рис. 5.4.1б).
5. Помістити рослини у теплицю без світла на одну добу, а потім спостерігати за рослинами при стандартному освітленні.

Молекулярна вірусологія

6. Через тиждень провести облік результатів та зробити висновки.

Контрольні завдання

1. Замалювати до альбому морфологію двох вірусів рослин та симптоми їх ураження на трьох видах рослин.
2. Скласти схему способів передачі для трьох вірусів рослин (ВТМ, ВОМ, ВЖКЯ).
3. Запропонувати спектр рослин-індикаторів для розділення суміші ВТМ та ХВК.



а)



б)

Рис. 5.4.1. Способи ураження рослин фітовірусами: а – механічна інокуляція з використанням карборунду, б – інокуляція уколом в жилку (Кирай З. и др., 1974).

Виділення, очистка та концентрування вірусів рослин

Мета роботи. Опанувати методику механічного ураження вірусом рослин-індикаторів різними способами.

Розділ 5

Матеріали та обладнання:

здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорт Імунний 580, дурману *Daturastramonium* L., лободи *Chenopodium amaranticolor*, квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* L. у стадії 4-х справжніх листків; віруси – вірус тютюнової мозаїки, Х-вірус картоплі; абразив – карборунд; скляні палички; 0,5л колби з дистильованою водою; фосфатний буферний розчин рН 7,4; 0,5 -1,0 л склянки з дезрозчином; етикетки для рослин; маркери.

Екстракція вірусів з рослини

Під екстракцією вірусу з рослини розуміється механічне руйнування тканин рослин (клітинних стінок і т.п.) для того, щоб вірус з клітин вийшов у отриманий рослинний сік. Механічне подрібнення тканини може відбуватися декількома шляхами, головними серед яких є перетирання у ступці та подрібнення у гомогенізаторі. Вибір методу гомогенізації залежить від морфології досліджуваного вірусу. Якщо віріони ниткоподібні і великої довжини, то гомогенізатори не можна використовувати, оскільки це може призвести до руйнування віріонів. Перетирання проводиться з додаванням буферного розчину для підтримання постійного значення рН, оскільки при перетиранні вивільняються рослинні ферменти і рН зменшується у кислоту сторону. Вибір буферу знову ж таки регламентується досліджуванним вірусом. Для кожного вірусу властиве своє значення ізоелектричної точки (таке рН розчину, при якому урівноважуються позитивні та негативні заряди поверхні віріонів і вони випадають в осад). Тому потрібно підбирати такий буфер для екстракції вірусів, щоб його рН не співпадало зі значенням ізоелектричної точки вірусу. Ізоелектрична точка більшості вірусів рослин знаходиться в кислотній зоні, тому для їх екстракції використовують буфери з нейтральною або помірно-лужною реакцією. Найчастіше використовуються фосфатний буфер (рН 7.4), тріс-боратний (рН 8.4), цитратний, карбонатний (рН 9.6), гліциновий,

Молекулярна вірусологія

трісовий та ін. Як вже було сказано, при перетиранні рослинних тканин вивільняються рослинні ферменти (поліфенолоксидази, каталази, пероксидази та ін.), які сприяють зниженню рН та безпосередньо руйнують віріони. Тому у буферні розчини рекомендується додавати хелатуючі речовини (наприклад ЕДТА), які інактивують рослинні ферменти. Це дозволяє утримати рН на потрібному рівні (тобто, вірус не випаде в осад при досягненні його ізоелектричної точки) і збільшити загальний вихід вірусу з тканини.

При виділенні вірусів рослин зазвичай наважку рослини розтирають у подвійному об'ємі відповідного буферу. Тобто, наприклад, 50 грамів рослинної тканини перетирають у 100 мл буферу.

Слід також зазначити, що гомогенізація тканини, як і всі наступні операції при виділенні та очищенні вірусів, повинні проводитися на холоді при 0-4°C. Для цього використовують охолоджений інструментарій, а тканини бажано гомогенізувати в рідкому азоті.

Освітлення екстракту органічними розчинниками

В результаті механічного руйнування уражених тканин отримується суспензія, що містить дуже розбавлений вірус, рештки клітин (мембрани, органели, уламки клітинної стінки та ін.) та пігменти. Тому наступним етапом є очистка первинної суспензії від вищеперерахованих сторонніх компонентів. Більшість з них містить ліпіди, тому використовуються органічні розчинники, які дозволяють розчинити ці ліпідвмісні компоненти, не пошкоджуючи вірус. Після застосування цих розчинників зелені пігменти розчиняються і надалі видаляються, тому вторинна суспензія буде вже не зеленого, а солом'яного кольору і прозора. З цієї причини даний етап і називається освітленням екстракту.

Слід зазначити, що деякі віруси рослин та багато вірусів тварин є складними і містять у своєму складі суперкапсидну оболонку, яка

Розділ 5

також складається з ліпідів. Тому, якщо досліджуваний вірус є складним, то при очищенні первинної суспензії не можна використовувати органічні розчинники, оскільки це призведе до деструкції віріонів.

Звичайно для освітлення використовують хлороформ або суміш хлороформу з бутанолом з розрахунку 1 об'єм розчинника на 7 об'ємів первинної суспензії. Наприклад, якщо після гомогенізації було отримано, приміром, 140 мл суспензії, то для її освітлення потрібно додати 20 мл органічного розчинника.

Після додавання розчинника отриману суміш інтенсивно струшують протягом 15-20 хв у герметичному посуді для кращого розчинення клітинних компонентів. Надалі суміші дають відстоятися на холоді протягом 10-15 хв. В результаті в суспензії утворюється 2 фази: верхня водна, де міститься шуканий вірус (оскільки вірус не розчиняється в розчиннику), та нижня фаза, що містить органічний розчинник з усіма розчиненими у ньому клітинними компонентами. Відбирається верхня водна фаза з вірусом, а нижня видаляється. Надалі ця фаза центрифугується на низькошвидкісній центрифугі (5-10 тис. об/хв) протягом 15-20 хв для остаточного видалення органічних компонентів. Центрифуга також повинна мати рефрижератор для охолодження. У результаті центрифугування отримується вторинна освітлена суспензія, що містить розбавлений вірус.

Концентрування вірусної суспензії

На наступному етапі потрібно концентрувати розбавлений вірус. Це можна зробити декількома методами, серед яких:

- осадження вірусу в ізоелектричній точці;
- висолювання;
- діаліз;
- хроматографія (іонообмінна, афінна);
- гель-фільтрація;

Молекулярна вірусологія

- диференційне центрифугування (з етапом ультрацентрифугування).

Осадження вірусу в ізоелектричній точці. рН отриманої суспензії доводять до ізоелектричної точки вірусу. В результаті цього вірус починає випадати в осад. Витримавши 1-2 год при даному рН суспензію, її центрифугують на невеликих швидкостях протягом 15-30 хв, вірус утворює осад на дні пробірки. Недоліком методу є порівняно малий вихід вірусу (не всі віріони випадають в осад), а також те, що деякі віруси є чутливими до зміни рН, що може призвести до руйнування віріонів.

Висолювання. Білкова оболонка вірусу має зовні гідрофобні зони (їх наявність зумовлена амінокислотним складом капсидних білків), які впорядковують навколо себе молекули води у розчині буферу. Внесення у суспензію солей у дуже високих концентраціях призводить до того, що іони солі сольватуються (тобто, відтягують на себе вільні молекули води) і гідрофобні зони капсидних білків вірусу втрачають молекули води. Наслідком цього є агрегація віріонів та їх випадання в осад. Для висолювання найчастіше використовуються сульфати та фосфати, наприклад, сульфат амонію. Недоліком методу може бути відсутність в зовнішніх ділянках капсиду гідрофобних амінокислот, і тоді навіть при дуже високих концентраціях солі вірус не випадатиме в осад.

Диференційне центрифугування

На сьогодні цей метод разом з численними модифікаціями є найбільш уживаним у вірусології. Суть методу полягає у чергуванні циклів низькошвидкісного та високошвидкісного центрифугування. **Перший цикл** – низькошвидкісний – є, по суті, етапом освітлення первинної суспензії від важких клітинних компонентів (5-10 тис.об/хв, 15-30 хв). Надалі на другому етапі здійснюють високошвидкісне центрифугування (30 тис.об/хв або 100 тис. g, 1-24 год). При цьому все, що є в суспензії (а після першого циклу там має бути мало клітинних компонентів і порівняно багато вірусу), осідає на дно

Розділ 5
пробірки. Після цього отриманий осад, що містить зконцентрований вірус, розчиняють (ресуспендують) у мінімальному об'ємі буфера, який надалі знову центрифугують на малих швидкостях для видалення не очищених раніше клітинних компонентів. Таким чином, отримується кінцева суспензія вірусу у високій концентрації (вірус з усієї рослини, розтертий, наприклад, у 100 мл буфера, буде зконцентрований до 0.5мл об'єму кінцевої суспензії).

При високошвидкісному центрифугуванні вірусний препарат можна наносити на подушку сахарози для кращого очищення суспензії або ж на градієнт сахарози для розділення суспензії на фази.

Виділення, очистка та концентрування вірусів рослин

Мета роботи: Опанувати методику механічного ураження вірусом рослин-індикаторів різними способами.

Матеріали та обладнання:

здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* сорт Імунний 580 дурману *Datura stramonium* L, лободи *Chenopodium amaranticolor*, квасолі зичайної *Phaseolus vulgaris* L.у стадії 4-х справжніх листків; віруси – вірус тютюнової мозаїки, Х-вірус картоплі; абразив – карборунд; скляні палички; 0,5л колби з дистильованою водою; фосфатний буферний розчин рН 7,4; 0,5 -1,0 л склянки з дезрозчином; етикетки для рослин; маркери.

Завдання: Оволодіти методикою отримання вірусемічного матеріалу із хворих рослин.

Матеріали та обладнання: рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium* L сорт Імунний 580, *Datura stramonium* L, *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris* L. із симптомами вірусного захворювання, фосфатний буферний розчин рН 7,4, штатив з пробірками, лійки, марля, центрифужні

Молекулярна вірусологія

пробірки, піпетки на 1-5 мл, ступки з товкачиком, дезінфікуючий розчин, терези з різноважками, низькошвидкісна центрифуга, еппендорфи.

Хід роботи

1. Замалювати у альбом симптоми на рослинах, з яких буде отримано вірусемічний матеріал.
2. Відібрати та зважити 500 мг листку ураженої рослини, перенести у ступку та додати 3 мл фосфатного буферного розчину, рН 7,4 та розтерти рослинний матеріал.
3. Через марлю відфільтрувати рослинний сік у пробірку.
4. Перенести матеріал у центрифужну пробірку, урівноважити з пробірками інших студентів для центрифугування.
5. Відцентрифугувати сік ураженої рослини у режимі 4 000 об/хв 20 хв.
6. Після центрифугування відібрати та перенести надосад у еппендорф, підписати його та помістити у холодильник для подальших досліджень.

Контрольні завдання.

1. Скласти схему виділення ліпідвмісних вірусів.
2. Скласти схему виділення вірусів з різною ізоелектричною точкою.
3. Порівняти методи виділення вірусів для електронної мікроскопії та для пасування на рослинах.
4. Порівняти схеми виділення вірусів рослин для отримання антивірусної сироватки та для накопичення вірусу.
5. Зазначити методи які: а) використовуються тільки для очистки вірусних препаратів; б) використовуються як для очищення, так і концентрації фітовірусів.

Питання до самоконтролю:

1. Щодо віроїдів можна стверджувати:
а) є довірусними агентами, які викликають повільні вірусні інфекції ЦНС

Розділ 5

- б) є довірусними інфекційними агентами, які викликають деякі хвороби рослин
- в) відносяться до вірусів, що викликають гострі енцефаліти
- г) є вірусами, геном яких може інтегруватися в ДНК клітини

2. Гіпоплазія це:

- а) розростання тканин при надмірному діленні кліти
- б) придушення диференціації і росту клітин
- в) багатоядерність клітин
- г) збільшення кількості плазмодесм

3. Надчутлива реакція рослини у відповідь на проникнення вірусу обумовлена:

- а) наявністю гену стійкості
- б) апоптозом клітини
- в) токсичним впливом патогену щодо клітини
- г) наявністю гену авірулентності

4. Векторна передача фітовірусів відбувається за допомогою:

- а) насіння
- б) рослинного соку
- в) комах
- г) коріння

5. Речовина, що пригнічує інфекційну здатність вірусу:

- а) арбідол
- б) стерол
- в) інгібітор
- г) праймер

6. РНК вірусів яка приймає участь у трансляції:

- а) дволанцюгова РНК
- б) (+) РНК
- в) (-) РНК
- г) трьох ланцюгова модифікована

7. Синтез комплементарного ланцюга РНК на матриці ДНК називається:

- а) реплікацією
- б) транскрипцією
- в) трансляцією

Молекулярна вірусологія

г) процесингом

8. У ретровірусів геном:

- а) Гаплоїдний
- б) Диплоїдний
- в) Триплоїдний
- г) Тетраплоїдний

9. У ретровірусів геном представлений:

- а) Молекулою ДНК
- б) Двома ідентичними молекулами РНК
- в) Молекулою РНК
- г) Суперспіралізованою молекулою ДНК

10. Кількість генів у РНК-геномних вірусів складає:

- а) 1 – 2
- б) 4
- в) 5 – 15
- г) 20

Тема 5.5. Методи дослідження вірусів

**5.5.1. Мікроскопічні методи дослідження.**

Розміри більшості віріонів знаходяться за межами роздільної здатності світлового мікроскопа. Проте, світлова мікроскопія є корисним методом для дослідження заражених вірусом клітин або для визначення флуоресцентних барвників, пов'язаних з молекулами антитіл, що зв'язалися з вірусними антигенами.

Особливо корисною у вірусології може виявитися конфокальна мікроскопія.

Більшість досліджень структури віріонів або заражених вірусом клітин були проведені з використанням електронного мікроскопа. Використання різних методів електронної мікроскопії дозволяє вивчати як внутрішню структуру віріонів, так і їх тривимірну будову. Для отримання тривимірних зображень

Розділ 5

використовують зокрема криоелектронну мікроскопію у поєднанні з комп'ютерною томографією.

Тонкі деталі тривимірної будови вірусів, вірусних нуклеїнових кислот і білків також вивчають за допомогою рентгеноструктурної кристалографії. Для цього методу отримують кристали віріонів або молекул, які необхідно вивчити. Далі кристали поміщаються в рентгенівські промені, які зазнають дифракцію завдяки побудові атомів і/або молекул, що повторюється. Аналіз характеру дифракції дозволяє встановити відносні позиції молекул і атомів. Корисну інформацію стосовно структури вірусів дають також такі методи, як ядерний магнітний резонанс і атомна силова мікроскопія, електрофорез в гелі агарози або поліакриламідю.

5.5.2. Визначення вірусів і їх компонентів.

Для визначення вірусів і вірусних компонентів були розроблені численні методи, які використовують зокрема для діагностики вірусних захворювань. Ці методи можна розподілити на чотири категорії:

1. Виявлення віріонів.
2. Визначення інфективності вірусів.
3. Виявлення вірусних антигенів.
4. Виявлення нуклеїнових кислот вірусу.

Виявлення віріонів. Зразки можна негативно забарвити і досліджувати в електронному мікроскопі на присутність віріонів. Обмеженнями такого підходу є висока вартість устаткування і невисока чутливість; мінімально виявлювана концентрація віріонів складає 10^6 /мл.

Виявлення вірусних антигенів. Вірусні антигени виявляються з використанням специфічних для вірусу антисироваток або моноклональних антитіл. У більшості подібних методів позитивні результати виявляють по присутності мітки, яку прикріплюють або до антивірусних антитіл (прямий тест), або до вторинних антитіл.

Молекулярна вірусологія

Антивірусні антитіла отримують при введенні вірусних антигенів тварині одного виду; вторинні антитіла отримують при введенні імуноглобулінів з тваринного першого виду тварині другого виду (рис. 5.5.1.).

До антивірусних антитіл можуть бути прикріплені різні види міток, які можуть виявлятися різними методами.

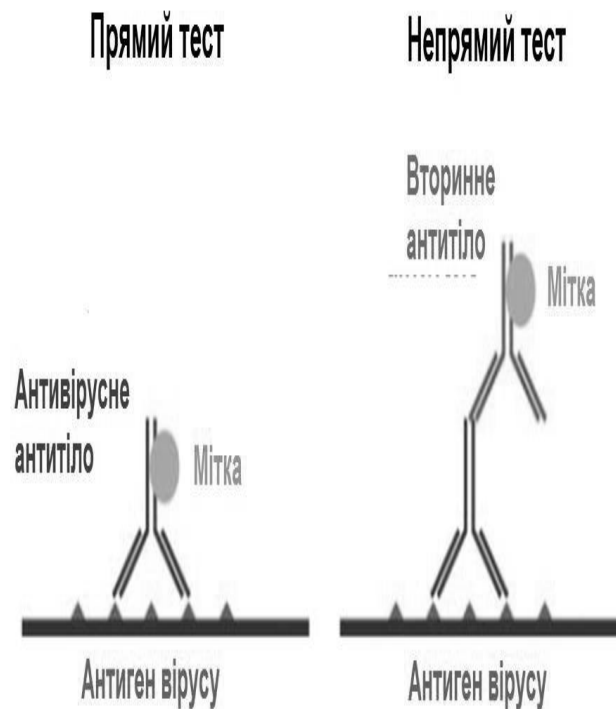


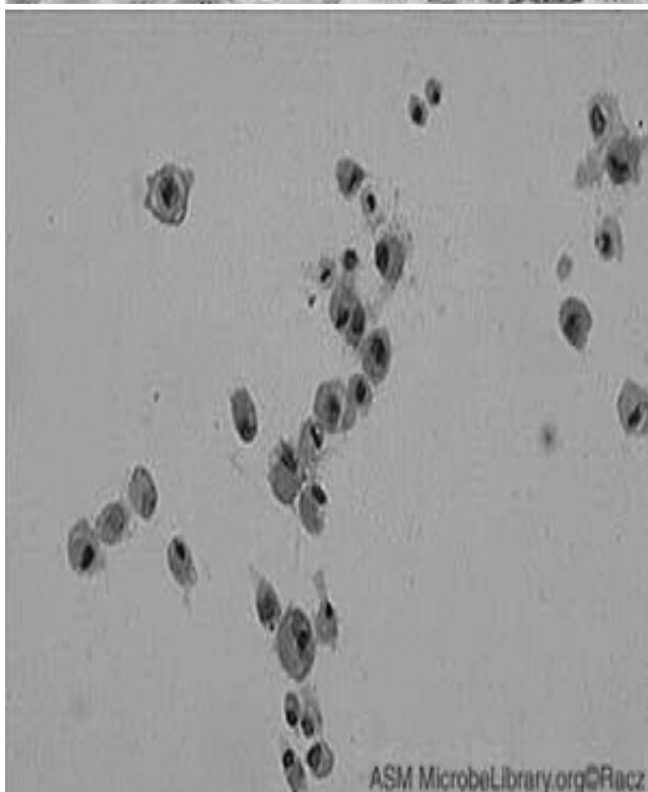
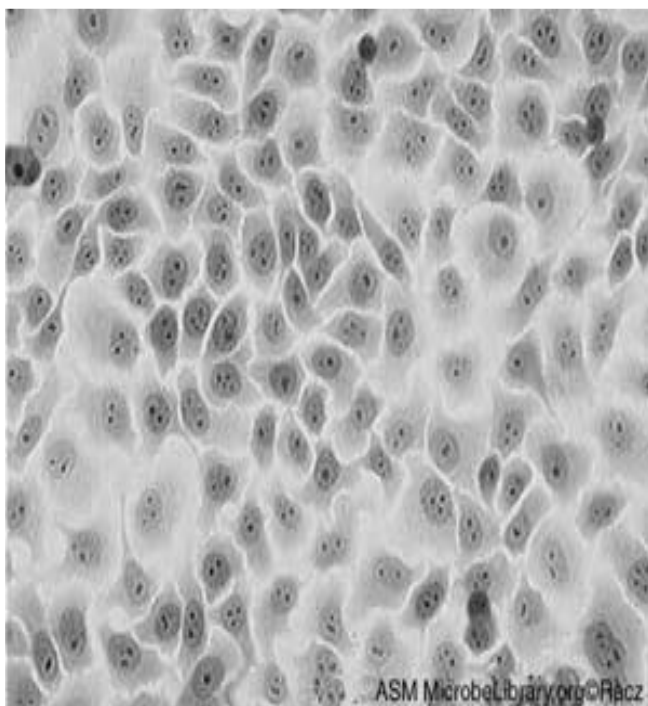
Рис.5.5.1 Визначення вірусних антигенів з використанням мічених антитіл. (<http://www.virology.ws/2010/09/30/detecting-viral-proteins-in-infected-cells-or-tissues-by-immunostaining>)

Визначення інфективності вірусів

Не усі віріони мають здатність реплікуватися в клітинах хазяїна. Ті віріони, які здатні церобити, називають "інфективними", і термін "інфективність" використовують для позначення здатності вірусів реплікуватися. Віріони можуть бути не інфективними через відсутність частини генома або через пошкодження.

Для встановлення, чи містять зразки інфективні віруси, ними можна інокулювати культуру клітин або організм хазяїна, для якого відомо, що він підтримує реплікацію вірусів, присутність яких очікується в зразку. Після інкубації культури клітин при відповідній температурі під світловим мікроскопом можна

Розділ 5
визначити, чи з'явилися в клітинах характерні зміни, які є результатом ушкодження клітин вірусом. Зміни такого типу називають цитопатичним ефектом вірусу (рис.5.5.2).



Цитопатичні ефекти, викликані реплікацією поліовірусу і вірусу простого герпесу в культурі клітин Vero (клітини нирки мавпи).

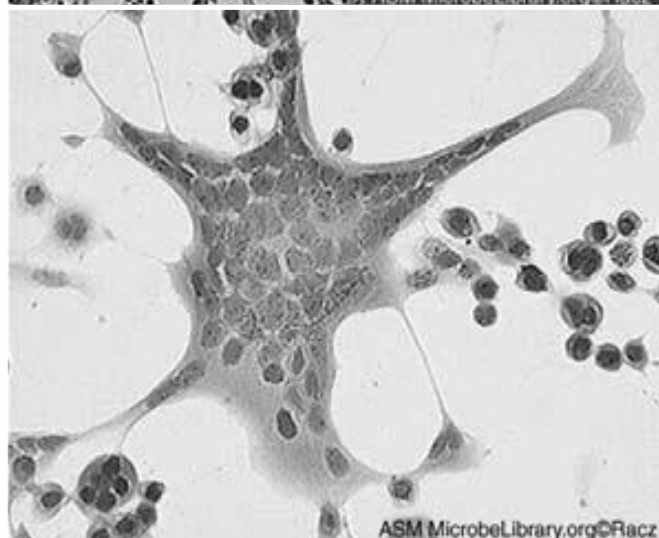
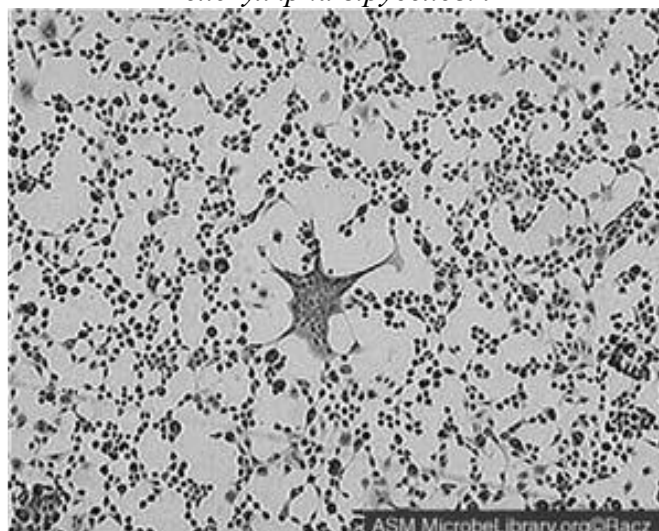


Рис. 5.5.2 Клітини, уражені вірусом звичайного герпесу.

(<https://www.asmscience.org/content/education/protocol>)

Практичний блок

Використання електронної мікроскопії у вірусологічних дослідженнях

Теоретична частина

Однією з особливостей представників царства *Vira* є те, що вони мають субмікроскопічні розміри, їх неможливо досліджувати за допомогою світлового мікроскопу.

Діагностика вірусів за допомогою ЕМ базується на ідентифікації вірусів за їх характерною морфологією. Головна перевага діагностики за допомогою ЕМ – можливість візуалізувати вірус. Інша перевага методу ЕМ –

Розділ 5

це швидкість діагностики, препарат може бути розглянутий протягом декількох хвилин після приготування препарату з вірусвмісної рідини.

Біологічні об'єкти складаються з речовин з малими атомними номерами - водню, вуглецю, азоту, фосфору та ін. Густина ρ для різних біологічних об'єктів складає від 1 до $2\text{г}/\text{см}^3$. Мінімальна товщина біологічного об'єкту такої щільності, яка виявляється при прискорюючій напрузі в електронному мікроскопі 50кВ, дорівнює приблизно 50 А. Практично не контрастовані частки невеликих вірусів, розташовані на підтримуючій плівці, спостерігаються в електронному мікроскопі в вигляді безструктурних плям, а окремі неконтрастовані молекули нуклеїнових кислот взагалі неможливо спостерігати. Але завдання сучасної електронної мікроскопії в біології - по можливості глибше вникнути в будову клітини та її структурних компонентів, в будову вірусних часточок. В зв'язку з цим біологічні об'єкти необхідно тим чи іншим чином контрастувати.

Біологічні макромолекули, для того щоб їх можливо було досліджувати в електронному мікроскопі, розміщуються на тонесеньких плівках-підкладках. В свою чергу опорою для цих плівок слугують спеціальні сітки, виготовлені з міді електролітичним способом або сплетені з тонкого дроту. Ті ж електрони, які формують зображення досліджених об'єктів, взаємодіють зплівкою-підкладкою. Тому, якщо товщина плівки відносно велика або матеріал, з якого вона зроблена, сильно розсіює електрони, контрастність зображення розміщеного об'єкту різко погіршується. Матеріал плівки повинен бути механічно міцний, мати значну теплопровідність та стійкість до бомбардування електронами.

Для приготування плівок використовується 0,1-0,2%-ний розчин формвара (поліфінілформальдегіда). Розчинниками можуть бути діоксан, діхлоретан, хлороформ. Розчин слід готувати за одну добу до використання, зберігати в посуді з

Молекулярна вірусологія

притертою кришкою в темному місці, строк придатності до 6 місяців.

Методи контрастування вірусів.

Віруси є електронно-оптичнопрозорими. Найбільш ефективним підходом є хімічне контрастування – штучне збільшення електронної щільності ультраструктур. За рахунок осадження електронно-щільних речовин контрастування може бути позитивним – підсилення електронної щільності досліджуваних структур порівняно з фоном, який оточує об'єкт, та негативним – збільшення електронної щільності фону.

Позитивне контрастування.

Для контрастування найчастіше використовуються ураніацетат (УА) та цитрат свинцю.

Для позитивного контрастування за допомогою УА використовують 2% або насичений розчин у 50, 70 або 100% етанолі чи метанолі. УА добре проникає в тканини тому він частіше використовується для контрастування зрізів тканин, уражених вірусами.

З іонів свинцю для контрастування біологічних об'єктів частіше за все використовується цитрат свинцю (ЦС), рідше гідроксид свинцю, ацетат та інші солі. ЦС зв'язується з негативно зарядженими компонентами, такими як гідроксильні групи та реагуючі з осмієм частини. В цей процес залучені також фосфатні групи.

Метод негативного контрастування.

Негативне контрастування забезпечує отримання високого розподілу при дослідженні біологічних макромолекул та ізольованих ультраструктур. При цьому навкруги вірусу утворюється гомогенний фон речовини високої електронної щільності (рис. 5.5.3.). Методика проста та не вимагає багато часу. Цей метод рідко використовується для тканинних зрізів.

Сутність методу полягає в тому, що біологічний об'єкт занурюють у речовину високої електронної щільності, в результаті чого малоконтрастний зразок стає більш чітким порівняно з оточуючим темним фоном. В цьому

Розділ 5

випадку отримується негативний ефект. Частіше використовуються 1-2%-ний розчини фосфорновольфрамової кислоти (ФВК) або ураніацетату (2-5%) на дистильованій воді. Розподільча здатність цього методу вища, ніж методу віддтінення, і досягає 12 А.

Існують різні способи нанесення зразків на підкладинку.

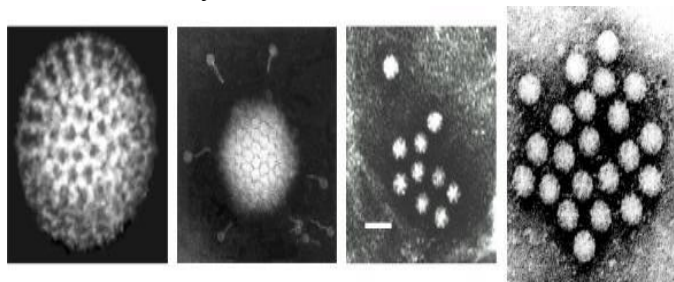


Рис. 5.5.3. Електронномікроскопічні зображення вірусів, отримані за допомогою негативного контрастування зліва направо: rotavirus, adenovirus, astroviruses, Norwalk-likeviruses. (Linda M. Stannard, University of Cape Town)

Метод краплі.

На взяту пінцетом сіточку з підкладинкою наносять краплю зависі об'єкту. Через 1 хв після адсорбції об'єктів на сіточку наносять краплю розчину для негативного контрастування. Надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером. Вміщують сіточку в контейнер. Після 15-30 хв. зразок може бути досліджений в ЕМ.

Метод флотації.

Сіточку з підкладинкою вміщують на поверхню краплі вірусвмісного матеріалу об'єкту. За 1 хв об'єкт встигає адсорбуватися на поверхні підкладинки. Потім сіточку з об'єктом переносять на розташовану поруч краплю розчину негативного контрастера на 30 с та висушують.

Метод напилення.

Розчин барвника змішують з суспензією об'єкту та напиляють на підкладинку. Але при роботі з патогенними об'єктами (вірусами) така процедура являє собою велику небезпеку для здоров'я працівників. Завис матеріалу зазвичай готують в 1%-ному водному розчині контрастера та за допомогою пульвелізатора або за допомогою піпетки наносять на

Молекулярна вірусологія

поверхню сіточки з підкладинкою. Сіточки висихають майже миттєво, та утворюється тонка плівка барвника, яка містить в собі об'єкт.

Контрастування відтіненням.

При контрастування за методом відтінення проводиться випаровування металу в вакуумі. Атоми металу розлітаються від місця випаровування по прямолінійним траєкторіям. Якщо під деяким кутом по направленню до пучка часток, що розпилюються, розташувати дослідний об'єкт, то на його поверхні буде осідати шар металу різної товщини. На ділянках, розташованих перпендикулярно до направлення льоту часток, утворюється більш товстий шар. В тих місцях, де об'єкт буде екранувати пучок часток, утворюються «тіні». Розсіювання електронів для різних ділянок об'єкта є різним, в результаті чого контрастність зображення підвищується. В зв'язку з специфічним явищем утворення тіні кут між направленням часток, що розпилюються, і об'єктом називається «кутом віддтінення», а сам метод – «методом відтінення».

Хід роботи

1. Чисте предметне скельце швидко занурити в розчин формвара, через 5-10с скло витягти та підсушити (сушити слід 4060 с до зникнення запаху розчинника). Плівку, що утворилася на склі, можна виявити, якщо подихати на скло (рис. 5.5.4).

2. Отриману плівку підрізати лезом бритви, потім зняти плівку на воду (скло повільно занурити у воду під кутом 45°). На плівку викласти сітки і зняти їх за допомогою фільтрувального паперу. Сітки з плівкою висушуються та зберігаються в чашках Петрі.

3. На сітку з плівкою нанести краплю суспензії вірусних часток. Рідину відбирають фільтрувальним папером через 30-60с, сітку висушують.

4. На сіточку нанести краплю контрастуючої речовини і через 1 хв відбирають рідину; після просушування препарат готовий для дослідження.

Розділ 5

5. Дослідити препарати в електронному мікроскопі.

6. Визначити розміри вірусних часточок за допомогою отриманих електронномікроскопічних знімків.

За допомогою лінійки виміряти довжину та діаметр вірусних часточок на електронній мікрофотографії. Визначити середнє значення. Порівняти отримане число з лінійкою в кутку фотографії (в 1 см кількість нанометрів). Визначити розміри часточок в нанометрах.

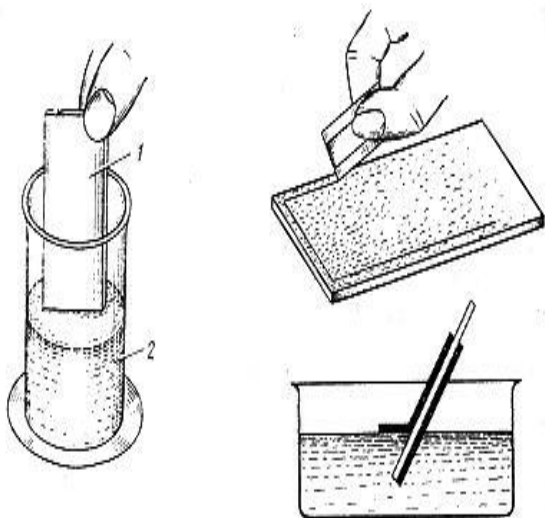


Рис. 5.5.4. Приготування плівок-підкладінок формвару. 1- предметне скельце; 2 – стаканчик з розчином формвару. Щербатюк М. М., Бриков В. О., Мартин Г. Г. Підготовка зразків рослинних тканин для електронної мікроскопії (теоретичні та практичні аспекти): метод. посіб Київ. : Талком, 2015. – 62 с.

Питання до самоконтролю:

1. Які з вказаних методів дозволяють розглянути вірусні включення в клітині?

- світлова мікроскопія
- електронна мікроскопія
- реакція преципітації
- імуноферментний аналіз

2. Для електронно-мікроскопічного дослідження вірусів обов'язковою умовою є:

- контрастування препаратів
- фіксація вірусу альдегідами або спиртами
- знежирене предметне скельце
- імерсійна рідина

Молекулярна вірусологія

3. Праймер це:

- короткий ланцюг нуклеотидів, що слугує затравкою для синтезу нового ланцюга
- послідовність нуклеотидів на яких зупиняється синтез нового ланцюга
- коротка некодуюча послідовність нуклеїнової кислоти
- послідовність нуклеїної кислоти, що кодує білок

4. Які методи застосовують для врахування результатів полімеразної ланцюгової реакції?

- імуноферментний аналіз
- електрофорез
- реакцію нейтралізації
- встановлюють спектр погинання нуклеїнової кислоти

5. Які з перерахованих методів відносяться до серологічних?

- хроматографія
- висолювання
- ІФА
- ПЛР

6. Які відомості про вірус можна отримати за допомогою електронної мікроскопії?

- концентрація
- механізм транспорту
- форма вірусу
- тип нуклеїнової кислоти

7. З якою метою використовують метод рослин – індикаторів?

- діагностика
- розповсюдження вірусів
- вивчення генетичної структури вірусів
- отримання безвірусного посадкового матеріалу

8. З якою метою в фітовірусології використовуються методи біотехнології?

- отримання безвірусного матеріалу
- діагностики
- ідентифікації вірусів
- культивування вірусів на середовищах

Розділ 5

9. Серологічні методи використовують для:

- освітлення фільтрату
- діагностики
- концентрації вірусів
- очистки вірусів

10. До серологічних методів діагностики не відносять:

- імуноферментний аналіз
- реакцію преципітації
- імунодифузю
- імуноседиментацію

Тема 5.6. Методи виділення вірусів



5.6.1. Диференціальне центрифугування.

Після того, як вірус розмножений, зазвичай необхідно очистити його від залишків клітини інших забруднюючих матеріалів, оскільки для досліджень, для приготування вакцин або для інших цілей найчастіше використовують очищені вірусні частки. Звичайним методом очищення є центрифугування; часткове очищення досягається диференціальним центрифугуванням, і найвища міра очищення досягається центрифугуванням в градієнті щільності.

Диференціальне центрифугування включає центрифугування з низькою швидкістю, після якого більшість віріонів залишаються в надосадковій рідині, і високошвидкісне центрифугування, після якого віруси випадають в осад у вигляді гранул (рис.5.6.1). На першому етапі центрифугування проводять, наприклад, при 10 000 g 20 хвилин, а на другому етапі – при 100 000 g 2 години. Таким чином отримують препарат частково очищених віріонів. При центрифугуванні в градієнті щільності, вірусні частки або молекули типу нуклеїно-вих кислот центрифугують в розчині із зростаючою

Молекулярна вірусологія

концентрацією і відповідно щільністю. В якості речовини, що розчиняється, використовують добре розчинні з'єднання; дуже часто використовується сахароза.

Є два типи центрифугування в градієнті щільності: швидкісне зональне і рівноважне зональне центрифугування (рис.5.6.2.). При швидкісному зональному центрифугуванні частково очищені віріони наносять на поверхню градієнта; далі частки рухаються крізь градієнт, при цьому швидкість їх руху залежить від коефіцієнта седиментації. Величина цього коефіцієнта обумовлена в основному розміром часток. Однорідні частки, такі як віріони вірусу, рухаються в градієнті у вигляді єдиної смуги, яку надалі можна зібрати. Центрифугування закінчують, коли частки ще не досягають дна пробірки.

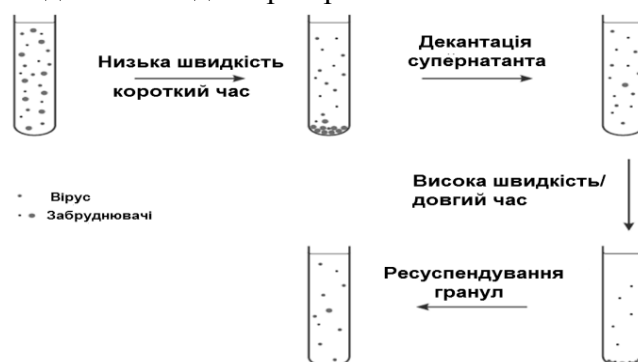


Рис.5.6.1. Часткове очищення віріонів диференціальним центрифугуванням.

https://mycology.univer.kharkov.ua/wp-content/uploads/2016/05/Virology_lectures.pdf



- Вірус
- Забруднювачі

Рис.5.6.2. Очищення віріонів швидкісним зональним або рівноважним зональним центрифугуванням.

https://mycology.univer.kharkov.ua/wp-content/uploads/2016/05/Virology_lectures.pdf

При рівноважному зональному центрифугуванні концентрацію розчину, що

Розділ 5

створює градієнт, підбирають так, щоб щільність внизу градієнта була гарантовано більше щільності часток, які очищаються. Частки суспендують в градієнті, і потім при центрифугуванні вони переміщуються в ту зону градієнта, в якій щільність розчину така ж, як і у них. Плаваючі щільності віріонів в градієнті розчину хлористого цезію використовують як однієї з характеристик вірусних віріонів

5.6.2. Індикація та ідентифікація вірусів.

Індикацію вірусу в культурі клітин здійснюють за цілою низкою специфічних і неспецифічних змін, що виникають у процесі їх репродукції.

До специфічних змін у культурах клітин належить:

Цитоплазматична дія (ЦПД) – її визначають як комплекс морфологічних змін у процесі взаємодії вірусу з клітиною.

Включення, які розглядають як: а) вогнища репродукції вірусу в клітині; б) накопичення вірусних часток або молекул їхніх білків; в) реакцію клітин на присутність у них вірусу.

Включення поділяють, залежно від розташування, на ядерні (віруси герпесу, аденовіруси, поліомавіруси, флавівіруси та ін.), цитоплазматичні (віруси віспи, грипу, розповіді тощо) та мішані. Залежно від чутливості до барвника виділяють базифільні й ацидофільні включення. Їх також групують за розмірами, формою, чисельністю тощо.

Бляшкоутворення – здатність вірусів у присутності поживного покриття різного складу до локального розмноження в клітинній культурі з наступним руйнуванням сусідніх клітин і формуванням у клітинному моношарі дефектів – вірусних бляшок. Кожна бляшка формується як результат розмноження однієї вирусної частки, та відповідає одній бляшкотворній одиниці (БТО) інфекційної активності вірусу.

Реакція гемадсорбції – це здатність клітин, інфікованих вірусом, адсорбувати на своїй поверхні еритроцити. Ця реакція

Молекулярна вірусологія

характерна для представників батьківщин вірусів, що мають гемаглютинін у складі суперкапсидної оболонки (родини Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae).

Кольорова (або метаболічна) проба, яка відбиває зміни метаболізму клітин у процесі репродукції в них вірусу, що впливає на показники рН культурального середовища.

Інтерференція – передбачає пригнічення цитопатичної дії одного вірусу під впливом іншого, або дією інтерферонів.

Суперінфікування – поява цитопатичних змін у культурі клітин під впливом іншого вірусу.

Імуофлюоресценція – специфічне світіння в культурах клітин, інфікованих вірусами, що виникає під дією ультрафіолетового проміння, у разі обробки сироватками, міченими флюорохромами.

У культурах клітин відбуваються такі неспецифічні зміни: проникність плазматичної мембрани, сегментування, локалізація хроматину в ядрі, хромосомні аберації (структурні зміни хромосом), зморщування або пікноз ядра, вакуолізація цитоплазми тощо.

У деяких випадках неспецифічні зміни можуть переходити у специфічні, наприклад, вакуолізуючий вірус SV-40 спричиняє утворення вакуолей у цитоплазмі клітин. Реєстрування таких змін дає підставу твердити про наявність або відсутність вірусу в культурі клітин. Належність вірусу до певного типу можна встановити лише за допомогою серологічних реакцій.

Титрування виділених вірусів проводять з метою кількісного визначення вмісту вірусних часток в одиниці об'єму досліджуваного матеріалу. Титрування є обов'язковим етапом як виділення вірусів з клінічного матеріалу, так і їх подальшого типізування та визначення біологічних властивостей збудника.

5.6.3. Культивування вірусів рослин.

Вірусологам потрібні методи культивування їх

Розділ 5

об'єктів досліджень. У переважній більшості випадків це означає, що віруси необхідно забезпечити відповідними клітинами, які вони можуть заразити і в яких може проходити їх реплікація. Бактеріофаги можна забезпечити клітинами бактерійної культури, віруси рослин можна культивувати в спеціально вирощуваних рослинах або в рослинних протопластах. Ймовірно, найскладніше культивувати віруси тварин. Для культивування фітопатогенних вірусів використовують сприйнятливі для них рослини. Рослина, у якій культивується вірус має бути:

1. придатною для нагромадження вірусу;
2. стійкою проти зараження іншими близькими вірусами;
3. не містити речовин, що інактивують дію вірусу;
4. стійкою до бактеріальних і грибкових захворювань. Віруси бактерій та грибів у лабораторних умовах вирощують тільки на чутливих до них мікроорганізмах, від яких фагів можна відокремити і очистити фільтрацією, ультрацентрифугуванням та іншими методами

Для культивування фітопатогенних вірусів найчастіше використовують молоді рослини, які добре ростуть, не мають будь-яких патологічних ознак і не містять у своїх клітинах високих концентрацій фенолів, слизів і камедей, рибонуклеази тощо, а також можуть інгібувати або незворотно осаджувати віруси. Такими рослинами, наприклад, можуть бути тютюн сорту Самсун для культивування вірусу тютюнової мозаїки, дурман для вирощування Х-вірусу картоплі. Тепер відома велика кількість рослин-індикаторів з різних ботанічних родин, що їх застосовують для культивування вірусів. Рослини-індикатори, умови, в яких вони вирощуються, і час, коли рослини можна використовувати для виділення вірусів, треба вибирати так, щоб вихідна концентрація вірусних частинок була якомога найвищою. За даними *Р. Метьюза (1973)*, концентрація багатьох вірусів досягає

Молекулярна вірусологія

максимуму через кілька днів або тижнів, а потім дуже швидко знижується.

Практичний блок**Методи діагностики вірусних інфекцій та ідентифікація вірусів. Серологічні методи дослідження****Серологічні дослідження проводяться методами:**

- реакція зв'язування комплементу (РЗК);
- реакція нейтралізації (РН);
- реакція затримки гемаглютинації (РЗГА);
- реакція непрямой гемаглютинації (РНГА);
- імуноферментний аналіз (ІФА);
- реакція віруснейтралізації флуоресціюючих антитіл (FAVN test) на культурі клітин.

Серологічний метод являє собою сукупність реакцій, заснованих на *взаємодії антиген-антитіло (Ag-Am)* і спрямованих на виявлення в сироватці крові та інших рідинах організму антитіл до антигенів збудників інфекційних хвороб, або власне мікробних антигенів.

Етапи серологічного методу:

1) *взяття матеріалів для дослідження.* У більшості випадків матеріалом є *сироватка крові*. Її отримують після утворення згустку крові, кров слід забирати в строго асептичних умовах за стандартною методикою,

2) вибір серологічної реакції для даного випадку залежить від мети дослідження, передбачуваного захворювання, фази хвороби, матеріалу для дослідження, чутливості реакції, можливостей конкретної лабораторії. Для виявлення Ат, а також Аг використовують реакції аглютинації (РА), пасивної гемаглютинації (РПГА), Імунофлюоресценції (РІФ), гальмування гемаглютинації (РГГА), *преципітації, флоккуляції*. Реакцію зв'язування комплементу (РСК) і ін.

3) постановка серологічної реакції,

Розділ 5

4) реєстрація серологічної реакції з метою визначення присутності серологічних маркерів інфекції.

Облік серологічних реакцій здійснюють візуально, іноді за допомогою лупи. Суть обліку серологічної реакції зводиться до визначення феномена зв'язування Аг і Ат за освітою комплексу Аг-Ат. Візуально освіту комплексу Аг-Ат супроводжується двома основними феноменами – аглютинацією і преципітацією.

Для кількісного представлення результатів серологічної реакції застосовують поняття титру антитіл або антигенів. Для визначення титру Ат (або титру Аг) необхідно поставити серологічну реакцію, приготувавши ряд розведень сироватки крові або іншого матеріалу (раститровати). При приготуванні розведень сироватки крові використовують розчин електроліту (найчастіше ізотонічний розчин хлориду натрію). Крок розведення (титрування) задається співвідношенням обсягу розчину електроліту і обсягу сироватки крові.

Практичний блок

Методи діагностики вірусних інфекцій та ідентифікація вірусів. Серологічні методи досліджень

Реакція гемаглютинації

Можливість використовувати еритроцити різноманітних тварин як індикатори, що дозволяють виявляти різні антигени або антитіла, була продемонстрована в 1902 р., коли *Р.Крауз* та *Д.Людвіг* вперше показали здатність стафілококів і вібріонів викликати аглютинацію еритроцитів. *Г. Херст* в 1941р. помітив, що при розтині заражених грипом ембріонів кров, яка витікала з пошкоджених судин, при змішуванні з вірусмісною алантоїсною рідиною збиралась в конгломерати з червоних кров'яних тілець.

Молекулярна вірусологія

Принцип реакції гемаглютинації заключається в тому, що аглютинація відбувається за рахунок адсорбції вірусних часток на поверхневих рецепторах еритроцитів різноманітних видів тварин (без участі в реакції специфічних антисироваток). Ця властивість зумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків (у простих вірусів це білки капсиду, у складних – глікота ліпопротеїни суперкапсиду), які дістали назву гемаглютининів, з поверхневими білками еритроцитів (глікопротеїнами). В результаті такої адсорбції еритроцити склеюються один з одним, що призводить до утворення агрегату, який осідає на дно пробірки чи лунки планшету тонкою плівкою у вигляді перевернутої парасольки (повна аглютинація). Якщо ж реакція не відбулась, тобто в розчині відсутні гемаглютинуючі віруси, то еритроцити осідають на дно щільним осадом.

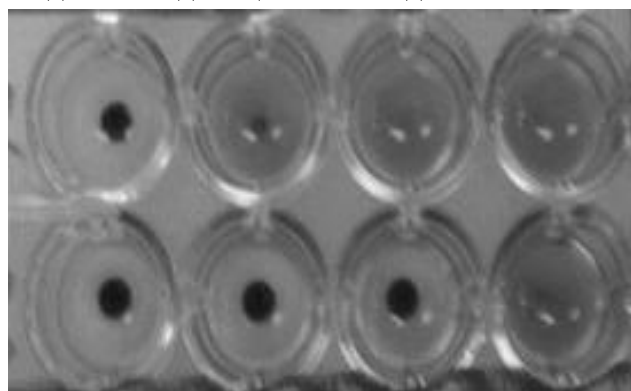


Рис. 5.6.3. Врахування результатів реакції гемаглютинації.

(<https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/hemagglutination>)

Для реакції використовують завис еритроцитів від 0,25 до 3%, але найбільш оптимальною є 0,5 – 1,5% завис. Для її приготування свіжоотриману кров дефібринують механічно (за допомогою стерильних намистин), або використовуючи антикоагулянти (2,5 – 5% розчин цитрату натрію, Альсевера, гепарину). Дефібриновану кров тричі відмивають центрифугуванням у фізіологічному розчині при 1000-1500об/хв, а з осаду готують необхідну концентрацію еритроцитів. Зберігаються вони в холодильнику приблизно тиждень. В разі

Розділ 5

потреби можна використати формалінізовані еритроцити.

Постановка реакції складається з приготування двократних розведень вірусу на фізіологічному розчині і додавання до кожного розведення рівного об'єму зависі еритроцитів. В контролі замість розведення вірусу використовують фізіологічний розчин. Планшет струшують і залишають при певній температурі. Після визначеного часу експозиції враховують результати. За позитивний результат приймають аглютинацію еритроцитів, тобто вони вільно розміщені по дну лунки, а за негативний – компактно осідання еритроцитів у вигляді диска на дно лунки (рис. 5.6.3.). Позитивну реакцію оцінюють плюсами від одного до трьох відповідно, за інтенсивністю аглютинації.

Імунологічні методи дослідження.

Візуальне спостереження зовнішніх симптомів широко застосовувалось, так як прояв симптомів залежить головним чином від взаємодії вірусу і організму. Але на характер прояву симптомів впливають різноманітні фактори, що ускладнює діагностику. Саме тому було розроблено методи виявлення та використання антитіл (імуноглобулінів) для розпізнавання антигенів, тобто серологічні реакції. Ці методи досліджень, засновані на виявленні антигенної специфічності вірусів, не залежать від взаємовідносин вірусу та організму.

Переваги серологічних методів – швидкість отримання результатів діагностики в поєднанні з високою специфічністю. В даному розділі розглядається ряд традиційних методів імунодіагностики, по використанню яких накопичений великий досвід.

Реакція гальмування (затримки) гемаглютинації (РГГА або РЗГА). Принцип реакції РГГА полягає в тому, що блокований антитілами вірус не може аглютинувати еритроцити. Переваги РГГА – специфічність, простота техніки, швидкість, він не потребує стерильності. Недоліки - реакція можлива тільки з гемаглютинуючими вірусами. Всі

Молекулярна вірусологія

сироватки, досліджувані в РГГА, перед роботою прогрівають при 56 – 600С протягом 30хв для видалення неспецифічних інгібіторів. Для РГГА використовують еритроцити тих видів, що і для РГА.

Постановку реакції проводять в два етапи. На першому етапі готують робочу дозу антигену (для вірусу грипу – 4ГАО), перевіряють її правильність за допомогою РГА. Другий етап - готують серію розведень сироватки в однакових об'ємах в лунках планшету (від 1:10 до 1:1280). На точність виявлення титру антитіл впливає кратність розведень сироватки. До кожного розведення сироватки додають рівний об'єм вірусу в титрі 4ГАО. Суміш витримують певний час при визначеній температурі. В кожну лунку з АГ та АТ додають рівний об'єм 1% зависі еритроцитів. Аглютинація еритроцитів вказує на наявність, а відсутність гемаглютинації – на відсутність вірусу в суміші. Відсутність вільного вірусу в суміші вірус+сироватка розцінюється як ознака взаємодії антитіл сироватки і вірусу. Іншими словами, якщо в сироватці є специфічні антитіла, то вірус втрачає здатність аглютинувати еритроцити і аглютинація відсутня.

Реакція непрямої гемаглютинації (РНГА). Суть реакції непрямої аглютинації в тому, що еритроцити з попередньо адсорбованими антигенами здатні аглютинуватись в присутності гомологічних сироваток (АТ). Еритроцити виконують роль носія зі специфічними детермінантами і склеювання їх відбувається в результаті взаємодії антиген-антитіло та реєструється візуально за характером утвореного осаду (Рис. 6.3). РНГА дуже чутлива реакція, за її допомогою можна виявити 0,01 мг/мл АГ, а за специфічністю вона наближується до ІФА.

Існує дві модифікації РНГА: 1) адсорбція антигену на поверхні еритроцитів; 2) адсорбція антитіл на поверхні еритроцитів з наступною аглютинацією в присутності гомологічного вірусу.

Розділ 5

Імунодифузійні тести.

Термін «преципітація», як правило, використовується для визначення реакції взаємодії між розчиненими антигенами і специфічними антитілами. Результат цієї взаємодії - преципітат помітний неозброєним оком. Цю реакцію відкрив Р. Крауз в 1897 р. при вивченні бактеріальних захворювань. З того часу вона широко застосовується при діагностиці бактеріальних і вірусних захворювань, особливо фітовірусних інфекцій. Реакція характеризується високою чутливістю (можна виявити 0,3 - 0,5 мкг білку), простотою, її можна виконувати як в лабораторії, так і польових умовах.

Принцип реакції преципітації полягає в утворенні комплексів антиген-антитіло у вигляді решітки. Один з варіантів з'єднання: молекули антигена являються вузлами решітки, а молекули антитіл – зв'язуючими ланцюгами. Оскільки антигени полівалентні, кожна вірусна частка здатна зв'язуватися з антитілами, що несуть два активних центри ідентичної специфічності, утворюючи структуру решітки. З'єднання відбувається за рахунок притягання полярних груп антигенних детермінант і активного центру. Протяжність утвореної решітки залежить від відносних концентрацій реагентів. Видимий преципітат утворюється лише у випадку, коли в розчині міститься велика кількість антигена. Мінімальна кількість вірусу, необхідна для утворення видимого преципітата 0,1-1,0 мкг. Утворення специфічного осаду може гальмуватися надлишком антигену (вірусу) або антисироватки, тому необхідно проводити їх серійне розведення. Співвідношення реагентів, яке дає швидку преципітацію, називається оптимальним співвідношенням. Для кожного вірусу та антисироватки існує межове розведення, далі якого преципітація не спостерігається.

Досить розповсюдженою з імунодифузійних тестів є реакція кільцепреципітації. Її використовують для визначення титру антисироватки або антигену.

Молекулярна вірусологія

Для цього роблять розведення одного з компонентів реакції (антигену або антитіла) та обережно нашаровують інший компонент в певній концентрації. В результаті реакції на межі двох фаз утворюється кільце преципітації, звичайно, при умові специфічності антигену і антитіла. Останнє розведення антигену, при якому ще утворюється кільце преципітації, вважають титром сироватки, і навпаки, останнє розведення сироватки – титром антигену. Реакція супроводжується двома контролями – в кожному один з компонентів замінюється фізіологічним розчином.

Розвиток методів імунодифузії став можливий завдяки використанню гелевих носіїв. Перенесення реакції преципітації між антигеном і антитілом із рідкого середовища (кільцепреципітація, преципітація в пробірках) в гель дозволило досліджувати індивідуально кожен пару антиген-антитіло, так як антиген дифундує назустріч гомологічним антитілам з певною швидкістю. Отже, реакції засновані на здатності до дифузії в гелях антитіл та розчинених антигенів і відсутності такої здатності у комплексі антиген+антитіло, який утворюється при контакті дифундуючих назустріч один одному гомологічних антигену та антитіла. Комплекс антиген+антитіло осаджується в тій ділянці, де співвідношення Аг і Ат є оптимальним, в результаті утворюються смуги преципітації у вигляді мутно-білих ліній в гелі.

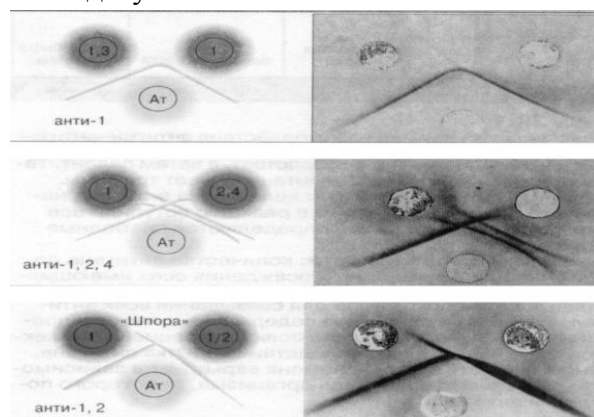


Рис.5.6.4. Неідентичні антигени 3. Частково ідентичні епітопи.

(<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antigens-epitopes-antibodies.html>)

Розділ 5

Тести, основані на імунодифузії, пов'язані з розділенням суміші антигену та антитіл за розміром часток, коефіцієнтом дифузії і концентраціями реагентів. Ці методи дозволяють одночасно визначати специфічність антисироваток, ступінь антигенної спорідненості між досліджуваними вірусами та їх штамами, вести контроль за чистотою моноспецифічних сироваток і антигенів та т.д. Чутливість реакцій досягає 50-100мг/мл.

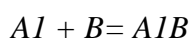
Радіоімунологічний аналіз (PIA)

В 1959 р. Р. Ялоу і С. Берсон розробили кількісний імунологічний метод виявлення інсуліну в плазмі людини з використанням інсуліну, міченого радіоактивним ізотопом йоду (151I). Використання радіоактивних ізотопів в поєднанні з імунохімічними методами досліджень дозволяє реалізувати виключну вибірковість останніх для мінімальних кількостей біополімерів. Особлива перевага радіоімунологічного аналізу – висока чутливість. З його допомогою вдається виявити нанограмові(10-9),а іноді і пікограмові(10-10)рівні антитіл та вірусів. В PIA поєднується специфічність, властива реакціям

антиген-антитіло, з чутливістю, яку дає використання радіоактивної мітки.

Радіоімунологічний аналіз базується на законі дії мас, за яким речовина, що визначається, буде конкурувати зі своїм міченим аналогом (антигеном) за обмежену кількість зв'язуючих місць антитіла до досягнення хімічної рівноваги всіх компонентів реакційної суміші.

Принцип методу можна представити наступним чином:



+

A

↑↓

AB

де A1 – вільний мічений антиген; B – специфічне антитіло; A – немічений антиген в дослідному матеріалі; A1B – зв'язаний мічений антиген; AB – зв'язаний немічений антиген.

Молекулярна вірусологія

Мічений антиген зв'язується зі специфічним антитілом з утворенням міченого комплексу антиген-антитіло. При проведенні PIA проявляється здатність неміченого антигену дослідного матеріалу конкурувати за активні центри антитіл, пригнічуючи зв'язування міченого антигену. Як результат конкурентного пригнічення відношення зв'язаного з антитілом антигену до вільного міченого антигену зменшується при збільшенні концентрації неміченого антигену. Іншими словами, метод базується на здатності антитіл зв'язуватися з міченим радіоактивним ізотопом антигеном та на конкурентному пригніченні цієї реакції неміченим антигеном. Потім, коли цей антиген відділяється від незв'язаного, вимірюється радіоактивність однієї або обох фракцій.

Мітять препарати антигенів як правило радіоактивним 125I. Відомі різні засоби йодування білків: хлораміновий метод, лактопероксидазний, активованим ефіром та інші.

Існує декілька варіантів PIA, з яких в вірусології для практичної мети найчастіше використовують адсорбційний в різних модифікаціях: конкурентний метод (в рідкій фазі) та твердофазні прямий і непрямий методи. Останнім часом PIA використовується все рідше, оскільки пов'язаний з застосуванням радіоактивних ізотопів.

Імунофлуоресцентний аналіз (IF).

Імунофлуоресцентний аналіз, або метод флуоресціюючих антитіл, з'явився на початку 40-х років ХХ ст., коли А. Кунс з співробітниками використали здатність до флуоресценції одного з флюорохромів, кон'югували з ним антитіла і показали наявність збудника інфекції в тканинах (рис. 5.6.5.).

Особливість цього методу заключається в тому, що імунний комплекс стає видимим в люмінесцентному мікроскопі у випадку, якщо імуноглобулін кон'югується флюорохромом (флюоресцеїном, родаміном та ін.). В результаті ковалентного зв'язку антитіла з

Розділ 5

флюоресциючим барвником утворюється нова сполука – флюоресциуючі антитіла. При цьому антитіла зберігають свою основну властивість – специфічність, а флюорохром – здатність до випромінювання світла.

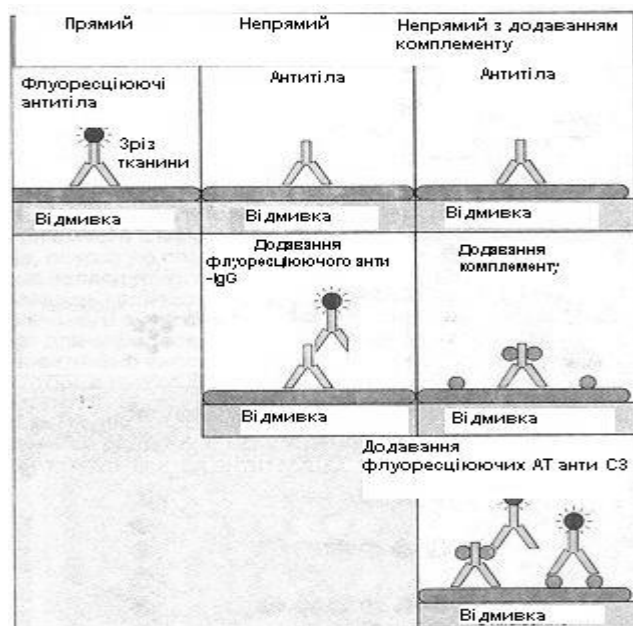


Рис.5.6.5. Метод флуоресціуючих антитіл.
(<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/fluorescent-antibody-techniques>)

Перевага імунофлуоресцентного аналізу в порівнянні з іншими методами полягає в дослідженні внутрішньоклітинної локалізації.

Розроблені декілька варіантів реакції імунофлюоресценції: прямий, непрямий, сендвіч-метод, модифікація непрямого методу з використанням комплекменту та інші.

Імуноферментні методи аналізу.

Початком використання імуноферментних вірусологічних досліджень вважають появу перших повідомлень про можливість приєднання ферментів до білків, в тому числі і до імуноглобулінів. Зусилля дослідників зконцентрувались на розробці методів кількісного імунохімічного аналізу, заснованого на використанні антигенів (Аг) та антитіл (Ат), мічених ферментами. На початку 1970-х років був запропонований метод, який поєднує ферментативний та імунохімічний підходи, що призвело до створення імуноферментного аналізу (ІФА), в якому антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як

Молекулярна вірусологія

маркер імунохімічної реакції, з допомогою якого візуалізується утворення комплексів.

Методи ІФА розділяються на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. В світовій літературі перший скорочено позначають “ELISA” (від англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*,

що означає дослівно “ферментзв’язаний імуносорбентний аналіз”). В цьому методі використовується принцип іммобілізації одного із компонентів (антигену або антитіла) на носії. Гомогенні методи аналізу (“ЕМІ”, *enzyme multiplay immunotechnic*) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, гормонів, фізіологічно активних сполук. Суть цих методів заключається в тому, що гаптен пришивається ковалентно поблизу активного центру ферменту таким чином, що після його взаємодії з антитілом молекула ферменту втрачає свою каталітичну активність. Додавання в цю систему вільного гаптenu призводить до пропорційного збільшення активності ферменту в результаті витіснення антитіл з комплексу. Як ферменти в таких системах використовують лізоцим, малатдегідрогеназу та ін. Це високочутливий тест, який дозволяє виявляти білки, що містяться в кількості декількох нанограм в 1 мл.

Широко ввійшов в практику ІФА – метод фізичної адсорбції антигенів та антитіл на поверхні мікроплат із непористого полістирола. Аналіз проводиться в 5 основних етапів: 1) фізична сорбція антитіл (або антигену) на твердофазний носій; 2) імунологічна реакція: внесення антигену (або антитіл) в ті ж лунки; 3) імунологічна реакція (друге специфічне зв’язування): внесення комплексу кон’югат-фермент, хімічним шляхом зв’язаного з антитілами; 4) ензиматична реакція, коли фермент, діючи на субстрат, сприяє появі забарвленого комплексу; інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену (або антитіла) в лунках; 5) врахування результатів з допомогою приладів – абсорбціометрів, які дозволяють вимірювати

Розділ 5

оптичну густину продукту ферментативної реакції безпосередньо в лунках імунологічного планшету (рис. 5.6.6.).

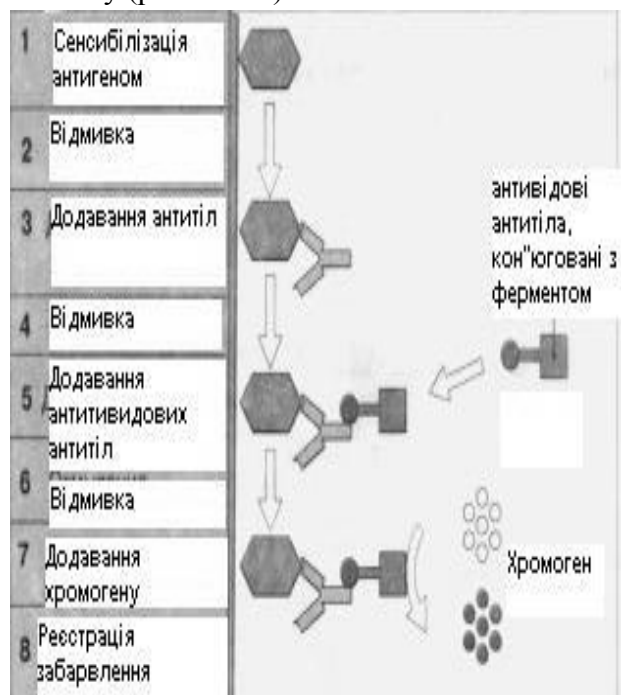


Рис.5.6.6. *Етапи імуоферментного аналізу.*
(<https://www.abcam.com/kits/elisa-principle>)

Таким чином, весь процес ІФА можна умовно розділити на три основні стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло, введення в нього мітки (імунохімічний процес) і її візуалізація тим чи іншим фізичним способом. Перед постановкою ІФА проводиться робота, яка включає наступні етапи: вирощування біологічно чистого матеріалу з моноінфекцією, отримання очищених вірусних препаратів, приготування антисироваток з високим титром специфічних антитіл, виділення IgG і кон'югування з ферментами.

Кількість адсорбованої речовини на полістиролі залежить від багатьох факторів (температури, рН, іонної сили, часу інкубації, присутності в суміші інших компонентів) і змінюється при їх варіюванні. Зв'язування білку з носієм залежить і від його концентрації, причому сумісний вплив рН та іонної сили найбільш чітко проявляється при більш високих концентраціях білку в розчинах. Зв'язування з полістироловим носієм безпосередньо залежить від часу і температури

Молекулярна вірусологія

обробки. Обробка мікроплат якимнебудь інертним білком, наприклад альбуміном або желатином, після їх насичення антитілами дозволяє заблокувати залишкові вільні центри зв'язування, з якими могли б неспецифічно взаємодіяти молекули кон'югату.

Після з'єднання антигену або антитіла з твердим носієм можна проводити реакцію прямого, непрямого, конкурентного і сендвічтипу

Практична частина

Завдання: визначити титр вірусу в реакції гемаглютинації. Матеріальне забезпечення: вірусомісний матеріал, 1,0-1,5%, завесь еритроцитів, фізіологічний розчин, планшети з округлими лунками, піпетки, гумові груші, дезрозчин, маркер.

Хід роботи

1. Приготувати 2% завесь еритроцитів на фізіологічному розчині.

2. Приготувати в планшеті двократні розведення матеріалу, що містить вірус, на фізіологічному розчині. Для цього до ряду лунок розлити, наприклад, по 0,02 мл фізіологічного розчину. В першу лунку додати 0,02 мл досліджуваного матеріалу (отримали розведення 1:2), перенести з неї 0,02 мл до другої, з неї стільки ж до наступної і т.д. З останньої лунки 0,02 мл матеріалу відібрати в дезінфікуючий розчин.

3. Для контролю до 4-5лунок поруч з дослідним рядом налити по 0,02 мл фізіологічного розчину.

4. До кожного розведення вірусу і до контролю додати рівний об'єм еритроцитів.

5. Струснути планшет і залишити при 37°C приблизно на півгодини.

6. Врахувати результати реакції.

Питання до самоконтролю:

1. Методи, що базуються на утворенні комплексу антиген-антитіло мають назву:

- а) мікроскопічні
- б) електрофоретичні
- в) серологічні

Розділ 5

г) біотест

2. Вірусологічний метод - це метод з використанням:

а) лабораторних тварин

б) культур клітин

в) рослин-індикаторів

г) рослин-індикаторів

3. До методів очистки вірусів не належить:

а) осадження в ізоелектричній точці

б) іонообмінна хроматографія

в) гель-фільтрація

г) реакція преципітації

4. Суть методу диференційного центрифугування полягає у:

а) центрифугуванні за високих швидкостей

б) чергуванні високошвидкісного та низькошвидкісного центрифугування

в) центрифугуванні за градієнтом густини сахарози

г) центрифугування за швидкості не більше 8000 об/хв

5. Хто з науковців відкрив фагів?

а) Дж. Уотсон і Ф. Крік

б) Ф. Лефлер і П. Фрош

в) П. Раус

г) Ф. Тфорт і Ф. дЕрелль

6. У результаті об'єднання нуклеїнової кислоти з капсомерами утворюється:

а) Капсида

б) Нуклеон

в) Нуклеоїд

г) Нуклеокапсид

7. Який метод досліджень у вірусології є основним?

а) світлова мікроскопія

б) фільтрація

в) генетичний аналіз

г) електронна мікроскопія

8. Що стало "революцією у вірусології"?

а) винайдення мікроскопа

Молекулярна вірусологія

б) розробка бактеріального фільтру

в) культивування вірусів в одношарових культурах клітин

г) винайдення електронного мікроскопа

9. Нуклеїнова кислота фагів - це:

а) Дволанцюгова ДНК

б) Одноланцюгова РНК

в) Дволанцюгова РНК

г) Суперспіралізована ДНК

10. У більшості вірусів геном:

а) Гаплоїдний

б) Диплоїдний

в) Триплоїдний

г) Тетраплоїдний

Література

Молекулярна вірусологія

1. Гудзь С. П., Перетятко Т. Б., Павлова Ю. О. Загальна вірусологія. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 264 с.
2. Барышников П. И. Ветеринарная вирусология: учеб. пособие. Барнаул : Изд-во АГАУ, 2006. 113 с.
3. Зинченко А. И., Паруль Д. А. Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии. – Минск : МГЭУ, 2013. 174 с.
4. Казаков В. Н., Шлопов В. Г. Прионные болезни. Донецк : Донбасс, 2009. 444 с.
5. Пиневич А. В., Сироткин А. К., Гаврилова О. В., Потехин А. А. Вирусология: учебник. Санкт-Петербург : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2012. 432 с.
6. Fields Virology. Knipe D. M., et. al. 5-th edition. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Vol. I–II.* 2006. 3312 p.
7. Voyles B. A. The biology of viruses. 2nd ed. McGraw Hill, 2002. 408 p.
8. Колонцов А. А., Заец В. Г. Вироиды, их признаки и вредоносность. *Агро XXI.* 2006. № 7–9. С. 19–22.
9. Колонцов А. А., Заец В. Г. Таксономия и классификация вироидов. *Агро XXI.* 2006. № 1–3. С. 30–31.
10. Костюченко В. А., Месянжинов В. В. Архитектура сферических вирусов. *Успехи биологической химии.* 2002. Т. 42. С. 177–192.
11. Малиновский В. И. Механизмы устойчивости растений к вирусам. Владивосток: Дальнаука, 2010. 324 с.
12. Плехова Н. Г., Сомова Л. М. Современные представления о механизмах входа вирусов в клетку. *Успехи современной биологии.* 2009. Т. 129, № 1. С. 39–50.
13. Ackermann H.-W. Bacteriophage taxonomy // *Microbiology Australia.* – 2011. – Vol. 2. – P. 90–94.
14. Ackermann H.-W. 5500 phages examined in the electron microscope *Archive of virology.* 2007. Vol. 152. P. 227–243.
15. Mesyanzhinov V. V., Leiman P. G., Kostyuchenko V. A., Kurochkina L. P., Miroshnikov K. A., Sykilinda N. N., Shneider M. M. Molecular Architecture of Bacteriophage. *T4 Biochemistry (Moscow).* 2004. Vol. 691. № 1. P. 1463 – 1476.
16. Parisi O., Lepoivre P., Jijakli M. H. Plant-RNA viroid relationship: a complex host pathogen Interaction. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2010. Vol. 4, № 3. P. 461 – 470.
17. Fields Virology. 6th Edition. Edited by D.M.Knipe, P.M.Howley. Wolters Kluwer Lippincott, Williams&Wilkins. Philadelphia - New-York. 2013. (Новое издание).
18. Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. 2011.
19. Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology, 4th edition. New York : W. H. Freeman. 2000.
20. Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H., Molecular Biology Second edition, School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, UK, 2000.



6

ІНСТРУМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ



Розділ 6

Тема 6.1. Вступ. Інструментальні методи дослідження



6.1.1. Інструментальні методи дослідження біологічних об'єктів. Практичні задачі дисципліни. В наш час не існує такої галузі господарства, яка б не використовувала хімічні процеси або продукти хімічних перетворень. Вивчаючи склад та будову речовин, закони їх перетворень, людина винаходить такі речовини, застосування яких поліпшує її стан здоров'я, подовжує життя, полегшує працю, робить більш багатим та гармонійним її побут.

Хімія – це наука про склад, властивості і будову речовин, про їхні перетворення, про залежність властивостей від складу і будови речовин, про взаємодію, добування, і використання речовин.

Зокрема, у сільському господарстві необхідні аналіз води, ґрунту, впровадження у практику більш досконалих методів хімічного аналізу щодо впливу добрив на родючість ґрунтів, застосування засобів захисту рослин тощо.

Досліджуючи нову сполуку, насамперед визначають, з яких елементів (чи іонів) вона складається, а потім знаходять їхні кількісні співвідношення. Тому якісний аналіз речовини передує кількісному. Якщо якісний склад досліджуваного матеріалу (наприклад, продуктів харчування, ґрунту, рослин, добрив і т.п.) відомий, то відразу приступають до кількісного аналізу, вибравши найбільш зручний метод.

У даний час аналітична хімія користується численними і різноманітними методами, що поділяють на хімічні, фізичні, фізико-хімічні та біологічні.

Аналітична хімія – наука про методи і засоби встановлення хімічного складу речовин чи їхніх сумішей. Її поділяють на два розділи – якісний і кількісний аналіз.

Інструментальні методи аналізу

Предмет інструментального методу досліджень – теорія і практика методів аналізу речовини.

Теоретичну основу хімічного аналізу складає ряд фізико-хімічних законів: Д.І.Менделєєва, закон збереження маси, закон сталості складу, закон еквівалентів, закон діючих мас, а також основні теоретичні положення загальної хімії: комплексоутворення, амфотерність гідрооксидів, гідроліз солей, окислювально-відновні реакції теорія електролітичної дисоціації, хімічна рівновага в гетерогенних системах та ін.

Головне завдання предмету – встановлення хімічного складу речовини.

Об'єкт аналізу – речовина, аналіз якої виконується.

Хімічний аналіз – це процес (комплекс заходів, операцій) визначення складу речовини.

Основні функції хімічного аналізу:

- розв'язання загальних питань хімічного аналізу (створення теоретичних основ, метрологія);
- розробка нових методів аналізу;
- вирішення конкретних аналітичних завдань, створення методик.

Хімічний аналіз



Якісний

Кількісний

Якісний аналіз дозволяє встановити, з яких хімічних елементів складається досліджуваний зразок, які іони, функціональні групи або молекули входять до її складу. При дослідженні невідомих речовин якісний аналіз завжди передує кількісному.

Мета якісного аналізу – виявлення елементів (чи іонів), що містяться в досліджуваній речовині.

Кількісний аналіз полягає у визначенні кількісного співвідношення складових частин об'єкту аналізу (його результати, як правило, виражають у масових частках (%)).

У залежності від складу досліджуваного об'єкта розрізняють:

Розділ 6

– аналіз неорганічних речовин, який включає знаходження катіонів та аніонів;

– аналіз органічних речовин, який включає:

а) елементний аналіз – знаходження і визначення хімічних елементів;

б) функціональний аналіз – визначення функціональних груп, які містять в собі декілька хімічних елементів і мають певні властивості;

в) молекулярний аналіз – знаходження окремих хімічних сполук.

Тому, основним завданням якісного аналізу є знаходження у досліджуваній пробі відповідних катіонів, аніонів, функціональних груп, молекул тощо.

Основним завданням кількісного аналізу є визначення того, скільки певного компонента міститься в аналізованій пробі.

У загальному випадку хімічний аналіз складається з таких етапів:

1) переведення досліджуваної речовини у розчин;

2) відокремлення елементів, що визначаються, від інших та їх концентрування;

3) якісне виявлення та кількісне визначення.

Для відокремлення, концентрування та визначення елементів застосовуються хімічні реакції різних типів.

В основі методів розділення і концентрування елементів покладено реакції осадження, комплексоутворення та окисно-відновні. Так, розділення іонів на окремі групи ґрунтується на реакціях осадження. До методів розділення належить хроматографічний аналіз, який полягає у тому, що компоненти суміші по-різному адсорбуються твердою речовиною-адсорбентом.

Для розділення іонів на окремі групи можуть бути використані реакції комплексоутворення. Так, Ферум відокремлюють від Алюмінію, Хрому, Цинку, кадмію осаджуючи його купфероном, з яким Ферум утворює нерозчинну комплексну сполуку. Екстрагування може бути

Інструментальні методи аналізу

використано як для концентрування, так і для розділення елементів переведенням комплексної сполуки елемента з водного розчину в органічний розчинник, в якому розчинність цієї комплексної сполуки значно більша.

Для розділення і концентрування елементів можуть бути використані методи, засновані на реакціях окислення-відновлення. Один із них (цементация) полягає у відновленні металами йонів інших металів, що містяться в розчині. Так, дією металічного цинку на розчин солі купруму можна виділити всю мідь.

Методи та засоби визначення хімічного складу

Засоби визначення хімічного складу – спеціальне обладнання, реактиви, теоретичне та програмне забезпечення, що дозволяє визначати хімічний склад речовини (Засоби залежать від розвитку наук, постійно розвиваються).

Метод – універсальний і теоретично обґрунтований спосіб визначення складу, неконкретизований відносно об'єкта аналізу.

Методика аналізу – детальне викладення послідовності й змісту аналізу об'єкта за допомогою певного методу аналізу.

Класифікація методів хімічного аналізу:

I. За природою:

- ізотопний;
- молекулярний;
- фазовий;
- елементний.

II. За кількісними показниками:

- мікрометоди (10^{-6} г);
- ультра-мікрометоди (до 1 г);
- макрометоди

III. За засобами:

- хімічні;
- фізико-хімічні;
- фізичні

На основі вимірюваних параметрів методи кількісного аналізу поділяють на хімічні, фізико-хімічні, фізичні та біологічні.

Хімічні методи кількісного аналізу засновані на використанні різних типів

Розділ 6
хімічних реакцій, які кількісно протікають у розчинах, розплавах, твердих тілах або газах. Їх поділяють на:

– *гравіметричні (вагові)*, які засновані в точному вимірюванні маси компонента, що аналізується, в досліджуваному розчині. Гравіметричний метод аналізу поділяють на: метод відгонки, осадження, виділення;

– *титриметричні (об'ємні)*, які якому кількісний склад досліджуваної проби визначають шляхом точного вимірювання об'єму розчину реагенту відомої концентрації (титранту), який взаємодіє в еквівалентних кількостях з речовиною, що визначається.

Хімічні методи кількісного аналізу часто називають класичними. Це найбільш розроблені методи аналізу, які продовжують розвиватися. Вони точні, прості у виконанні, не потребують спеціальної апаратури. Але їх застосування іноді пов'язане з деякими труднощами (виділення компонентів зі складних сумішей) і порівняно невисокою межею чутливості.

Фізичні методи кількісного аналізу основані на вимірюванні фізичних параметрів речовин, що аналізуються, або їх розчинів, які є функцією їх кількісного складу. До них відносять методи, основані на вимірюванні величин показника відбиття (рефрактометрія), оптичного обертання (поляриметрія), інтенсивності флуоресценції (флуориметрія) тощо. Фізичні методи характеризуються експресністю, низькою межею визначення, об'єктивністю результатів, можливістю автоматизації процесу. Але вони не завжди специфічні, через те, що на величину фізичного параметру впливає не тільки концентрація досліджуваної речовини, але й присутність інших речовин і домішок. Їх застосування часто потребує використання складної апаратури.

Фізико-хімічні методи кількісного аналізу основані на вимірюванні величин фізичних параметрів системи, що аналізується, які з'являються або змінюються в результаті проведення хімічних реакцій. Вони характеризуються низькою межею визначення і

Інструментальні методи аналізу швидкістю виконання. Фізико-хімічні методи поділяються на:

- 1) електрохімічні методи;
- 2) оптичні методи аналізу;
- 3) хроматографічні методи.

6.1.2. Оптичні, електрохімічні, хроматографічні та радіобіологічні методи аналізу, їх значення в сучасній біотехнології. Фізичні й фізико-хімічні методи об'єднують спільна назва інструментальні методи аналізу. Методика проведення фізико-хімічних аналізів переважно однакова і зводиться до такого:

- залежно від аналізованої системи обирається необхідний метод аналізу;
- готується ряд стандартних розчинів (серій);
- вимірюються фізичні властивості розчинів на відповідному приладі;
- за отриманими даними будується калібрувальний графік у координатах склад – властивість;
- вимірюється фізична властивість аналізованого зразка й за графіком визначається його склад.

Залежно від використовуваного фізичного явища фізико-хімічні методи аналізу поділяються на оптичні, фотометричні, електрохімічні, хроматографічні. Чутливість фізико-хімічних методів визначається двома факторами: інтенсивністю вимірюваної фізичної властивості і чутливістю детекторів сигналу в приладі.

Оптичні методи засновані на вимірюванні оптичних властивостей розчинів:

- *поляриметричні* – вимір кута обертання площини поляризації в розчині речовини;
- *рефрактометричні* – вимір кута переломлення світла в розчині;
- *фотометричні* – вимір пучка світла, що пройшов через розчин;
- *спектрофотометричні* – вимір інтенсивності пучка світла визначеної довжини хвилі, що пройшов через розчин.

Розділ 6

Оптичні методи аналізу класифікують на:

I. Абсорбційні методи: основані на вимірюванні поглинання речовиною світлового випромінювання:

- 1) колориметрія;
- 2) фотоколориметрія;
- 3) спектрофотометрія.

II. Емісійні методи: засновані на вимірюванні інтенсивності світла, що випромінюється речовиною:

- 1) емісійний спектральний аналіз;
- 2) полум'яна фотометрія.

III. Методи, засновані на вимірюванні інтенсивності світла після взаємодії його зі суспендованими частками в розчині (емульсії, суспензії):

- 1) флуориметрія;
- 2) турбідиметрія;
- 3) нефелометрія.

IV. Методи, засновані на явищі поляризації молекул під дією світлового випромінювання:

- 1) рефрактометрія;
- 2) поляриметрія.

Методи молекулярно-абсорбційного аналізу

Аналіз оснований на вимірюванні поглинання електромагнітного випромінювання молекулами або іонами у видимій, ультрафіолетовій або інфрачервоній області спектру:

1) *колориметрія* – метод оснований на візуальному порівнянні інтенсивності забарвлення розчинів різних концентрацій;

2) *фотоколориметрія* – метод оснований на вимірюванні ступеню поглинання немонохроматичного або частково монохроматичного випромінювання речовиною, що визначається, у видимій області спектру;

3) *спектроскопія у видимій, ультрафіолетовій і інфрачервоній області спектру* – методи оснований на вимірюванні поглинання речовиною монохроматичного випромінювання у видимій (360-760 нм), ультрафіолетовій (180-360 нм) і інфрачервоній

Інструментальні методи аналізу області (760-1100 нм) спектру. Оптична густина розчинів підлягає закону світлопоглинання.

Застосування інфрачервоної та ультрафіолетової спектроскопії у аналітичному аналізі**1. Інфрачервона спектроскопія:**

1) *якісний аналіз.* Метод застосовується для ідентифікації речовин:

- за характерними максимумами в області «відбитків пальців» при відповідних характеристичних частотах ($600-1500 \text{ см}^{-1}$);

- шляхом порівняння спектру речовини, що аналізується, із спектром речовини-стандарту.

Для визначення структури органічних і неорганічних сполук за характерним поглинанням (максимуму у спектрі) для кожної групи атомів;

2) *кількісний аналіз.* Визначення оснований на використанні закону Бугера-Ламберта-Бера, проте це незручно, так як величина l дуже мала (вимірювання проводять в вузькій кюветі).

- 1) метод градуйованого графіку;
- 2) метод базової лінії.

2. Ультрафіолетова спектроскопія:

1) *якісний аналіз.* Метод використовується для:

- встановлення структури органічних сполук (за характерним для окремих груп хімічних зв'язків довжин хвиль максимумів або мінімумів поглинання, за інтенсивністю поглинання);

- вивчення міжмолекулярної взаємодії, утворення комплексів з переносом зарядів (π -комплексів);

- для ідентифікації речовин за величиною ϵ у точці максимуму для розчинів з відомою концентрацією і за величиною на півширини хвилі смуги поглинання;

- для характеристики енергетичних рівнів електронів в органічних сполуках;

2) *кількісний аналіз.* В основі визначення лежить закон Бугера-Ламберта-Бера. Визначення концентрації речовин проводять

Розділ 6
одним із методів (колориметрія, фотоелектроколориметрія).

Колориметрія – цей метод використовують для приблизної оцінки забарвлених розчинів. Якщо речовина не має забарвлення, проводять фотометричну реакцію, яка супроводжується утворенням забарвленої сполуки. Не потребує дотримання закону Бугера-Ламберта-Бера.

Кількісні визначення проводять:

1. **Методом вирівнювання забарвлення:** вимірюючи товщину шару дослідного і стандартного розчину, досягають рівної інтенсивності їх забарвлення. Розрахунок концентрації дослідного розчину (C_x) проводять за формулою:

$$C_x = \frac{C_{ст} \cdot I_{ст}}{I_x}$$

де: $C_{ст}$ – концентрація стандартного розчину;

$I_{ст}, I_x$ – товщина шару стандартного і дослідного розчинів відповідно.

2. **Методом стандартних серій:** готують серію стандартних розчинів з точно відомою концентрацією аналізованого розчину і зрівнюють інтенсивність забарвлення з інтенсивністю забарвлення аналізованого розчину. Концентрація аналізованого розчину рівна концентрації стандартного розчину з рівною інтенсивністю забарвлення.

3. **Колориметричне титрування:** в рівних умовах додають фотометричний реагент до дослідного розчину і до води. Потім з бюретки до води додають стандартний розчин дослідної речовини. Одночасно до аналізованого розчину вводять воду, щоб об'єми рідин весь час були однаковими і домагаються зрівняння забарвлення двох розчинів.

Фотоелектроколориметрія – метод придатний для визначення концентрації забарвлених розчинів шляхом вимірювання оптичної густини (A) або пропускання (T) розчину.

Дотримання закону Бугера-Ламберта-Бера обов'язково.

Інструментальні методи аналізу

$$A = \lg \frac{I_0}{I}; \quad I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon Cl}; \quad A = \varepsilon C l;$$

$$T = \frac{I}{I_0}; \quad A = \lg \frac{1}{T};$$

$$\varepsilon^\lambda = \frac{A^\lambda}{C \cdot l}; \quad E_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A^\lambda}{C \cdot l}.$$

ε – молярний коефіцієнт світлопоглинання, рівний оптичній густині (A), розчину з концентрацією $C = 1$ моль/л і товщиною шару $l = 1$ см;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ – питомий коефіцієнт світлопоглинання, рівний оптичній густині A розчину з концентрацією $C = 1\%$ і товщиною шару $l = 1$ см.

$$\varepsilon = E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \frac{M}{10}, \text{ де } M - \text{молекулярна маса}$$

речовини.

Визначення концентрації проводять:

- 1) методом градуированого графіку;
- 2) за середнім значенням коефіцієнт (ε);
- 3) методом добавок;
- 4) методом диференційної фотометрії;
- 5) екстракційно-фотометричним

методом.

Класифікація коливальних інфрачервоних спектрів

Нормальні коливання (проявляють тільки ті молекули, у яких проходять зміни їх електронного дипольного моменту, ядра всіх атомів коливаються з однаковою частотою і фазою):

1) *валентні коливання* ν (при збудженні молекули змінюється довжина зв'язку без зміни кутової відстані між зв'язками):

- симетричні $\nu_{(s)}$
- асиметричні $\nu_{(as)}$

2) *деформаційні коливання* σ (при збудженні молекули змінюється кут між зв'язками);

Емісійні методи аналізу

Сутність методу: емісійний спектральний аналіз являє собою метод визначення якісної і кількісної сполуки речовини за спектрами випромінювання атомів і молекул.

Розділ 6

1. *Емісійний спектральний аналіз.*

Методи основані на вимірюванні довжини хвилі випромінювання і його потужності збуджених у високотемпературних джерелах світла (електрична дуга, електрична іскра) атомів аналізуємих речовин.

2. *Полум'яна фотометрія.* В основі методу лежить використання спектрального випромінювання збуджених у газовому полум'ї атомів елементів, що визначаються. Застосовується для аналізу лужних і лужно-земельних елементів.

- *Флуориметрія.* Метод оснований на вимірюванні інтенсивності флуоресценції аналізуємих речовин. Люмінесценцією (холодне світіння) називають світіння, яке виникає під дією на деякі речовини електромагнітного випромінювання і одразу припиняється після видалення джерела випромінювання. Люмінесценція виникає в результаті електронного переходу при поверненні часток із збудженого стану у нормальне, тобто молекула речовини перетворює поглинуту енергію у власне випромінювання.

Емісійний спектральний аналіз

1. *Якісний аналіз.* Основою методу є властивість збудженого хімічного атому аналізуємого елемента випромінювати лінійний спектр.

Задача якісного аналізу – відшукати лінії елемента, що визначається, в спектрі проби.

Належність аналітичної лінії даному елементу встановлюється за довжиною хвилі та інтенсивністю лінії.

Границя виявлення 10^{-2} - $10^{-5}\%$.

2. *Кількісний аналіз.* В основі методу – зв'язок між інтенсивністю спектральної лінії та концентрацією елемента.

Звичайно використовують інтенсивність не окремої лінії, а відношення двох спектральних ліній, що належать різним елементам. У якості властивості, зв'язаної з концентрацією елемента. Використовують відношення інтенсивності аналітичної лінії визначаємого компонента до інтенсивності

Інструментальні методи аналізу

аналітичної лінії другого компонента (внутрішнього стандарту) в цьому ж спектрі (лінія порівняння).

У залежності від способу оцінки інтенсивності розрізняють наступні методи кількісного емісійного спектрального аналізу:

- візуальні;
- фотографічні;
- фотоелектричні.

Межа виявлення – до 0,1%, до 10^{-7} - 10^{-9} г.

Емісійна полум'яна фотометрія

1. *Якісний аналіз.* Основою методу є збудження в полум'ї спектру атомів визначаємих елементів.

Використовують полум'я газової суміші, що складається з газу-топлива і газу-окисника (наприклад: ацетилен + кисень).

Випромінювання визначаємого атому елемента виділяється за допомогою світлофільтра або монохроматору.

Світлофільтр вибирають так, щоб максимум його пропускання збігався з довжиною хвилі спектральної лінії атомів визначаємого елемента.

2. *Кількісний аналіз.* Визначення елемента основано на функціональній залежності інтенсивності спектральної лінії (I) від концентрації елемента в розчині (C).

Основне рівняння: $\lg I = \lg a + b \cdot \lg C$,

де: a – коефіцієнт пропорційності (залежить від температури джерела збудження, його стабільності);

b – коефіцієнт самопоглинання, який враховує поглинання квантів світла не збудженими атомами.

Кількісні визначення проводять:

- методом градуйованого графіку (лінійна залежність $\lg I = f(\lg C)$);

- методом добавок. Середня границя виявлення 10^{-3} - $10^{-4}\%$.

Флуориметрія

1. *Якісний аналіз.* Аналіз оснований на здатності аналізуємої речовини у відповідних умовах люмінесцювати. Ідентифікацію органічних сполук проводять за спектральними

Розділ 6

характеристиками флуоресценції або за кольором флуоресцентного випромінювання.

Для неорганічних іонів використовують реакцію утворення комплексних сполук з органічними реагентами, яка призводить до появи люмінесценції.

Наприклад: натрій-цинк-уранілацетат люмінесцює зеленувато-жовтим кольором.

При аналізі суміші речовин, що люмінесцюють, застосовують світлофільтри для виділення люмінесценції визначеної довжини хвилі.

2. *Кількісний аналіз.* Аналіз оснований на залежності інтенсивності флуоресценції розчинів від концентрації речовин, що флуоресцюють.

Інтенсивність флуоресценції для розбавлених розчинів в області концентрації 10^{-7} - 10^{-4} моль/дм³ визначають за формулою:

$$F = I_0 \cdot 2,3 \cdot \varepsilon \cdot C \cdot b \cdot \varphi,$$

де: F – інтенсивність флуоресценції, квант · с⁻¹;

I_0 – інтенсивність збудженого світла, квант · с⁻¹;

C – концентрація розчину, моль · л⁻¹;

ε – молярний коефіцієнт поглинання;

b – товщина шару, що флуоресцює;

φ – квантовий вихід флуоресценції, що залежить від природи речовини.

Границя виявлення 10^{-7} моль/дм³.

Екстракційно-люмінесцентний

кількісний аналіз використовують у аналізі речовин, які містять домішки, які заважають визначенню.

Дослідна речовина екстрагує органічним розчином і визначають описаним вище засобом.

Методи, основані на вимірюванні інтенсивності світла при взаємодії із суспендованими частками у розчині поділяють на:

1) *турбідиметрія*: метод визначення концентрації оснований на вимірюванні інтенсивності світла, що пройшов через середовище, яке містить суспендовані частки (суспензії, емульсії).

Інструментальні методи аналізу

$$S = A \lg \frac{I_0}{I} = -k \cdot l \cdot C,$$

де: S – мутність розчину (відповідає оптичній густині (A) і визначається за законом Бугера-Ламберта-Бера);

k – коефіцієнт мутності розчину;

l – товщина шару;

C – концентрація суспендованих часток.

Рівняння справедливе тільки для дуже розбавлених суспензій.

2) *нефелометрія*: метод визначення концентрації оснований на вимірюванні інтенсивності світла (I_p), розсіяного суспендованими частками, яка пропорційна концентрації суспендованих часток (C).

$$I_p = k \cdot C$$

Для двох мутних середовищ із частками однакової форми і розмірів відношення інтенсивності розсіяного світла пропорційно відношенню концентрації розчину.

$$\frac{I_p^1}{I_p^2} = \frac{C_1}{C_2}; \quad C_1 = \frac{I_p^1 \cdot C_2}{I_p^2}$$

Методи, основані на явищі поляризації молекул під дією світлового випромінювання.

До них відносяться:

1) *рефрактометрія*: метод оснований на вимірюванні відносного показника відбиття світла (n) дослідною речовиною:

$$n = \frac{V_1}{V_2} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta},$$

де: n – відношення швидкості розповсюдження світла у повітрі (V_1), або синусу кута падіння ($\sin \alpha$) до швидкості світла у аналізуємому розчині (V_2) або синусу кута відбиття ($\sin \beta$) в аналізуємому розчині.

Прийнято наводити значення n при визначених умовах: $t^0 = 20^\circ\text{C}$; $\lambda = 589,3$ нм (жовта лінія натрію).

Прилад для вимірювання – *рефрактометр*.

Точність вимірювання $\pm 2 \cdot 10^{-4}$.

При цьому показник відбиття позначають n_D^{20} .

2) *поляриметрія*: метод оснований на вимірюванні кута обертання плоскості

Розділ 6
поляризації (α) поляризованого променя світла, що пройшов через оптично активне середовище:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot C},$$

де: $[\alpha]_D^{20}$ - величина питомого обертання (const);

α – вимірний кут обертання в градусах;

l – товщина шару, в дм;

C – концентрація розчину, в г/100 мл.

α залежить від:

- природи розчинника;

- концентрації оптично активної

речовини (C);

- товщини шару оптично активної

речовини (l).

Умови: $t^0 = 20^\circ\text{C}$; $\lambda = 589,3$ нм.

Прилад для вимірювання α – *поляриметр*.

Точність вимірювання $\pm 0,02^\circ$.

Хроматографічний аналіз – це фізико-хімічний метод розділення складних сумішей газів, пари, рідин або розчинених речовин на окремі компоненти за допомогою сорбції в динамічних умовах.

Сорбцією (від латинського “*sorbeo*” – *вбираю, втягую*) називають будь-який процес вбирання однієї речовини іншою. Залежно від механізму сорбції розрізняють адсорбцію, абсорбцію, хемосорбцію та капілярну конденсацію.

Речовину, що вбирається іншою речовиною, називають *сорбтивом*, а речовину, що сама вбирає – *сорбентом*.

Адсорбцією називають зміну концентрації речовини на межі поділу фаз, тобто це поглинання речовин (адсорбтивів) поверхнею твердого або рідкого тіла (адсорбента). Процес адсорбції звичайно супроводжується виділенням теплоти, саме тому з підвищенням температури адсорбція зменшується. Адсорбція процес зворотний. У системі існує рівновага між явищами вбирання речовини поверхнею (адсорбцією) і явищами виділення цієї ж речовини з поверхні адсорбента (десорбцією). З підвищенням

Інструментальні методи аналізу температури рівновага зміщується в бік десорбції.

Коли вбирання однієї речовини іншою не обмежується поверхневим шаром, а відбувається у всьому об'ємі сорбенту, то таке явище називають *абсорбцією*.

Вбирання однієї речовини іншою, що супроводжується хімічними реакціями, називають *хемосорбцією* (вбирання діоксиду вуглецю оксидом кальцію).

Капілярна конденсація – це зрідження пари у мікропористих сорбентах.

Отже, сорбційні процеси різні, за механізмом, проте будь-який з них починається з адсорбції на межі стикання фаз, які можуть бути рідкими, газоподібними або твердими.

Розділення речовин хроматографічним методом полягає у тому, що суміш газів або багатокомпонентний розчин пропускають крізь «хроматографічну колонку» – скляну трубку з адсорбентом (оксидом алюмінію, силікагелем, карбонатом кальцію тощо), який вбирає окремі компоненти з неоднаковою швидкістю. Компонент, що має більшу здатність до адсорбції, розміщується у верхній частині колонки, а з меншою – у нижній.

Зональний розподіл компонентів суміші уздовж адсорбенту називається хроматограмою. Хроматограма дає можливість виділити і проаналізувати окремі складові суміші.

Хроматографію розрізняють за:

- характером середовища, в якому провадиться розділення (газову, газорідну, рідинну);

- механізмом розділення (молекулярну адсорбційну, осадову, іонообмінну і розподільну);

- способами проведення процесу (колонкову, капілярну, паперову і тонкошарову).

Біологічні методи. Основу біологічних та біохімічних методів дослідження становлять реакції рослин, тварин і мікроорганізмів на дію

Розділ 6

певного чинника. Зміни можуть відбуватися на різному рівні.

Біоіндикація – це оцінка стану довкілля за реакцією живих організмів. **Біоіндикатори** – живі організми, за наявністю, станом і поведінкою яких можна робити висновки про ступінь зміни довкілля, у тому числі про наявність забруднювальних речовин.

6.1.3. Сфери застосування інструментальних методів досліджень. З особливостей інструментальних методів аналізу логічно випливають *сфери їх застосування*. По-перше, вони незамінні при аналізі мікрокількостей речовин, тобто, в тих випадках, коли вміст останніх виражається сотими і меншими, аж до 10^{-9} – 10^{-10} , частками відсотка. У цих випадках хімічний аналіз дає великі похибки, або ж взагалі нечутливий. Одержання ж аналітичних концентратів не завжди можливе. По-друге, немає альтернативи інструментальним методам у тих випадках аналізу, коли вміст компоненту хоча і великий, проте сама проба матеріалу незначна. По-третє, ці методи корисні при необхідності швидкого аналізу продуктів і проміжних речовин безперервних виробництв (металургія, нафтохімія, біотехнологія, тощо). У цих випадках експрес-аналіз дозволяє за результатами його зробити корекцію параметрів технологічного процесу. До того ж, інструментальні методи аналізу, на відміну від хімічних, легше піддаються автоматизації, комп'ютеризації і здійсненню зворотного зв'язку, тобто авторегулювання технологічного процесу.

По-четверте, деякі з методів, в основному фізичні, дозволяють вивчати склад об'єкту без його руйнування, що вигідно відрізняє їх від хімічних методів аналізу.

Практичний блок

Правила техніки безпеки та першої допомоги при роботі в лабораторії інструментальних методів хімічного аналізу

Інструментальні методи аналізу

1. До виконання роботи дозволяється приступати тільки після засвоєння її змісту, основних і відповідальних етапів та після з'ясування можливих небезпечних моментів. Роботу виконувати уважно, ретельно і без поспіху.

2. У лабораторії забороняється працювати одному – тільки в присутності викладача, інженера чи асистента.

3. У лабораторії забороняється їсти, пити, палити та займатись справами що не стосуються виконання лабораторної роботи.

4. Категорично забороняється без погодження із викладачем виконувати роботи, які не стосуються запланованих досліджень.

5. Уникати контакту хімічних речовин та розчинів із шкірою, очима, дихальними шляхами. На занятті носити застебнутий на всі гудзики халат із довгими рукавами. Довге волосся повинно бути прибрано (зібране резинкою) з метою уникнення його контакту із нагрітими поверхнями чи хімікатами.

6. Роботи з концентрованими кислотами та лугами, їдкими і легкозаймистими речовинами та подрібнення твердих речовин слід виконувати у витяжній шафі. З іншими реактивами дотримуватись правил поведінки вказаних у паспорті безпеки та маркуванні (класифікація та символи маркування приведено у додатках Д9-Д13).

7. Концентровані кислоти та луги розбавляти шляхом їх внесення у воду, а не навпаки. Слід пам'ятати, що при цьому може спостерігатись значне виділення тепла.

8. При відборі частини реактиву користуватись спеціально призначеним для цього інструментом (піпетками із відповідним написом, сухими шпателями, ложками), а надлишок не повертати назад у банку (це запобігає забрудненню основної маси реактиву).

9. Забороняється всмоктувати ротом при відборі піпетками реактивів – користуватись тільки резиновими «грушами».

10. Не залишати без нагляду

Розділ 6
ввімкнені електроприлади, пальники та спиртівки. Після виконання роботи їх відразу вимкнути.

11. Забороняється працювати із легкозаймистими речовинами поблизу відкритого полум'я.

12. Забороняється виливати у раковину легкозаймисті та горючі сполуки (розчинники), кислоти, луги чи інші їдкі та небезпечні речовини – зливати у спеціальний посуд із написом «Зливи.....».

13. Роботи із ртуттю (полярографія) проводити тільки в спеціально відведеному місці у витяжній шафі. Розчини з електролітичної комірки із ртуттю виливати у спеціальний посуд, який знаходиться поряд із полярографом і підписаний „Для зливу ртуті“.

14. Забороняється виконувати роботи з використанням брудного посуду та реактивів невідомого походження чи із нерозбірливим маркуванням (підписом).

15. Реактиви загального користування не переносити із встановленого місця їх розміщення до місця виконання своєї роботи.

16. При змішуванні реактивів чи нагріванні сумішей забороняється заглядати у посуд (з відкритого боку, з отвору). (Можливий самовільний викид маси із посуду!).

17. Не розміщати на лабораторних столах сторонні предмети (одяг, сумки, тощо).

18. Обережно поводитись при роботі зі скляним обладнанням (не прикладати значних механічних зусиль, при затисканні бюреток у лапці штативу поміщати між склом та металом м'який прошарок, обережно поводитись із тонкостінним мірним посудом та термометрами).

19. Перед вмиканням електрообладнання переконатись у його заземленні та справності. Забороняється вмикати прилад при виявленні його візуальних пошкоджень чи оголенні провідників електричного струму. Про виявлення таких ушкоджень слід доповісти черговому інженеру (лаборанту) чи викладачу.

Інструментальні методи аналізу

20. У випадку позаштатних ситуацій, таких як: пошкодження приладів, посуду, виливання розчинів на обладнання, тощо – відключити обладнання від мережі електричного струму – шляхом вимкнення рубильника розміщеного поряд з ним чи центрального рубильника (без нагальної потреби не витягувати вилку із розетки).

21. При роботі із стиснутими (скрапленими, зрідженими) газами дотримуватись правил техніки безпеки, а саме: не допускати нагрівання балонів із газами, не відкривати вентиль на балоні за відсутності редуктора, не змащувати редуктори та вентиля балонів, не кидати та не бити по балону, тощо.

22. Дотримуватись послідовності вмикання та вимикання газів „пального“ та „окисника“ (повітря), що запобігає утворенню вибухових сумішей.

23. Не дивитись без захисного екрана на полум'я пальників, електричної дуги, плазми, тощо.

24. Ставити та виймати тиглі із муфельної печі тільки спеціальними щипцями при вимкненому електричному живленні.

25. При нещасних випадках надати першу медичну допомогу потерпілому. За найменшої підозри про можливість враження електричним струмом – знеструмити місце події, і тільки після цього можна торкатись потерпілого руками.

26. При попаданні на оголені ділянки шкіри, в очі чи рот їдких та невідомого походження речовин – відразу (чим скоріше) промити великою кількістю води, після чого звернутись до викладача, інженера та викликати лікаря.

27. При запамороченні (втраті свідомості) – вивести (винести) постраждалого на свіже повітря, розстебнути верхні гудзики одягу (звільнити шию), перевірити пульс та надати допомогу.

28. Дотримуватись правил протипожежної безпеки. При пожежі в хімічній лабораторії студенти негайно повинні покинути лабораторію. (При горінні хімічних речовин

Розділ 6
можуть утворюватись високотоксичні продукти, а гасити такі пожежі можуть тільки спеціалісти, оснащені спеціальним обладнанням. Пожежі електрообладнання гасять вуглекислотним чи порошковим вогнегасником, іншими вогнегасниками – тільки після знеструмлення).

Питання до самоконтролю:

1. Із зменшенням визначуваної концентрації точність і відтворюваність результатів визначень:

- а) Знижується
- б) Підвищується
- в) Не міняється
- г) Різко підвищується

2. До хімічних методів аналізу відносяться:

- а) титриметричний, нейтралізації, фотометричний
- б) гравіметричний, титриметричний, нейтралізації
- в) фотометричний, електроваговий, радіометричний
- г) гравіметричний, титриметричний, хроматографічний

3. Яким із методів визначають елементний склад речовин?

- а) титриметричним
- б) спектральним
- в) спектрофотометричним
- г) гравіметричним

4. Оцінка стану довкілля за реакцією живих організмів це:

- а) біоіндикація
- б) хроматографія
- в) біоіндикатори
- г) елементний аналіз

5. Живі організми, за наявністю, станом і поведінкою яких можна робити висновки про ступінь зміни довкілля, у тому числі про наявність забруднювальних речовин:

- а) біоіндикатори

Інструментальні методи аналізу

- б) фотоіндикатори
- в) хемоіндикатори
- г) ендоіндикатори

6. Визначення кількісного співвідношення складових частин об'єкту аналізу (його результати, як правило, виражають у масових частках (%)):

- а) кількісний аналіз
- б) якісний аналіз
- в) масовий аналіз
- г) питомий аналіз

7. Речовина, яка використовується для проведення якісної аналітичної реакції, називається:

- а) реагентом або реактивом
- б) сполукою
- в) рідиною
- г) ізотопом

8. Хімічні методи кількісного аналізу засновані на використанні різних типів хімічних реакцій, які кількісно протікають у розчинах, розплавах, твердих тілах або газах. Їх поділяють на:

- а) гравіметричні та титриметричні
- б) нейтралізаційні та, фотометричні
- в) електровагові та, радіометричні
- г) титриметричні та хроматографічні

9. Аналіз оснований на вимірюванні поглинання електромагнітного випромінювання молекулами або іонами у видимій, ультрафіолетовій або інфрачервоній області спектру:

- а) методи молекулярно-абсорбційного аналізу
- б) колориметрія
- в) фотоколориметрія
- г) спектроскопія

10. Зрідження пари у мікропористих сорбентах:

- а) Капілярна конденсація
- б) Хроматографічний аналіз
- в) Колориметрія
- г) Сорбцією.

Розділ 6

Тема 6.2. Потенціометрія й електрометрія



6.2.1. Потенціометричні методи досліджень.

Потенціометрія – це метод аналізу, заснований на вимірюванні електродних потенціалів і електрорушійних сил гальванічних елементів. Потенціометричні методи аналізу мають ряд переваг: метод, у порівнянні з калориметричним, є більше точним до 0,02-0,05 моль/л, що важливо для біологічних досліджень. Оскільки рівноважне значення потенціалу встановлюється швидко, то потенціометричні виміри не вимагають значних витрат часу. Цей метод можна використати в багатокомпонентних системах, мутних і пофарбованих розчинах, в'язких середовищах та ін.

Для визначення pH потенціометричним методом необхідно скласти гальванічний ланцюг з електрода, потенціал якого оборотний до іонів водню, тобто залежить від pH . Такі електроди називаються електродами визначення або індикаторних електродів.

У якості індикаторних можуть бути використані водневий електрод, хінгидронний, сурм'яній і скляний електроди:

- 1) $Pt(H_2)|H^+$, $e = -0,059pH$;
- 2) $Pt|H^+_{x.r.}$, $e = 0,7 - 0,059pH$;
- 3) $Sb, Sb_2O_3|H^+$, $e = e^0 - 0,059pH$;
- 4) ск. ел. $|H^+$, $e = e^0_{ск.} - 0,059pH$.

Другим електродом у гальванічному ланцюзі для виміру pH повинен бути електрод порівняння, що у цих умовах має постійне значення електродного потенціалу.

Як електроди порівняння можуть бути використані каломельний і хлорсрібний електроди.

У цей час найбільш часто використовують як електрод порівняння хлорсрібний електрод (більше зручний по конструкції).

Потенціометричне титрування проводять у тих випадках, коли хімічні

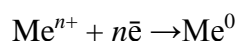
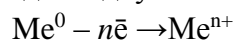
Інструментальні методи аналізу

індикатори використати не можна або в відсутності належного індикатору.

У потенціометричному титруванні як індикатор використовують електроди потенціометра, занурені у розчин, що титрується. У процесі титрування змінюється концентрація іонів, що реєструється на шкалі вимірювального приладу потенціометра.

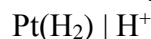
6.2.2. Типи електродів: скляні іоноселективні, рідинні іонообмінні й тверді електроди. Класифікація електродів Залежно від будови та електродної реакції, електроди поділяють на:

1. *I-го роду*, потенціал яких визначається концентрацією або аніону, або катіону;
2. *II-го роду*, потенціал яких визначається концентрацією й аніону і катіону;
3. *Окислювально-відновні (III-роду)* – редокс-електроди у вузькому змісті цього слова, тому що власне кажучи всі електроди є окислювально-відновними;
4. *Мембранні електроди.*
 - а) *Електроди I-го роду:*
 - металеві електроди: пластина, занурена в розчин власної солі: Me/Me^{n+} . На електродах відбувається реакція:



Електродний потенціал розраховується за рівнянням Нернста.

Стандартний водневий електрод записується наступним чином:



при $P_{H_2} = 101,3$ кПа; $\alpha_{H^+} = 1$ моль/л;

$$e_{H^+/1/2H_2} = -0,059pH$$

$e^0 = 0$, тоді за рівнянням Нернста в умовах, відмінних від стандартних:

$$e = e^0 + 0,059/n \cdot \lg[H^+], e_{H_2/H^+} = -0,059pH$$

б) *Електроди II-го роду*

Це як правило метал, покритий важко розчинним золем цього металу та занурений у розчин солі з однойменним аніоном:



Розділ 6

До них відносяться: Каломельний: Hg, Hg₂Cl₂ | KCl (нас)

Хлорсрібний: Ag, AgCl | KCl (нас)

Сурм'яний: Sb, Sb₂O₃ | H⁺

в) *Електроди III роду (редокс - електроди).*

Назва окисно-відновних електродів (редокс-електродів) походить від reduction – відновлення або oxidation – окислення.

Окисно-відновні електроди - це електроди, що складаються з інертного металу (як правило Pt, Au) зануреного у розчин, що містить окислену й відновлену форми однієї речовини.

г) *Мембранні електроди*

Якщо напівпроникну мембрану помістити між двома розчинами різних концентрацій, то через деякий час по одну сторону мембрани виникає надлишок негативних іонів, а по іншу – позитивних. У такому випадку виникає електрохімічна різниця потенціалів, названа мембранним потенціалом.

6.2.3. Потенціометричне титрування.

Потенціометричний метод аналізу базується на вимірюванні величини потенціалу електрода в залежності від фізичних чи фізико-хімічних процесів. Величина потенціалу залежить від природи електрода, від концентрації і природи розчину, в який опущений електрод, від температури та цілого ряду інших факторів (рівняння Нернста). Вимірюючи величину потенціалу електрода, точніше, різницю потенціалів електродної пари, тобто, її електрорушійну силу, можна прослідкувати за ходом хімічної реакції і здійснювати контроль технологічного режиму. Електроди в потенціометричному методі аналізу виступають в ролі індикаторів. В лабораторній практиці потенціометричний метод аналізу знайшов широке застосування для визначення еквівалентної точки в об'ємних методах аналізу, для визначення концентрації іонів в розчині, а також для дослідження хімічних

Інструментальні методи аналізу реакцій. За методом *прямої потенціометрії* визначають значення електродного потенціалу, потім розраховують концентрацію досліджуваного іона в розчині. Цей метод знайшов широке застосування для визначення концентрації водневих іонів. Він має цілий ряд переваг порівняно з іншими методами визначення рН. В об'ємному методі аналізу при *потенціометричному титруванні* кольоровий індикатор замінюють електродом. Кінець реакції визначають за різкою зміною електродного потенціалу в кінці реакції.

Потенціометричне титрування засноване на визначенні точки еквівалентності за результатами потенціометричних вимірів. Поблизу точки еквівалентності відбувається різка зміна (стрибок) потенціалу індикаторного електрода. Так само, як і в інших титриметричних методах, реакції потенціометричного титрування повинні протікати строго стехіометрично, мати високу швидкість і йти до кінця. Для потенціометричного титрування збирають ланцюг з індикаторного електрода в аналізованому розчині й електрода порівняння. Як електроди порівняння найчастіше застосовують каломельний чи хлорсрібний. При титруванні, наприклад, кислоти лугом концентрація іонів H⁺ буде зменшуватися. Зразок кривої титрування представлена на рис.6.2.1.

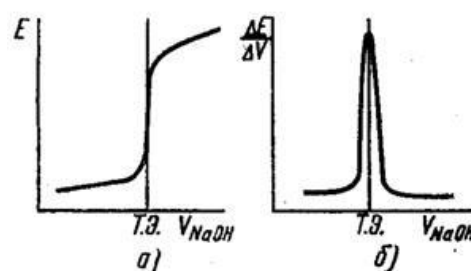


Рис. 6.2.1. Криві потенціометричного титрування кислоти лугом: а – інтегральна крива; б – диференціальна крива.

Як видно, в точці еквівалентності відбувається різкий стрибок е.р.с., викликаний різкою зміною потенціалу індикаторного електрода. Величина стрибка в цьому титруванні залежить від сили кислоти і

Розділ 6

концентрації розчину. Зі зменшенням сили кислоти (її константи дисоціації) і концентрації розчину стрибок титрування зменшується, у зв'язку з чим дуже слабкі кислоти і дуже розведені розчини титрувати взагалі не можна, тому що на кривій титрування не буде стрибка і, отже, не буде виявлена точка еквівалентності.

Практично для знаходження точки еквівалентності часто будують криву в координатах $\Delta E/\Delta V - V$ (рис.6.2.1, б). Рідше використовується графік у координатах $\Delta V/\Delta E - V$, що має деякі переваги при аналізі розведених розчинів, тому що тут точка еквівалентності знаходиться як точка перетинання прямолінійних ділянок кривої титрування до і після точки еквівалентності.

Аналогічний вид мають криві потенціометричного титрування за методами осадження, комплексоутворення та окиснювання – відновлення. Якщо в розчині присутні речовини, що утворюють з титрантом сполуки різної розчинності або комплекси різної стійкості і т.д., на кривій титрування також буде спостерігатися кілька коливань.

Крім розглянутого класичного методу потенціометричного титрування нерідко використовують його нові варіанти – не компенсаційні методи і методи титрування під струмом. У не компенсаційному методі потенціометричного титрування вимірюють струм, що виникає в гальванічному елементі. У процесі титрування компенсація порушується, у ланцюзі виникає струм, причому в області точки еквівалентності струм різко зростає. Точку еквівалентності можна фіксувати безпосередньо за різким зростанням струму або знайти графічно по залежності $\Delta i/\Delta V - V$, де Δi – збільшення сили струму при додаванні в розчин ΔV мл титранта.

До не компенсаційних методів можна віднести і потенціометричне титрування з біметалічною парою електродів. Цей метод заснований на тім, що різні інертні метали з різною швидкістю реагують на зміну потенціалу розчину. Наприклад, платина швидко реагує на зміну відношення

Інструментальні методи аналізу

концентрацій окисненої і відновленої форм, а вольфрам повільно. Тому, якщо опустити платиновий і вольфрамовий електроди в титрований розчин, що містить окисно-відновну систему, і вимірювати різницю потенціалів між ними в ході титрування, то до точки еквівалентності вона буде близька до нуля, а в точці еквівалентності різко зросте.

Основною перевагою методу потенціометричного титрування є висока точність, висока чутливість і можливість проводити визначення в більш розведених розчинах, ніж це дозволяють візуальні індикаторні методи. Необхідно відзначити також можливість визначення декількох речовин в одному розчині без попереднього поділу і титрування в різних середовищах. Значно розширюється область практичного застосування потенціометричного титрування при використанні неводних розчинників. Вони дозволяють, наприклад, знайти вміст компонентів, які у водному розчині роздільно не титруються, провести аналіз речовин, нерозчинних або тих, що розкладаються у воді, і т.д. Немаловажливою перевагою потенціометрії є також можливість автоматизувати процес титрування. Промисловість випускає декілька типів автотитраторів, що використовують потенціометричні датчики.

До недоліків потенціометричного титрування можна віднести не завжди швидке встановлення потенціалу після додавання титранту і необхідність у багатьох випадках робити при титруванні велику кількість повторень.

Полярографія. Теоретичні основи методу

Полярографічний аналіз розроблений у 1922 р. чеським ученим Я. Гейровським. Принципова схема полярографічної установки представлена на рис. 6.2.2.

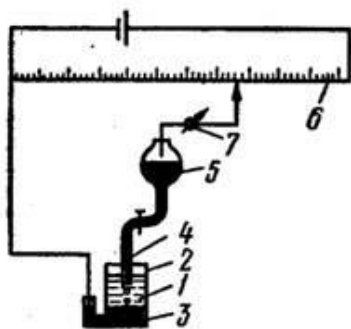


Рис. 6.2.2. Схема полярографічної установки.

Аналізований розчин знаходиться в електролізері 2, на дні якого є шар ртуті 3, який є анодом. Катодом служить ртутний краплинний електрод 4, з'єднаний з резервуаром ртуті 5. Через електролізер протікає струм, напругу якого, подавану на електроди, можна плавно змінювати за допомогою реохорда чи дільника напруги 6 і вимірювати при цьому гальванометром 7 силу струму, що проходить через розчин.

Анод має велику поверхню і практично не поляризується, його потенціал при зміні напруги залишається постійним. (Часто як анод використовують насичений каломельний електрод.) Таким чином, подана напруга буде практично цілком визначати потенціал катода (краплинного ртутного електрода). Опір розчину не беруть до уваги, тому що в розчині в достатній кількості міститься цілком дисоційований фоновий електроліт.

Якщо в розчині немає речовин, здатних відновлюватися на ртутному катоді, залежність струму від напруги буде лінійною, відображаючи закон Ома про пропорційність цих величин. У присутності речовин, що відновлюються на ртутному катоді, в системі почнуться електрохімічні перетворення і вид кривої істотно зміниться.

Коли при підвищенні напруги буде досягнутий потенціал відновлення, іони почнуть розряджатися на ртутному катоді, і сила струму в ланцюзі почне зростати. Концентрація іонів біля поверхні ртутного катода в результаті електровідновлення зменшиться майже до нуля.

Інструментальні методи аналізу

Однак до катода за рахунок дифузії безупинно надходять нові іони, тому сила струму не зменшується, хоча їх кількість із збільшенням напруги зменшується. Концентрація іона, що відновлюється, у глибині розчину постійна, тому що електроліз йде при дуже невеликій силі струму (порядку 10^{-5} А), а концентрація в прикатодному шарі близька до нуля. Різниця концентрацій також постійна, що і приводить до постійної швидкості надходження іонів до катода. Внесок не дифузійних механізмів надходження іонів у прикатодний шар в умовах полярографічного визначення надзвичайно малий.

6.2.4. Полярографічна хвиля. Рівняння полярографічної хвилі. Основне значення серед не дифузійних механізмів має міграція іонів до катода під дією електричного поля. Якщо не усунути міграційний струм, який виник під дією процесу, загальний струм виявиться неконтрольованим і можливості кількісного полярографічного аналізу будуть істотно обмежені. Придушення міграційного струму досягається введенням у розчин в достатній концентрації так званого індиферентного, тобто такого, що не приймає участі в електродній реакції, чи фонового електроліту, зі значно більш негативним потенціалом виділення, ніж в аналізованого іона. Катіони фонового електроліту екранують електрод, зменшуючи тим самим рушійну силу міграції під дією електричного поля практично до нуля.

Таким чином, при деякому потенціалі швидкість розряду іонів на катоді стає рівною швидкості дифузії і настає стан рівноваги, що характеризується постійною силою струму, яка не залежить від напруги. Такий струм називають дифузійним чи граничним.

Типова залежність сили струму від прикладеної напруги дана на рис. 6.2.3.

При невеликому потенціалі катода сила струму повільно збільшується зі зростанням потенціалу – це так званий залишковий струм,

Розділ 6

його величина має порядок 10^{-7} А. Після досягнення потенціалу відновлення на катоді починається розряд іонів і сила струму різко зростає, прагнучи до граничної величини дифузійного струму. Потенціал відновлення, при якому починається розряд іона на катоді, залежить від концентрації іона, що відновлюється, тобто не є постійним.



Рис. 6.2.3. Полярограма

Залежність струму i від прикладеної напруги E при зворотному електродному процесі передається рівнянням зворотної полярографічної хвилі:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{i_d - i}{i} \quad (1)$$

де $E_{1/2}$ -потенціал на півхвилі; i_d – дифузійний (граничний) струм.

У випадку незворотних процесів рівняння полярографічної хвилі ускладнюється. При $i = 1/2 i_d$ рівняння (1) переходить в

$$E = E_{1/2} \quad (2)$$

Це співвідношення показує незалежність потенціалу на півхвилі від струму i , отже, від концентрації іона, що відновлюється. Потенціал на півхвилі є, таким чином, якісною характеристикою іона в розчині даного фонового електроліту, і визначення потенціалу напівхвилі складає основу якісного полярографічного аналізу.

Однак потенціал на півхвилі істотно залежить від середовища і наявності в розчині речовин, здатних до комплексоутворення з досліджуваним іоном. Присутність у досліджуваному розчині ліганда зміщує потенціал на півхвилі в негативну область тим більше, чим міцніший комплекс і вище концентрація ліганда. Це значно розширює

Інструментальні методи аналізу

можливості полярографічного аналізу, дозволяючи створювати умови для визначення декількох компонентів в одному розчині без їхнього попереднього поділу. Якщо в розчині знаходиться кілька речовин, здатних відновлюватися на ртутному катоді, то на полярограмі буде не одна хвиля, а декілька – за числом іонів, що відновлюються (рис.6.2.4).

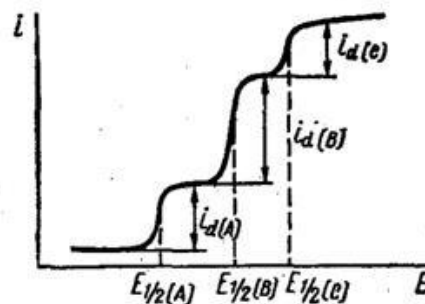


Рис. 6.2.4. Полярограма при наявності в розчині речовин A, B і C

Можна одержати, таким чином, полярографічний спектр іонів, а потім за цими даними і виміряному потенціалі на півхвилі ідентифікувати невідому речовину. Положення елементу в такому спектрі буде залежати від фонового електроліту, його природи і концентрації.

Рівняння Ільковича

На полярограмах нерідко виникають максимуми різної форми, що заважають визначенню дійсної величини потенціалу на півхвилі і сили струму. Розрізняють максимуми I і II роду.

Кількісний полярографічний аналіз заснований на рівнянні Ільковича, що зв'язує дифузійний струм i_d з концентрацією іона C і поруч інших величин:

$$i_d = 605 z D^{1/2} m^{3/2} t^{1/6} C \quad (3)$$

де z -заряд іона; D -коефіцієнт дифузії; m -маса ртуті, що випливає з капіляра за 1 с, мг; t – час утворення краплі (період крапання).

Серед величин, що входять в це рівняння, найважче піддається експериментальному визначенню коефіцієнт дифузії D , а використання відповідних довідкових даних не завжди можливо. Тому в практиці кількісного полярографічного аналізу

Розділ 6

коефіцієнт пропорційності між концентрацією речовини і силою дифузійного струму звичайно встановлюють за допомогою стандартних розчинів. Дійсно, при постійних умовах полярографування D , m і t постійні, тому рівняння (3) переходить в

$$i_d = kC \quad (4)$$

У зв'язку з цим в опублікованих роботах з полярографії завжди повідомляється так звана характеристика капіляру, що обчислюється як $m^{3/2}t^{1/6}$. Найширше застосовується в кількісній полярографії метод каліброваного графіка на основі рівняння (4). Графік будують за даними полярографування, як правило, не менш ніж трьох стандартних розчинів. На осі координат відкладається пропорційна силі дифузійного струму висота полярографічної хвилі, а по осі абсцис – концентрація іона, що відновлюється. Відповідно до рівняння (4) калібрований графік повинний представляти пряму лінію, що проходить через початок координат. При відхиленні від лінійної залежності доводиться збільшувати число стандартних розчинів для того, щоб збільшити число точок для побудови каліброваного графіка. Метод дає точні результати за умови строгої ідентичності умов полярографування стандартних розчинів і невідомої проби. До умов полярографування відносять умови роботи капіляра, температуру і середовище (фоновий електроліт). Метод каліброваного графіка є найбільш трудомістким, але і найбільш точним методом кількісної полярографії.

6.2.5. Метод стандартних розчинів. При аналізі деяких систем, для яких застосовність рівняння (4) є цілком надійним, часто застосовують менш трудомісткий метод стандартних розчинів. У цьому методі в однакових умовах знімають полярограми стандартного й аналізованого розчинів і з пропорції, заснованої на рівнянні (4), розраховують невідому концентрацію C_x :

$$C_x = C_{cm} \frac{h_x}{h_{cm}}$$

де C_{cm} – концентрація стандартного розчину; h_x і h_{cm} – висота хвилі при полярографуванні, відповідно, аналізованого і стандартного розчинів. Метод придатний лише за умов стандартизації полярографування.

Широко розповсюджений у кількісній полярографії метод «добавок». Певною мірою він близький до методу стандартних розчинів. Нехай при полярографуванні досліджуваного розчину сила дифузійного струму дорівнює

$$i_x = KC_x$$

Додаємо до цього розчину відому кількість стандартного розчину C_{cm} і знову визначаємо дифузійний струм:

$$i_{x+cm} = K(C_x + C_{cm})$$

При розподілі одержуємо

$$\frac{i_x}{i_{x+cm}} = \frac{C_x}{C_x + C_{cm}}, \text{ звідки}$$

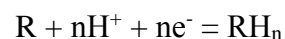
$$C_x = C_{cm} \frac{i_x}{i_{x+cm} - i_x} \quad (5)$$

За співвідношенням (5) знаходимо концентрацію аналізованого розчину.

У методі «добавок» автоматично враховується вплив фону і так званих «третіх» компонентів, що є значною перевагою методу і дозволяє застосовувати його при аналізі складних сумішей.

Електроди в полярографії

Об'єктами полярографічного аналізу є не тільки неорганічні речовини чи іони, але і багато органічних речовин, здатних до електрохімічних перетворень. В електродній реакції органічної речовини звичайно беруть участь іони водню:



Електрохімічне відновлення більшості органічних речовин має незворотній характер, тому рівняння полярографічної хвилі стає складнішим і рівняння Ільковича часто не дотримується. Проте, для багатьох органічних речовин знайдені умови, при яких вони можуть

Розділ 6
бути кількісно визначені
полярнографічним методом. До полярнографічно
активних угруповань відносяться, наприклад,
>CHO; >C=N- ; NO₂; -NHOH ; -O-O- ; -S-S- та
багато інших.

Полярнографічним методом можуть бути
визначені, наприклад, багато альдегідів, кетони,
азо- і нітросполуки, аміно- і галогенопохідні,
ряд органічних пероксидів, органічні кислоти
(малеїнова, фумарова й ін.). Число таких
сполук безупинно збільшується.

Окрім ртутних електродів у
полярнографії з успіхом застосовують тверді
мікроелектроди, виготовлені зі шляхетних
металів (платини, золота й ін.) чи графіту.
Мікро- називають тому, що електрод має дуже
невелику поверхню для створення досить
високої щільності струму і наближення до тих
умов, в яких працює ртутний краплинний
електрод. Основними перевагами твердих
електродів є можливість роботи в більш
позитивній області потенціалів (до 1,3 В), ніж із
ртутним електродом (ртутний краплинний
електрод використовується в області приблизно
від 0,3 до – 2,0 В) і їхня не токсичність (пари
ртуті, як відомо, надзвичайно отруйні, і робота
з ртутним електродом вимагає чіткого
дотримання спеціальних правил техніки
безпеки). Однак використання твердих
електродів також має свої труднощі, пов'язані
головним чином з відновленням поверхні
електродів і безупинним збідненням
приелектродного шару розчину. Стаціонарні
тверді електроди не знайшли широкого
застосування в практиці через повільність
встановлення граничного струму, невисокий
чутливості і необхідності очищати поверхню
електродів після кожного досліду.

Значно ширше застосування мають
обертіві і вібруючі платинові мікроелектроди.
При роботі таких електродів рідина біля них
безупинно перемішується і концентрація
речовини, що відновлюється, у
приелектродному шарі підтримується досить
високою. За точністю методи з застосуванням
твердих електродів часто поступаються

Інструментальні методи аналізу

методам, що використовують ртутний
краплинний електрод, однак застосування
обертіві платинового мікроелектрода
дозволяє істотно розширити область
потенціалів, придатну для полярнографічних
вимірів у порівнянні з областю, в якій звичайно
застосовується ртутний краплинний електрод.

Амперометричне титрування

Це титрування займає в
полярнографічному аналізі особливе місце. Його
проводять в електролізері полярнографа і в
процесі титрування після додавання окремих
порцій реактиву вимірюють силу дифузійного
струму при обраній напрузі. Як індикаторний
електрод в амперометричному титруванні
поряд із ртутним краплинним застосовуються
обертіві платинові, графітові й інші тверді
електроди. Для визначення полярнографічно-
неактивних речовин розроблені спеціальні
методики. За цими методиками в аналізованій
розчин вводять спеціальний іон-індикатор,
здатний до електродної реакції і який реагує з
тим же титрантом, що й досліджувана
речовина.

Назва методу «амперометричне
титрування», як неодноразово відзначалося у
наукових виданнях, є невдалим з багатьох
причин, зокрема тому, що цей термін не
відбиває специфіки полярнографічних вимірів
(поляризацію електрода і т.д.). Однак у зв'язку
із широким поширенням цього терміну ми
також будемо його використовувати. Вид
кривої амперометричного титрування буде
залежати від того, який компонент реакції
титрування вступає в електродну реакцію і при
якому потенціалі ведеться титрування. Сама
реакція титрування, природно, буде протікати
незалежно від цих умов. Нехай, наприклад,
титрується Ag⁺, Pb²⁺, V³⁺ чи якийсь інший іон,
здатний відновлюватися на катоді, яким-небудь
осаджувачем і після кожного додавання
титранту знімається полярнограма розчину. В
результаті реакції осадження концентрація
досліджуваного іона в розчині буде
зменшуватися і будуть виходити полярнограми

Розділ 6
із меншою величиною дифузійного струму
(рис.6.2.5, а).

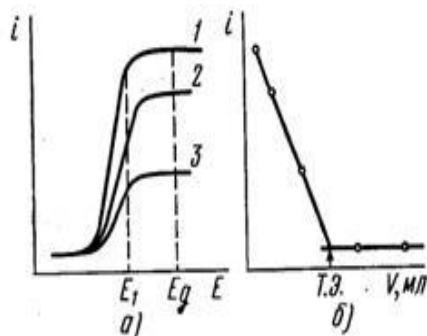


Рис. 6.2.5. Амперметричне титрування катіону, який відновлюється на катоді: а – полярограма при різних кількостях доданого титранту: 1- 0 мл; 2 – V_1 мл; 3 – V_2 мл; ($V_2 > V_1$); б – крива титрування

У точці еквівалентності струм падає до мінімуму і далі залишається постійним. Крива цього титрування представлена на рис.6.2.5, б, де на графіку відкладена сила дифузійного струму як функція об'єму доданого реактиву. Точка еквівалентності (т.е.) знаходиться як точка перетину прямих.

Знімати повну полярограму після кожного додавання титранту немає необхідності, тому що для побудови кривої титрування і визначення точки еквіваленту достатньо знати силу дифузійного струму при напрузі E_d . Титрування при іншому потенціалі, наприклад при E_1 , буде давати меншу точність, тому що при цьому потенціалі буде вимірюватися не дифузійний струм. Вимірюваний при потенціалі E_1 струм не буде досить стабільний, і крива титрування в цьому випадку не буде лінійною. Таким чином, амперметричне титрування варто проводити при потенціалі, що відповідає області дифузійного струму. Звичайно титрують при потенціалі на 0,2–0,3 В, більш від'ємному, ніж потенціал напівхвилі полярографічно активної сполуки. Крива титрування має інший вигляд (рис.6.2.6), ніж на рис. 6.2.5, якщо в електродну реакцію вступає не досліджувана речовина, а титрант, як це має місце, наприклад, при титруванні барію хроматом:

Інструментальні методи аналізу

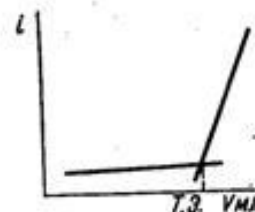
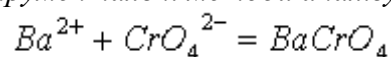


Рис. 6.2.6. Крива амперметричного титрування барію хроматом

До точки еквівалентності дифузійний струм хромату невеликий, тому що концентрація хромату незначна. Після точки еквівалентності надлишкова концентрація хромату в розчині викликає різке збільшення сили дифузійного струму.

На рис. 6.2.7 наведена крива амперметричного титрування за дифузійним струмом, зумовленим концентрацією продукту реакції, що утворився при титруванні.

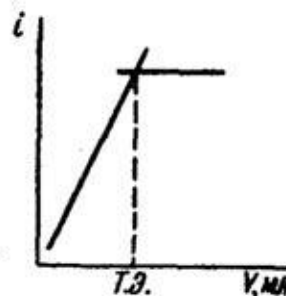
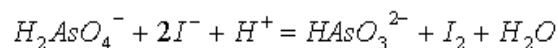


Рис. 6.2.7. Крива амперметричного титрування миш'якової кислоти йодидом калію

Цей випадок реалізується, наприклад, при титруванні миш'якової кислоти йодидом калію:



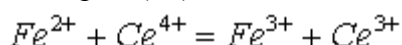
В міру титрування концентрація вільного йоду, що виділяється як продукт реакції, буде зростати до точки еквівалентності, після чого залишиться постійною.

Крім розглянутих найбільш розповсюджених типів кривих амперметричного титрування відомі й інші типи цих кривих і інші методики титрування. Широке поширення останнім часом одержав метод амперметричного титрування з двома

Розділ 6
індикаторними електродами. Іноді його називають також методом мертвої кінцевої точки («dead – stop endpoint»); методом титрування до повної зупинки, біамперометричним титруванням і т.д. При визначеннях за цим методом в аналізований розчин вводять два платинові чи інші електроди під невеликою постійною напругою (0,02–0,05 В) і в ході титрування визначають силу струму.

Реакцією титрування звичайно (але не завжди) є реакція окиснення – відновлення. До початку титрування струм між електродами дуже малий, або взагалі не спостерігається, тому що під час відсутності окисно-відновної пари при настільки малій різниці потенціалів електродні процеси не відбуваються. Введення титранту викликає поява в аналізованому розчині двох окисно-відновних пар, причому до точки еквівалентності в розчині в помітних кількостях будуть знаходитися компоненти пари, утвореної титрованою речовиною, а після точки еквівалентності – компоненти, утворені титрантом. Вигляд кривої титрування буде визначатися в основному електрохімічною зворотністю цих пар.

Якщо обидві окисно-відновні пари зворотні, як, наприклад, в реакції титрування заліза (II) сіллю церію (IV):



Додавання перших же порцій соли Ce^{4+} викликає утворення в розчині окисно-відновної пари Fe^{3+}/Fe^{2+} , і в ланцюзі з'явиться струм, тому що відновлення Fe^{3+} на катоді й окиснення Fe^{2+} на аноді внаслідок високої зворотності системи відбувається при мінімальній різниці потенціалів. Сила струму буде зростати, поки не прореагує приблизно половина Fe^{2+} , потім розпочне зменшуватися й упаде майже до нуля в точці еквівалентності. Після точки еквівалентності на катоді буде відновлюватися Ce^{4+} , а на аноді окислюватися Ce^{3+} і струм у ланцюзі знову з'явиться.

Якщо система, утворена досліджуваною речовиною, зворотна, а титр – незворотний, як,

Інструментальні методи аналізу

наприклад, при титруванні Fe^{2+} перманганатом, крива титрування до точки еквівалентності не буде відрізнятися від кривої на рисунку 6.2.8 а, тому, що в обох випадках струм у системі до точки еквівалентності контролюється електрохімічно зворотною системою. Однак після точки еквівалентності зростання струму не відбудеться, тому що при цій різниці потенціалів Mn^{2+} на аноді окислюватися не буде.

Якщо титрується електрохімічно незворотна система, а титрант утворить зворотну окисно-відновну пару, до точки еквівалентності струму не буде, а після точки еквівалентності він різко зростає (рис.6.2.8 б). Такий вигляд має крива титрування, наприклад, перманганату розчином солі Мору чи тіосульфату розчином йоду.

Метод амперометричного титрування з двома індикаторними електродами досить точний і чутливий. Він придатний для аналізу розчинів з концентрацією досліджуваної речовини 10^{-5} М і менше. В апаратурному відношенні він простіший, ніж метод з одним індикаторним електродом. При титруванні за цим методом часто зникає необхідність у побудові кривої титрування, тому що точка еквівалентності може бути визначена за різкого припинення чи постачання струму.

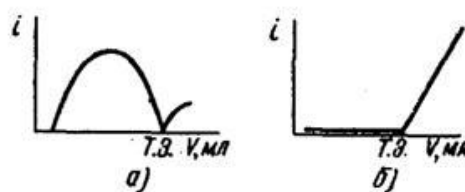


Рис. 6.2.8. Криві амперметричного титрування з двома індикаторними електродами: а – обидві пари зворотні; б – незворотна система титрується зворотною

Серед переваг методу амперометричного титрування слід зазначити його більш високу універсальність, ніж, наприклад, потенціометричного, тому що для амперометричного титрування може бути використано ширше коло реагентів, зокрема

Розділ 6
органічних. Метод амперометричного титрування одержав останнім часом дуже широке поширення, тому що характеризується високою точністю визначення малих кількостей і швидкістю виконання. Часто амперометричне титрування проводять у розчині без попереднього хімічного розділення.

Методи аналізу, при яких використовують процеси поляризації на ртутному або іншому електроді, називаються полярографічними. Полярографічний метод достатньо універсальний і застосовується до широкого кола об'єктів. Основними перевагами методу є швидкість аналізу, можливість визначення декількох речовин в суміші без попереднього їх розділення, достатньо висока точність і чутливість. Погрішність полярографічного методу аналізу в звичайних умовах становить $\pm 2\%$ для розчинів концентрації порядку $10^{-3}\dots 10^{-4}$ моль/л і близько $\pm 5\%$ для менше концентрованих. Цей метод застосовують для визначення багатьох металів та органічних сполук.

Амперометричне титрування застосовують для визначення катіонів та аніонів в різних технічних і природних об'єктах, мінеральній сировині і продуктах її переробки, природних водах, промислових розчинах і т.д. Використання реакцій різного типу (осадження, комплексоутворення і окиснення – відновлення) дозволяє підбирати умови амперометричного титрування для більшості елементів періодичної системи.

Практичний блок

Потенціометрія й електрометрія. Основні поняття та устаткування для вимірювань

Потенціометрія – електрохімічний метод аналізу зазвичай розчинів речовин (іонів, молекул), який базується на вимірюванні потенціалу індикаторного електроду відносно електроду порівняння (електрорушійної сили гальванічного елементу (ЕРС)) та відповідних

*Інструментальні методи аналізу
розрахунках концентрації (активності)
аналіту.*

Причому, одержані відносні значення потенціалів використовують у методі прямої потенціометрії (іонометрії), а *реєстрацію зміни значень потенціалу* в процесі титрування (хімічної реакції) – у методі потенціометричного титрування.

Значення відносних електродних потенціалів отримують шляхом *вимірювання*, за допомогою потенціометра *електрорушійної сили гальванічного елементу електрохімічного ланцюга*, що складається з двох електродів* (*Мембранні електроди часто містять додатковий (внутрішній) електрод, а ряд фірм виробників іон-селективних електродів випускають електроди, які містять в одному корпусі 2 електроди: порівняння та індикаторний.– індикаторного та електроду порівняння) занурених у досліджуваній розчин (електрод порівняння зазвичай з'єднаний з досліджуванним розчином через сполучний канал). Як приклад, відповідна схема вимірювання потенціалів іон-селективних електродів (ІСЕ) приведена на рис. 6.2.9.

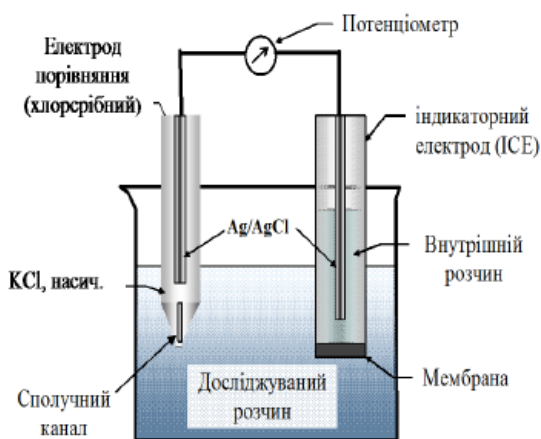


Рис. 6.2.9. Принципова схема вимірювання електрорушійної сили гальванічного елементу за участі іон-селективних електродів. *Схема вимірювання електрорушійної сили гальванічного елементу електрохімічного ланцюга з іон-селективним електродом: Ag, AgCl/ KCl нас./Досліджуваній розчин // Мембрана // Внутрішній розчин /AgCl, Ag.*

Можливості потенціометрії в основному визначаються природою та типом індикаторного електроду. В потенціометрії

Розділ 6 знаходять застосування: електроно-обмінні (першого, другого родів, окисно-відновні), іоно-обмінні електроди (іон-селективні гомогенні та гетерогенні, скляні та кристалічні, пластифіковані мембранні, тощо).

Процедура тестування електронного рН-метра. Вимірювання рН розчинів

Визначення кислотності розчинів зі скляним рН – електродом

Принцип методу. Кислотність середовища (*pH*) відіграє надзвичайно важливу роль у різноманітних хімічних, технологічних та біологічних процесах. Розчини різних речовин (хімічних реактивів, харчових, технічних продуктів) характеризуються певними значеннями кислотності середовища, що в багатьох випадках є критерієм їх якості. За зміною кислотності середовища, встановлюють точку еквівалентності у процесі кислотно-основного титрування.

Потенціометрія із використанням скляного рН – електроду є класичним методом визначення кислотності середовища і має широке застосування у різних галузях науки, техніки та медицині.

Реактиви та інструменти: Стандартні буферні розчини з рН 1,68; 4,01; 6,86 та 9,18 (готують з фіксаналів на щойно отриманій чи кип'яченій дистильованій воді). рН-метр чи іономір, скляний рН-електрод, хлор-срібний електрод – заповнений насиченим розчином КСІ, або ж комбінований електрод, що містить в одному корпусі обидва електроди.

Калібрування рН-метра (Іономіра). Зазвичай, комерційні рН-метри та іономіри передбачають проведення калібрування за двома точками, для чого використовують відповідні зразкові (стандартні) буферні розчини. До початку роботи проводять калібрування підготовку електродів. Калібрування проводять шляхом почергового занурення електродів у стандартні розчини з відповідним показником рН.

Наприклад, калібрування приладів рН-121 чи ЕВ-74 (рис. 6.2.10) проводять наступним чином. Перед початком вимірювань до

Інструментальні методи аналізу високоомного входу потенціометра приєднують, попередньо вимочений протягом доби, скляний рН-електрод, а до низькоомного входу - хлор-срібний електрод. Електроди закріплюють в тримачі штативу з поворотним столиком та стаканом з водою. Між вимірюваннями (якщо вони проводяться через час, що перевищує 1 хв.) електроди повинні бути зануреними у дистильовану воду, що завадить їх висиханню.

Підключають прилад до мережі електричного струму (220 В) і прогрівають 10-15 хвилин. У стаканчики наливають стандартні буферні розчини.

Електроди перед зануренням у стандартний буферний розчин ретельно промивають із промивалки дистильованою водою, після чого фільтрувальним папером обережно знімають краплі води, майже не торкаючись скляної поверхні рН електроду.

Підставляють стаканчик з буферним розчином рН 1,68. Через 1-2 хвилини, знімають показники температури розчину із термометра, який кріпиться на штативі з електродами і ручкою, встановлюють на шкалі приладу відповідне значення температури (за наявності термокомпенсатора останнє не проводять).

Натискають 4 – та – рН (рХ) і ручкою – Калібрування встановлюють значення клавіші – 1–1,68. Натискають на кнопку –Т, та знімають стаканчик із столика. Ретельно промивають електроди і обережно висушують фільтрувальним папером.

Підставляють стаканчик з буферним розчином з рН 9,18, натискають кнопки – 9-14 та – рН. Спеціальною ручкою встановлюють стрілку приладу в положення 9,18.

Натискають кнопку – Т, 0. Знімають стаканчик з столика і промивають електроди водою. Знову занурюють електроди в розчин з рН 1,68 і повторюють вище описані операції. Тоді перевіряють покази приладу на буферних розчинах з рН 4,01 та 6,86. Відповідні значення не повинні відрізнитись від паспортних більше як на 0,05 рН. Інколи рекомендується промивати електроди

Розділ 6

невеликою порцією буферного розчину, що використовується для градування. Фіксують положення регуляторів від можливого випадкового прокручування цанговими затискачами. Знімають із столика перший стандартний розчин, промивають електроди дистильованою водою, знімають з поверхні краплі води з допомогою фільтрувального паперу не торкаючись поверхні чутливого елементу та занурюють електродну систему в другий стандартний розчин.

Перед зануренням електродів у другий стандартний розчин (рН 9,18) промити їх невеликою кількістю цього розчину. Далі регуляторами налаштування (перемикачем 2 «грубо» та 8 «точно»), орієнтуючись на цифрове табло, виставляють значення рХ=9,18 другого калібрувального розчину.

Після цього провести перевірку показів приладу за першим стандартним розчином (у разі не співпадання показів, слід повторно провести калібрування) та іншими стандартними розчинами (рН4,01 та 6,86).

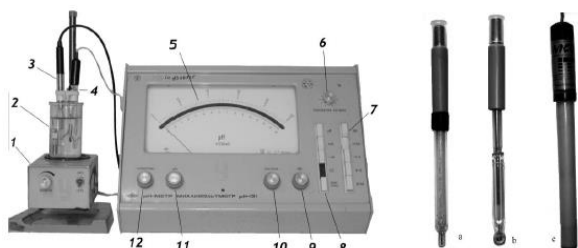


Рис .6.2.10. Загальний вигляд приладу рН-121 (подібний вигляд має прилад ЕВ-74)

1 – столик (магнітна мішалка); 2 – стакан з розчином; 3 – індикаторний електрод; 4 – електрод порівняння; 5 – індикатор; 6 – ручка встановлення температури; 7 – клавіші вибору діапазонів; 8 – клавіші вибору виду вимірювань; 9 – регулятор «НИ»; 10 – регулятор «Крутизна», 11 – регулятор «рН», 12 – регулятор «Калібрування». Деякі електроди потенціометрії: а – хлор-срібний електрод порівняння, б – скляний рН електрод, с – нітрат селективний електрод.

Хід аналізу. Отримати у викладача чи інженера (лаборанта) розчин контрольної проби. Для рН-121 чи ЕВ-74: При натиснутій кнопці – Т, 0 встановлюють температуру розчину, як описано вище. Натискають на кнопки – 1-14 та – рН, зчитують значення і

Інструментальні методи аналізу

вибирають, шляхом вмикання кнопки відповідного піддіапазону значення рН. Записують отриманий результат – рН з точністю $\pm 0,01$ рН.

Після завершення вимірювань електроди промивають дистильованою водою, занурюють їх в стакан із дистильованою водою і вимикають прилад.

Питання до самоконтролю:

- Який з методів визначення фтористого водню і фторидів має найбільше переваг?
 - з торій-тороновим комплексом
 - з церійалізаринкомплексом
 - з фторселективним електродом
 - з цирконій-алізариновим комплексом
- Іонселективні електроди використовують в:
 - кондуктометрії
 - полярографії
 - електрохімії
 - потенціометрії
- В основі електрохімічного процесу лежить:
 - окислення-відновлення на електродах
 - іонообмінна реакція
 - протікання електродної реакції
 - обмін електронами у розчині
- Потенціометричний метод аналізу ґрунтується на вимірюванні:
 - електропровідності розчину
 - потенціалу електрода
 - температури розчину
 - потенціалу електрода, зануреного в розчин
- В основі потенціометричного аналізу лежить рівняння:
 - Ламберта-Бугера-Бера
 - Нернста
 - Гейровського-Ільковича
 - Ільковича
- Яка із вимог до електрода порівняння в потенціометрії є головною?
 - щоб потенціал електрода був постійним

Розділ 6

- б) щоб був зручної для вимірювання форми
 в) щоб потенціал електрода був постійним, відтворюваним і не залежав від складу розчину
 г) щоб потенціал електрода був відтворюваним

7. Срібний і ртутний електроди використовують в потенціометрії в якості електродів:

- а) порівняння та індикаторних
 б) перівняння
 в) індикаторних
 г) допоміжних

8. Головною частиною скляного електрода є:

- а) хлорсрібний електрод
 б) скляна кулька із іонселективного скла
 в) внутрішній електрод
 г) зовнішній електрод

9. Кондуктометричний метод аналізу ґрунтується на вимірюванні:

- а) електропровідності розчину
 б) точної маси визначуваної речовини, що виділяється на електродах при проходженні через розчин постійного електричного струму
 в) потенціалу електрода, зануреного в розчин
 а) електропровідності розчину, що змінюється в результаті хімічної реакції

10. Індикаторні електроди для визначення рН та при кислотно-основному титруванні та рNa, рLi, рAg;

- а) скляні
 б) пластифіковані
 в) твердофазні
 г) платинові

Тема 6.3. Електрофорез

**6.3.1. Електроміграційні методи.**

Електрофорез (від електро- і грец. φορέω – переносити) – процес розділення іонних форм та частинок дисперсної фази речовин, внаслідок різниці у їх міграції під впливом електричного поля. Під міграцією розуміють різну відстань чи швидкість переміщення.

Різні іонні форми речовини (у розчині) від простих (одноатомних) іонів до складних макромолекулярних систем (білків та деяких полімерів) характеризуються різними:

1. розмірами та формою;
2. зарядом (величина та знак);
3. сольватною (гідратною) оболонкою;
4. рухливістю;
5. сорбційними властивостями, тощо.

Ці фактори зумовлюють різну міграцію частинок у розчині, що є основою електрофоретичного розділення.

За апаратурним оформленням розрізняють:

- Площинний (класичний) електрофорез
- Капілярний електрофорез (високо-ефективний капілярний електрофорез – ВЕКЕ)

Фактори, які впливають на розділення речовин методом електрофорезу.

На швидкість міграції зон, їх розділення, розмивання та відтворюваність результатів крім вищезгаданих «внутрішніх» факторів впливають:

1. Градієнт потенціалу (напруга/відстань між електродами).
2. Природа та властивості носія (інертного матеріалу) його сорбційні та хімічні властивості.
3. Природа та концентрація фонового електроліту (іонна сила).
4. рН електроліту, його буферна ємність.
5. Температура та її зміни в процесі розділення.

Розділ 6

6. Наявність додаткових компонентів (модифікаторів) електроліту.

В процесі проведення розділення наявний **потік води в напрямку від аноду до катоду**, в зв'язку з тим, що катіони є більш сольватованими (більші числа сольватації) у порівнянні з аніонами. Це явище називається **електроосмос**, і воно призводить до переміщення нейтральних молекул від точки внесення до катоду на певну відстань. У випадку, коли реєстрація аналітичного сигналу здійснюється за допомогою відповідного детектора, пов'язаного із комп'ютером чи самописцем, а проба вводиться за допомогою спеціальної системи вводу – різновид називають високоефективним капілярним електрофорезом (ВЕКЕ).

Препаративний електрофорез застосовують для виділення значної кількості препарату для подальшого його застосування.

Аналітичний електрофорез застосовують для визначення компонентів у суміші, контролю чистоти речовини та ін.

За способом розміщення носіїв розрізняють горизонтальний та вертикальний електрофорез.

Залежно від мети досліджень найчастіше застосовують *фронтальний електрофорез* (або метод рухомої межі), *зональний електрофорез* (або електрофорез на носії), *ізоелектрофокусування*, *ізотахофорез*, *імуноелектрофорез*. Кожний з цих методів має ряд модифікацій, які в деяких випадках набувають певної самостійності. Основні з них: електрофорез у градієнті густини, в колонках, в блоці і неперервний (проточний), диск-електрофорез, на носіях – папері, ацетат целюлозі, в тонких шарах, гелях та ін.

Розрізняють фронтальний, капілярний електрофорез, ізотахофорез та ізоелектричне фокусування.

6.3.2. Зонний електрофорез на папері.

Капілярний зонний електрофорез є найрозповсюдженішим. Він передбачає

Інструментальні методи аналізу

застосування одного буфера як розділювального середовища. Розділення компонентів проби базується на розбіжностях у рухливостях заряджених молекул чи іонів. Метод широко застосовують для визначення пептидів, білків, амінокислот, лікарських препаратів, неорганічних іонів та багатьох інших об'єктів.

Капілярний іонний аналіз – це різновид капілярного зонного електрофорезу, в якому для визначення неорганічних іонів, що не поглинають світло в УФ-області спектра, застосовується посереднє фотометричне детектування. Це роблять, уводячи до буфера для електрофорезу катіони, що поглинають світло в УФ-області спектра. Капілярна електрокінетична хроматографія – базується на розділенні нейтральних частинок при їх розподілі між частинками, які рухаються в електричному полі, та електролітом, який заповнює капіляр. Такий розподіл може бути обумовлений дією молекулярних сил, іон-парною взаємодією, комплексоутворенням (лігандний обмін). Існують різновиди капілярної електрокінетичної хроматографії: міцеларна, іонообмінна, лігандообмінна.

Принцип фракціонування (електрофорезу) заснований на тому, що в електростатичному полі білки рухаються по змоченому буферним розчином хроматографічному папері (ацетатцелюлозної плівці, крохмаловому, агаровому гелям) зі швидкістю, що залежить в основному від величини електричного заряду та молекулярної маси частинок. Внаслідок цього білки поділяються на фракції. При обробці барвниками білки зв'язуються з ними пропорційно своїй концентрації. Визначивши інтенсивність фарбування, можна обчислити концентрацію білкових фракцій.

Система для електрофорезу. Блок живлення повинен давати стабілізований струм силою 2–100 мА при напрузі 180–300 В.

Електрофоретична камера. Для запобігання смуги носія від висихання в камері повинна підтримуватися певна вологість

Розділ 6
повітря. При нагріванні паперу посилено випаровується буферний розчин у середині смуги і з країв стрічки, що обумовлює його рух (реофорез) і внаслідок цього зміна форми плям фракцій білків у процесі їх електрофоретичного поділу; тому окремі конструкції електрофоретичної камери розташовують системою охолодження смужок носія.

У різних відділах камери буферний розчин повинен мати однаковий рівень, щоб уникнути його переливу через стрічку в результаті сифонової дії. Кінці смужок носія не слід занурювати в буферний розчин, в якому знаходяться електроди. Електричний зв'язок між стрічками і електродами встановлюють за допомогою містків з паперових смужок (вати, марлі), змочених буферним розчином; цим усувається передача змін рН буфера в той простір, в яке занурені стрічки.

Оскільки смуга ацетатцеллюлозної плівки (паперу) може бути розташована як горизонтально, так і під кутом до горизонталі (вертикально), відповідно розрізняють горизонтальний і вертикальний електрофорез. Перший з них дозволяє отримати більш точні результати. Важливо, щоб смужка носія (хроматографічного паперу, ацетатцеллюлозної плівки) була добре натягнута. Бажано, щоб вона розташовувалася як би в «підвішеному» стані системою натягнутих капронових ниток, а зв'язує обидві ванни місток мав шипи для укладання на них смужок. Це запобігає утворення тонкого капілярного шару буферного розчину між смужкою ацетатцеллюлозної плівки, хроматографічним папером і пластиною; капілярний шар буферного розчину в значній мірі погіршує якість електрофоретичного поділу.

Значне значення мають властивості носія, використовуваного для електрофорезу. Ацетатцеллюлозна плівка, як і хроматографічний папір, повинна бути однорідною і щільною. Оскільки в окремих лабораторіях все ще використовують хроматографічний папір, обраний сорт паперу:

Інструментальні методи аналізу
«хроматографічний швидка» або «хроматографічний повільна» – не можна міняти, так як від цього в певній мірі залежать одержувані результати.

Напрямок ходу волокон целюлози в папері можна визначити за розтіканням на ній краплі води, що приймає форму еліпса, який відповідає за поширення волокон целюлози.

Підготовка до електрофорезу та процедура його проведення. Перед електрофорезом камеру встановлюють строго горизонтально. Кювети заповнюють буферним розчином таким чином, щоб рівень рідини в них був однаковий. Обидва відділення кожної кювети з'єднують один з одним смужкою фільтрувального паперу. Смужки ацетатцеллюлозної плівки (хроматографічного паперу) рівномірно натягують між кюветними відділеннями. Необхідно, щоб кінці зволожених буфером смуг (мембран) були занурені в буферний розчин внутрішніх відділень (якщо такі є) електродних кювет.

Найкращі результати дає метод просочування хроматографічного паперу буферним розчином. Однак на практиці в цілях економії часу стрічки зазвичай змочують у буфері і злегка висушують, віджимаючи між листами фільтрувального паперу.

Нанесення на смужку носія біологічного матеріалу здійснюється за допомогою аплікатора (спеціального або імпровізованого) або мікропіпетки (автоматичною, звичайною).

Буферні розчини. На електрофоретичне фракціонування білків великий вплив має рН буферних розчинів, склад і концентрація складових їх реагентів, так як від кислотності (лужності) середовища, іонної сили буферної суміші й деяких інших факторів багато в чому залежать позначка і величина електричного заряду молекул білків.

В якості електроліту найчастіше застосовують веронал-мединаловий, веронал-ацетатний, мединаловий, трис-буфер. Рідше використовують боратний і фосфатний буфер.

Найбільш добре зарекомендували себе такі буферні розчини:

Розділ 6

- Вероналовий (веронал-мединаловий) буфер з рН 8,6.
- Веронал-ацетатний буфер з рН 8,6.
- Мединаловий буфер з рН 7,6.
- Трис-буферу з рН 8,9 (дуже добре розділяються білки сироватки крові (з виділенням до 9 фракцій) при використанні трис-буферу з рН 8,9).
- Калій-фосфатний буфер рН 8,0–8,3

6.3.3. Гель електрофорез. Гель-електрофорез (Gel-electrophoresis) – електрофорез, в якому суміш заряджених макромолекул ділиться в результаті різниці в їх заряді, розмірі та швидкості міграції через гель (або розчин нейтрального полімеру), який розміщений в електричному полі.

Рух частинок при електрофорезі залежить від низки факторів: від розмірів, форми, концентрації, електричного заряду, ступеня гідратації і ступеня дисоціації самих частинок, від в'язкості, рН, температури та іонної сили середовища, від напруги електричного поля, тривалості електрофорезу і довжини шляху, що пройшла частинка.

Співвідношення між електрофоретичною рухливістю, швидкістю пересування, напругою поля, величиною рН та іонною силою однакові як для вільного електрофорезу так і електрофорезу в носії (зональний електрофорез). В останньому випадку на рухливість і чіткість розділення впливають також адсорбція, неоднорідність речовини носія та його іонообмінні властивості, електроосмос, капілярний ефект, підвищення температури та концентрація. При застосуванні поліакриламідного гелю як носія вплив адсорбції та електроосмосу виключається.

Для електрофорезу зазвичай застосовують поліакриламідний (ПААГ) гель, агарозу, змішаний гель (агароза+ПААГ) та ацетатцелюлозну плівку. Вихідними матеріалами для синтезу поліакриламідного

Інструментальні методи аналізу гелю є акриламід, NN–метиленбісакриламід, персульфат амонію, рибофлавін та тетраметилетилендіамін.

Акриламід ($CH_2=CH-CONH_2$) – це білий кристалічний порошок. Добре очищений комерційний препарат містить не більше 0.05 % акрилової кислоти. Його 5 % водний розчин повинен мати рН не нижче 5, а оптична густина 1 % розчину при 290 нм не повинна перевищувати 0.15. Таку речовину можна застосовувати без додаткового очищення або перекристалізації. Акриламід слід зберігати сухим, в темному посуді, найкраще у прохолодному місці. В таких умовах він може зберігатися до року. Оскільки акриламід чинить шкідливу дію на шкіру та нервову систему, його слід зважувати і розчиняти у рукавичках та у витяжній шафі.

NN – метиленбісакриламід («Біс») – $(CH_2=CH-CONH)_2-CH_2$ – застосовують в якості «зшивання» лінійних полімерів акриламідів. Препарати, які містять не більше 0,02 % акрилової кислоти, не потребують додаткового очищення. Умови зберігання та токсичність такі самі, як і в акриламіді.

У якості «зшивання» іноді застосовують етилендіакрилат, а також NN – диалілтартардіамід (ДАТД). За допомогою них одержують «розчинні» гелі. У першому випадку ефірний зв'язок можна розірвати обробкою гелю лугом або водним розчином піперидину. Персульфат амонію виробляється у вигляді білого кристалічного порошку або гранул. Його застосовують як ініціатор процесу полімеризації. Гомолітичне розривання зв'язку між атомами кисню в молекулі персульфату амонію призводить до утворення двох вільних радикалів із одним неспареним електроном у атомі кисню. Такий радикал стимулює розрив подвійного зв'язку в молекулі акриламідів та приєднується до неї таким чином, що знов утворюється радикал із неспареним електроном, але вже в атома вуглецю. Цей радикал, у свою чергу, викликає розрив подвійного зв'язку та приєднання наступної молекули акриламідів із утворенням нового

Розділ 6
радикалу тощо. Ланцюгова реакція полімеризації йде до того часу, поки два радикали, зустрівшись між собою, не утворюють звичайний ковалентний зв'язок.

За тим самим механізмом до ланцюга лінійного полімеру, який росте, може однією із своїх кінцевих ванільних груп вбудуватися і метиленбісакриламід. Другий його кінець може так само опинитися у складі іншого полімерного ланцюга, й утворюється «зшивання». Персульфат амонію у водному розчині поступово розкладається, тому слід застосовувати лише щойно приготовані розчини. Сухий препарат зберігається краще, хоча і він повільно розкладається з виділенням кисню. Комерційні препарати для електрофорезу звичайно добре очищені, але ж їх треба перевіряти. Якщо 1 % розчин персульфату амонію у воді має рН < 2, то він непридатний. Катіон, який входить до складу персульфату, не відіграє ролі у процесі ініціації. Можна застосовувати, наприклад, персульфат калію. **Рибофлавін** – жовто-оранжеві кристали. Він малорозчинний у воді, але добре розчиняється у слаболужних водних буферних розчинах, розчини мають жовто-зелене забарвлення.

Рибофлавін також може бути ініціатором полімеризації. При освітлюванні його водного розчину видимим світлом (445 нм) він приєднує гідроген і відновлюється до лейкорибофлавіну. Останній знов легко окиснюється розчиненим у воді киснем, утворюючи пероксид гідрогену. За рахунок розкладу пероксиду продукуються вільні радикали (НО), які ініціюють ланцюгову реакцію полімеризації акриламід. До чистоти рибофлавіну ставлять не дуже високі вимоги оскільки він є дуже ефективним ініціатором і застосовується у набагато менших концентраціях (~0,005 %), ніж персульфат амонію.

Тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД) – $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ – безбарвна рідина із густиною 0,78 г/см³. Концентрація нерозведеного ТЕМЕД близько 6,7 моль/л.

Інструментальні методи аналізу

ТЕМЕД не є ініціатором полімеризації акриламід, але служить каталізатором цього процесу. Він ефективний лише у своїй неіонізованій формі, тому при полімеризації акриламід у кислому середовищі вміст ТЕМЕД слід значно збільшувати. У нейтральному або лужному середовищі ТЕМЕД можна додавати у кількості, еквімолярній у відношенні до персульфату.

Агароза для електрофорезу випускається звичайно у вигляді ліофілізованого порошку. Для приготування гелю обраної концентрації наважку порошку розчиняють у відповідному буфері та витримують на киплячій бані або у термостаті при 90–95°C близько 2 год. для утворення справжнього розчину полімеру. Іноді розчин агарози просто кип'ятять зі зворотним охолодженням. Різноманітні буфери, детергенти та інші добавки змішують з розчином агарози у гарячому вигляді (при 50–60°C). Вони не заважають її застиганню. Треба враховувати, що висока концентрація агентів, дисоціюючих водневих зв'язків, дещо покращує утворення гелю. Наприклад, гелі звичайної агарози із сечовиною 6 моль/л плавляться за 1,5 хв. при 75°C, але не застигають за 1 год. при 20°C. Контакт із киснем повітря не заважає застиганню агарози, тому гелі для горизонтального електрофорезу готують шляхом заливки дозованого об'єму розтопленої агарози на суворо горизонтальну скляну пластинку потрібного розміру. Гарячу суміш агарози з буфером слід короткочасно дистилювати під вакуумом. Вибір концентрації агарози, тобто пористості її гелю, диктується розмірами макромолекул, які фракціонують. Середній розмір пор 2 % гелю агарози приблизно відповідає діаметру сферично упакованої молекули біополімеру із масою 50 млн. Дальтон. Гелі з більш високим вмістом агарози застосовують для гел-фільтрації. При електрофорезі пори гелю повинні бути легко проникні для молекул біополімерів, щоб лише гальмувати їх міграцію в електричному полі за рахунок тертя, тому для електрофорезу застосовують гелі з концентрацією 0,4–2 %.

Розділ 6

Перед заливанням у форму або на пластинку розчин гарячої агарози охолоджують до 50°C і витримують не менше 1 год. у термостаті при даній температурі. Це необхідно для повного вирівнювання температури розчину по всьому об'єму. Це забезпечує одночасне застигання всього гелю та однорідність його структури.

Змішаний гель «Електрофорез» великих білків іноді буває доцільно проводити у великопористому ПААГ, який містить 1,5–2,5 % акриламід. Для надання міцності такому гелю його полімеризують сумісно з 0,5–0,6 % агарози. Застигаючи, чиста 0,5 % агароза дає дуже м'який гель, 2 % ПААГ не вдається навіть заполімеризувати, а їх комбінація утворює гелі з відмінними механічними характеристиками.

Капілярний електрофорез (Capillary electrophoresis) – метод розділення суміші заряджених чи нейтральних молекул, що базується на різниці в їх електрофоретичній рухливості і/чи розподіленні між розчином та зарядженими частинками (міцелами, колоїдними частинками, металокомплексами, молекулами поліелектроліту), які рухаються в електричному полі.

Ізоахофорез (Isotachopheresis) – електрофорез, в якому перед сумішшю, яку розділяють, розміщують лідируючий електроліт, а після неї – кінцевий електроліт, причому під впливом електричного поля суміші ділиться на межуючи одна з одною зони індивідуальних компонентів, які виходять у послідовності зниження їх електрофоретичної рухливості.

Ізоелектрофокусування (Isoelectric focusing) – метод розділення в електричному полі суміші амфотерних сполук, що базується на їх розподілі вздовж колонки з градієнтом рН у відповідності з їх ізоелектричними точками.

6.3.4. Методи забарвлення зразків після електрофоретичного розділення. Для фарбування електрофореграм сухі паперові стрічки або зволожені буферним розчином

Інструментальні методи аналізу

плівки кладуть в розгорнутому вигляді на дно плоских емальованих кювет і обережно, повільно доливають або розбризкують розчин барвника. В процесі обробки реагентами електрофореграмми не можна накладати один на одного і згортати.

Фарбувальні реагенти. Основним їхнім компонентом є індикатори (бромфенол синій, кислотний синьо-чорний, амідно чорний 10 та деякі інші), що представляють собою барвники, які характерно зв'язуються з білком. Нінгідрин – органічна сполука, що відносяться до класів кетонів, спиртів і конденсованих карбоциклів. Призматичні кристали білого або жовтого кольору, при нагріванні розчиняється у воді. Нінгідрин використовується як якісний і кількісний реактив при визначенні первинних амінів і амінокислот. 2% розчин Нінгідрин в етиловому спирті або ацетоні використовується в криміналістиці для виявлення слідів папілярного узору на пористих поверхнях, наприклад на папері. Амінокислоти відкривають кольоровою реакцією з нінгідрином. За наявності амінокислот або амінів виникає синя, фіолетова або червона пляма або кільце. Реакцію дають всі амінокислоти (крім проліну і оксипроліну).

Практичний блок

Розділення амінокислот методом електрофорезу у гелі з поліакриламідом

Мета: ознайомитися з прийомами розділення амінокислот у гелі з поліакриламідом, провести розділення трьох амінокислот.

Реактиви та обладнання: гель із поліакриламідом, буферний розчин рН 8,3; розчин оцтової кислоти з масовою часткою 7 % (промивна рідина та рідина для зберігання гелів), барвник амідно-чорний 10 В, амінокислоти: глутамінова кислота, гліцин, лізин, фенілаланін, аргінін, аспарагінова кислота, валін, гістидин. камера для горизонтального електрофорезу з блоком

Розділ 6

живлення «Ельф-4», хімічний стакан місткістю 10 мл, мірні колби місткістю 10 мл та 500 мл, терези аналітичні, шпатель, мікрошприц.

Хід роботи:

Приготування розчинів. Готується один з 3-х варіантів сумішей амінокислот, варіант визначається викладачем. У кожному варіанті є кисла, основна та нейтральні амінокислоти. Приклади варіантів: глутамінова кислота, гліцин, лізин; глутамінова кислота, фенілаланін, аргінін; аспарагінова кислота, валін, гістидин (рис. 6.3.1).

Стандартні розчини: окремі наважки амінокислот масою 0,020–0,025 г перенести у мірні колби місткістю 10 мл та довести до мітки водою. Суміш амінокислот: зважити по 0,020–0,025 г кожної з трьох амінокислот. Усі три наважки висипати в мірну колбу місткістю 10 мл, довести до мітки дистильованою водою. Барвник: амідочорний 10 В масою 5 г перенести в мірну колбу місткістю 500 мл, розчинити в 7 %-му водному розчині оцтової кислоти та довести до мітки.

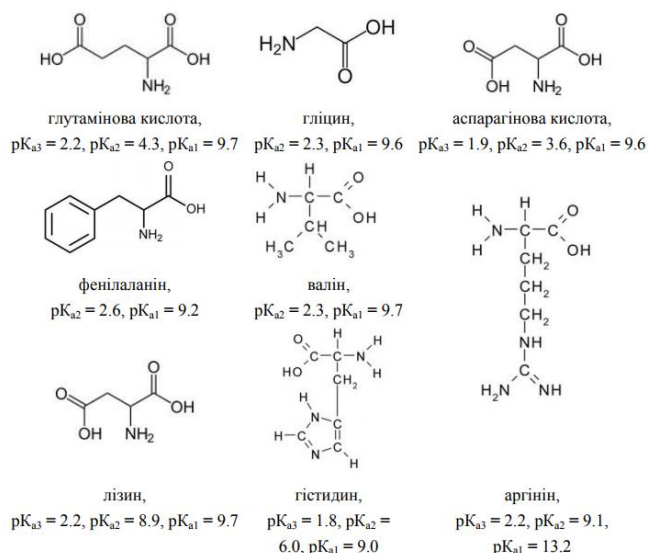


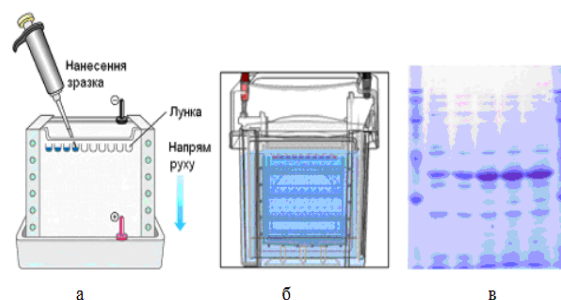
Рис. 6.3.1. Приклади амінокислот

Проведення розділення. У чисту і суху камеру для гель-електрофорезу поміщують підкладку з готовим гелем та вносять досліджувані зразки в лунки гелю. Для цього використовують мікрошприц (10 мкл). У лунки вносять зразки стандартів амінокислот (для ідентифікації компонентів суміші) та суміш для

Інструментальні методи аналізу
аналізу. Увага: після внесення кожного зразка необхідно ретельно промивати мікрошприц буферним розчином (рН 8.3). Потім камеру заповнюють буферним розчином так, щоб столик із гелем був занурений у буферний розчин. Закривають кришку камери. Підключають камеру до джерела струму, дотримуючись полярності, і включають джерело. Встановлюють параметри джерела: напруга 100 В, сила струму 400 А, час електрофорезу – 2–3 години. Увага: при цьому необхідно слідкувати за тим, щоб камера не перегрівалася.

Після завершення електрофорезу вимикають джерело струму і знімають кришку з камери.

Проявлення електрореграми. Обережно відокремлюють гель від столика та занурюють у розчин барвника і залишають для забарвлення на 1 год. Потім промивають забарвлений гель водою та переносять у промивну рідину – розчин оцтової кислоти з масовою часткою 7 %. Промивну рідину змінюють багаторазово впродовж кількох днів, поки не досягнуть обезбарвлення фону. Реєструють результати електрофорезу та роблять висновок щодо складу суміші амінокислот, що були відібрані для аналізу. Схема розділення білків методом гель-електрофорезу зображена на рис. 6.3.2.



а – нанесення зразків у гель; б – камера для електрофорезу; в – електрофореграма білків

Рис. 6.3.2. Схема розділення білків методом гель-електрофорезу

Питання до самоконтролю:

1. Процес розділення іонних форм та частинок дисперсної фази речовин, внаслідок різниці у їх міграції під впливом електричного поля. Під

Розділ 6

міграцією розуміють різну відстань чи швидкість переміщення:

- а) електрофорез
- б) хроматографія
- в) колориметрія
- г) флуориметрія

2. При проведенні електрофорезу в умовах, де рН буферного розчину вище, ніж ізоелектрична точка білка, останній:

- а) мігрує до катода
- б) мігрує до анода
- в) залишається на лінії старту
- г) утворює біполярний іон
- д) піддається гідролізу

3. Різновид зонного електрофорезу, в якому для визначення неорганічних іонів, що не поглинають світло в УФ-області спектра, застосовується посереднє фотометричне детектування:

- а) капілярний аналіз
- б) краплинний аналіз
- в) дотичний аналіз
- г) швидкісний аналіз

4. Швидкість електрофорезу розчинів білків залежить від:

- а) величини заряду макроіонів білка
- б) форми макроіонів білка
- в) в'язкості розчину
- г) рН розчину

5. Електрофорез, в якому суміш заряджених макромолекул ділиться в результаті різниці в їх заряді, розмірі та швидкості міграції через гель (або розчин нейтрального полімеру), який розміщений в електричному полі.

- а) гель-електрофорез
- б) капілярний електрофорез
- в) площинний (класичний) електрофорез
- г) високо-ефективний електрофорез

6. В ізоелектричній точці білок:

- а) має найменшу розчинність
- б) є катіоном

Інструментальні методи аналізу

- в) є амфійоном
- г) володіє найбільшим ступенем іонізації

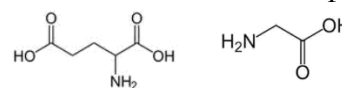
7. В якому середовищі пептид Ала-Гіс-Ліз-Фен буде рухатися до катода при електрофорезі:

- а) кислому
- б) нейтральною
- в) лужний
- г) усі відповіді вірні

8. Білий кристалічний порошок ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$). Добре очищений комерційний препарат містить концентрацію не більше 0,05 % кислоти:

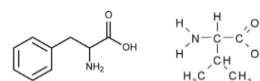
- а) акриламід
- б) рибофлавін
- в) каротин
- г) білок

9. Визначити амінокислоти за формулою



- а) глутамінова кислота, гліцин,
- б) лізин, аргінін
- в) фенілаланін, валін
- г) аспарагінова кислота, глутамінова кислота

10. Визначити амінокислоти за формулою



- а) фенілаланін, валін
- б) глутамінова кислота, гліцин
- в) лізин; гістидин
- г) аспарагінова кислота, глутамінова кислота

Тема 6.4. Хроматографія



6.4.1. Теоретичні основи методів хроматографії. Хроматографія – сукупність методів розділення речовин, які базуються на їх розподілі між двома фазами одна з яких, є

Розділ 6
нерухомою, а інша – рухома фаза, яка переміщується вздовж нерухомої, з характерним для такого процесу розподілу багатократним повторенням процесів – сорбції-десорбції.

Відомо значне число різновидів та варіантів хроматографічних методів розділення, що базуються на розподілі речовини між двома фазами, одна з яких переміщується відносно іншої.

Групу речовин, що мають подібні хімічні властивості, практично не можна розділити за допомогою хімічних реакцій, оскільки для цього не існує специфічних реагентів. Для розділення подібних речовин застосовують фізико-хімічні методи, які ґрунтуються на розчинності речовин у різних розчинниках, адсорбції, йонному обміні та ін.

Хроматографія була відкрита російським ботаніком М.С. Цветом у 1903 р. і використана ним для розділення суміші рослинних пігментів. М.С. Цвет застосовував адсорбційний метод хроматографії, який полягає у тому, що при пропусканні будь-якого розчину крізь високу та порівняно вузьку колонку, наповнену адсорбентом, речовини поглинаються залежно від ступеня їх адсорбованості у певній послідовності і в той же час зворотно.

Отриману хроматограму проявляють, пропускають крізь неї деяку кількість розчинника, як правило, того ж, у якому була розчинена досліджувана речовина. Для кожного компонента суміші у цій двофазній системі характерна рівновага, завдяки чому на стовпці адсорбенту утворюються горизонтальні зони певної висоти, які переміщуються вниз, вздовж колонки, по шляху руху проявляючої рідини зі швидкістю, яка залежить від здатності даної речовини поглинатися адсорбентом, що міститься у колонці. Оскільки здатність адсорбуватися у різних речовин різна, то зони більш-менш чітко відділяються одна від іншої.

Найважливішою перевагою хроматографічних методів над іншими є те, що при цьому речовини, як правило, хімічно не змінюються. Крім того, хроматографічний метод

Інструментальні методи аналізу застосовується для розділення газоподібних та рідких речовин.

Є багато видів хроматографії. Їх класифікація базується на різних критеріях.

За принципом фракціонування та фізико-хімічної взаємодії адсорбенту та речовин розрізняють:

- адсорбційну хроматографію на колонці чи в тонкому шарі;
- розподільну хроматографію на папері, у тонкому шарі;
- газорідинну;
- молекулярно-ситову;
- йоннообмінну хроматографію на папері та на колонці;
- гель-фільтрацію.

За природою та розташуванням нерухомої фази види хроматографії бувають:

- на папері;
- на колонці;
- на плівці;
- у тонкому шарі;
- у товстому шарі.

У залежності від агрегатного стану фаз хроматографічні методи поділяються на:

- рідинну хроматографію;
- газову хроматографію;
- газорідинну хроматографію.

За способом елюції хроматографія на колонці буває:

- проявна (елюентна);
- фронтальна;
- витискувальна.

За напрямком руху елюента розрізняють:

- висхідну хроматографію;
- низхідну хроматографію.

Будь-яка хроматографічна система базується на розподілі компонентів між двома фазами, з яких одна нерухома з великою поверхнею, а друга переміщується відносно першої. Як нерухома фаза використовується тверда речовина або рідина, що наноситься на твердий носій. Компоненти, що розділяються,

Розділ 6

разом з рухомою фазою (рідиною або газом) проходять крізь нерухому.

Речовини в суміші можуть розділятися за рахунок встановлення рівноважного розподілу між нерухомою рідкою та рухомою рідкою фазами (паперова хроматографія) або між нерухомою рідкою та рухомою газовою фазами (газорідинна хроматографія); адсорбційної рівноваги між нерухомою твердою та рухомою рідкою фазами (адсорбційна хроматографія); йонообмінної рівноваги між йонообмінною смолою (нерухома фаза) та електролітом – рухомою фазою (йонообмінна хроматографія); рівноваги між рідкими фазами на внутрішній та зовнішній поверхні пористої структури гелю (молекулярно-ситова хроматографія).

6.4.2. Газова хроматографія. Газовою хроматографією

називається хроматографічний процес, у якому рухомою фазою є газ або пара. Розрізняють газоадсорбційну хроматографію, газорідинну хроматографію, а також проміжні методи.

У газоадсорбційній хроматографії нерухомою фазою є твердий адсорбент, а рухомою – газ.

До проміжних методів відноситься хроматографія на модифікованому сорбенті, яка базується на тому, що нерухомою фазою є твердий адсорбент, модифікований невеликою кількістю рідини. У даному разі відіграє роль як адсорбція на поверхні газу – тверде тіло і в певній мірі на поверхні рідини, так і розчинність в рідині. Існують і інші проміжні варіанти.

У порівнянні з іншими видами хроматографії, газова хроматографія відрізняється такими якостями:

- можливістю ідентифікації і кількісного визначення індивідуальних компонентів складних сумішей;
- можливістю вивчення різних властивостей речовин та фізико-хімічних взаємодій в газах, рідинах і на поверхні твердих тіл;

Інструментальні методи аналізу

- високою чіткістю розділення речовин та малою тривалістю процесу, що обумовлено низькою в'язкістю рухомої фази;
- можливістю дослідження мікропроб і автоматичного запису отриманих результатів із застосуванням високочутливих приладів для визначення властивостей елюата;
- можливістю аналізу широкого кола об'єктів – від летких газів до високомолекулярних органічних сполук і деяких металів;
- можливістю препаративного виділення чистих речовин.

З визначення варіантів газової хроматографії зрозуміло, що для проведення процесу необхідно використовувати газ-носії (газова фаза), нерухому рідину (рідка фаза) та твердий носій або адсорбент (тверда фаза).

Газ-носії є рухомою фазою, він служить для елюювання компонентів проби через колонку. Зазвичай, як газ-носії використовують гелій, аргон, водень, карбон (IV) оксид, азот. У деяких випадках рекомендується використовувати водяну пару, а також пари органічних речовин.

Нерухомою фазою в газорідинній хроматографії є практично нелетка при температурі колонки рідина, нанесена на твердий носій, яка розчиняє компоненти суміші, що розділяються. Маса в грамах нерухомої рідини, що припадає на 100 г твердого носія, називається ступенем просочення твердого носія. Твердим носієм, зазвичай, є практично інертна тверда речовина – подрібнена цегла, відповідно оброблена глина та інші тверді речовини на які наносять нерухому рідину. В капілярних колонках як твердий носій виступають внутрішні стінки капілярів. У якості адсорбента – пористої твердої речовини – в газовій хроматографії, зазвичай, використовують алюміній оксид, силікагель, синтетичні цеоліти та активоване вугілля, а також пористі синтетичні полімери. Маса адсорбента або просоченого нерухомою рідиною твердого носія, що припадає на 1см^3 об'єму насадочної колонки, називається

Розділ 6
щільністю набивки. Прилад для газохроматографічного процесу називається газовим хроматографом.

Майже любий прилад для проведення газохроматографічного розділення та визначення компонентів, тобто лабораторний газовий хроматограф складається з наступних базових вузлів (рис. 6.4.1):

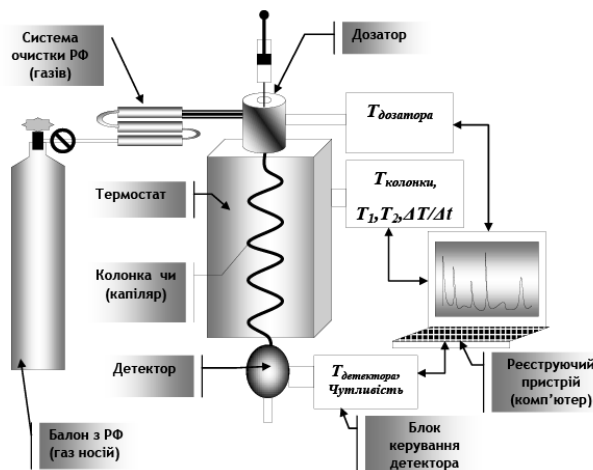


Рис. 6.4.1. Схема газового хроматографа

Принципи вибору сорбенту та нерухомої фази в ГХ

Нерухома фаза повинна:

1. Мати необхідну для даного розділення селективність (оцінюється полярністю за Рошнайдером або відносним утриманням за Мак-Рейнольдсом чи знаходиться із літературних даних).

2. Забезпечувати отримання симетричних піків (лінійність ізотерм сорбції сполук, відсутність залишкової активності носія, тощо).

3. Дозволяти проводити хроматографічний процес, в умовах високої швидкості та роздільної здатності (обмеження за температурою).

4. Бути доступною і відносно дешевою.

5. Розміри зерна та фізичні властивості носія чи адсорбенту повинні забезпечувати можливість приготування колонок з максимальною ефективністю.

6. Для надійної ідентифікації сполук слід проводити хроматографічне розділення на двох фазах різної полярності (неполярна-полярна).

Інструментальні методи аналізу Правила вибору (оптимізації) режимів розділення у газовій хроматографії

1. При розділенні мало чисельних сумішей компонентів, температури кипіння яких не значно відрізняються – використовують ізотермічний режим (при температурах в області кипіння аналітів).

2. Для розділення складних сумішей, та сумішей, компоненти якої значно відрізняються за температурою кипіння – використовують режим програмування температури.

3. Для розділення речовин з близькими температурами кипіння, але різною хімічною природою, слід використовувати селективні нерухомі фази, які характеризуються значною різницею значень констант Мак-Рейнольдса для відповідних класів сполук.

4. Чим менша ефективність колонки тим більші проблеми виникають при розділенні близьких за властивостями сполук. Низьку селективність нерухомої фази часто можна компенсувати використанням колонок вищої ефективності.

5. В ряді випадків, проблеми, пов'язані з перекриванням (накладанням) піків, вдається усунути шляхом використання високо-селективних детекторів (таких, які реєструють тільки сполуки, котрі цікавлять аналітика).

6. Капілярні колонки, як правило, характеризуються вищою ефективністю в порівнянні з аналітичними, проте їх використання можливе тільки за умови використання високочутливих детекторів.

6.4.3. Високоєфективна рідинна хроматографія та її методичні основи.

Рідинна хроматографія (РХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухомою фазою є рідина. В рідинній хроматографії нерухомою фазою є або тверда фаза (рідинно-твердофазна хроматографія РТХ), або рідина (рідинно-рідинна хроматографія РРХ), або гель (рідинно-гелева хроматографія).

Розділ 6

Рідинна хроматографія, як хроматографічний метод розділення сумішей, що використовує рідинну рухому фазу, історично виникла першою і дотепер є найбільш універсальним та розповсюдженим видом хроматографії.

У рідинній хроматографії для розділення використовують колонку та техніку площинної хроматографії (паперової і тонко-шарової хроматографії). У класичному колонковому варіанті рухома фаза проходить через колонку з нерухомою фазою тільки під дією сили тяжіння і процес розділення речовин займає багато часу. Класичний колонковий варіант до цих пір застосовують у лабораторній практиці для препаративних цілей і демонстраційних експериментів, оскільки він не потребує дорогого обладнання.

У високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) завдяки використанню сорбентів з малим розміром зерен 10–30 мкм, нагнітальних насосів і чутливих детекторів процес проходить швидко та ефективно. Високоефективна рідинна хроматографія отримала дуже широке застосування для розділення та виявлення молекул (адсорбційна та розподільна хроматографія), для розділення та виявлення іонів у іонній хроматографії, для розділення макромолекул (ексклюзійна хроматографія).

Сорбція компонентів з рухомої фази в газовій та в рідинній хроматографії відбувається по-різному. На відміну від газу, який виконує лише транспортну функцію і не сорбується нерухомою фазою, рідинна рухома фаза є активним елюентом, молекули який може сорбуватися на поверхні. Під час проходження через колонку молекули компонентів, що аналізуються, повинні витіснити елюент з поверхні сорбенту, що призводить до зменшення енергії взаємодії молекул аналізованих речовин з поверхнею сорбенту. Тому параметри їх утримування в рідинній хроматографії менші, ніж у газовій хроматографії. Діапазон лінійності ізотерми адсорбції в рідинній хроматографії більший.

Інструментальні методи аналізу

Методами рідинної хроматографії можна аналізувати відносно великі проби незалежно від леткості та термічної стабільності. До недоліків рідинної хроматографії можна віднести обмежене коло детектуючих систем.

Збільшити швидкість розділення і підвищити ефективність методу колонкової рідинної хроматографії можна проводячи хроматографічне розділення в довгих вузьких колонках (діаметр 2–6 мм, довжина 0,5–1,0 м) під високим тиском (від 2 до 40 МПа), застосовуючи неперервне детектування. Цей метод, який отримав назву рідинна хроматографія високого тиску (швидкісна рідинна хроматографія або високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)), почав розвиватись на початку 70-х років. Сучасні рідинні хроматографи забезпечують достатньо високу швидкість аналізу, високу ефективність колонки, можливість розділяти будь-які речовини, крім газів. Нижня межа виявлення речовини складає 10^{-9} – 10^{-10} г.

6.4.4. Площинна хроматографія. *Площинна хроматографія – хроматографічне розділення, яке проводять на спеціальному папері (паперова хроматографія) або в тонкому шарі сорбенту, що наноситься на якусь основу, наприклад, на скляну або алюмінієву пластинку (тонкошарова хроматографія).*

Суть методу. Тонкошарова хроматографія (ТШХ) є рідинно-твердофазною адсорбційною хроматографією, в якій сорбент знаходиться у вигляді тонкого шару на пластинці, тобто тонкошарова хроматографія є модифікованою формою рідинно-твердофазної хроматографії. Метод ТШХ розроблений ряданськими вченими М. А. Ізмайловим і М. С. Шрайбер у 1938 р. в Українському інституті експериментальної фармації м. Харків. Для вирішення ряду задач тонкошарове розділення проводять, спираючись не тільки на адсорбцію, а й на розподіл (нормально-фазовий або обернено-фазовий), іонний обмін, ексклюзію. Хроматографічне розділення в

Розділ 6

площинних варіантах хроматографії обумовлено, як і в колонці, перенесенням компонентів рухомої фази вздовж шару нерухомої фази з різними швидкостями у відповідності з коефіцієнтами розподілу компонентів, які розділяють.

6.4.5. Тонкошарова хроматографія (ТШХ). У методі тонкошарової хроматографії нерухома тверда фаза наноситься тонким шаром (100–300 мкм) на скляну, полімерну пластинку-підкладку або металеву пластинку із фольги. У ТШХ розрізняють методи висхідної, низхідної і горизонтальної хроматографії, що залежать від напрямку розчинника, який надходить на пластинку. У методі висхідної хроматографії розчинник поступає на пластинку вгору під дією капілярних сил. У методі низхідної хроматографії розчинник поступає на пластинку зверху вниз під дією гравітаційних сил. Горизонтальний проточний метод ТШХ оснований на безперервному надходженні свіжого розчинника на пластинку. Після проходження всього шару сорбенту розчинник стікає з пластинки або випаровується. Цей метод застосовують для кращого розділення речовин з близькими значеннями R_f .

Застосування методу ТШХ. Метод ТШХ широко використовують для якісного та кількісного експресного контролю промислових процесів органічного синтезу, при наукових дослідженнях у хімії природних сполук, фармацевтичному та хіміко-токсикологічному аналізі, клінічній діагностиці тощо. Виробництво пластинок з міцним і однорідним сорбуючим покриттям дозволило отримувати відтворювані результати розділення. Термічна стабільність сполук, які аналізують, також як і в рідинній хроматографії, не відіграє великої ролі, оскільки аналізи проводять, як правило, при кімнатній температурі. В даний час ТШХ інтенсивно розвивається. Істотно прискорюється процес розділення в радіальній ТШХ, де розчинник з

Інструментальні методи аналізу регульованою швидкістю (аналогічно колонковій рідинній хроматографії) подається до центру пластинки, змушуючи зони переміщатися від центру до периферії. Створений експресний ультраточливий варіант ТШХ, названий мікротонкошаровою хроматографією. Його основні переваги – мінімальне розмивання плям, зменшення часу аналізу, максимальна чутливість – обумовлені використанням сорбентів з меншими розмірами зерен (2–5 мкм), зниженням пробігу елюента до 5 см, використанням пластинок з товщиною шару 150–200 мкм. Цим методом можна визначати слідові кількості токсичних елементів, тому він з успіхом використовується при аналізі об'єктів навколишнього середовища. Створений ТШХ-аналізатор, що дозволяє після розділення автоматично отримувати компоненти прямо із шару сорбенту для подальшого визначення. Цей прилад випускається промисловістю для масових аналізів.

Носієм нерухомої фази в паперовій хроматографії є смужки фільтрувального паперу, який не містить мінеральних речовин (хроматографічний папір). Розділення речовин відбувається внаслідок розподілу їх між водною фазою, що міститься в целюлозі, і рухомою фазою. У нерухомій фазі речовина може утримуватися не тільки через розчинення в адсорбованій папером воді, але і адсорбуватися папером. Це означає, що хроматографічне розділення на папері може відбуватися не тільки за розподільним механізмом, але і за адсорбційним. Папір можна також імпрегнувати іонообмінними смолами, тоді буде переважати механізм іонного обміну. Хроматографія на папері за механізмом розділення може бути також осадовою тощо.

6.4.6. Афінна (споріднена) хроматографія. *Афінна хроматографія* – хроматографічний метод розділення біохімічних сполук, заснований на специфічній біохімічній взаємодії

Розділ 6
між молекулами, наприклад, взаємодії між антигеном і антитілом, ферментом і субстратом або рецептором і лігандом. Адсорбційна хроматографія комбінує можливості гелевої хроматографії фракціонувати молекули за розміром із здатністю створення стаціонарної фази, що дозволяє обернене зв'язування молекул.

Назва “афінна хроматографія” була запропонована для відносно нового і ефективного хроматографічного методу, в якому спорідненість відіграє особливо важливу роль. Описуваний метод базується на специфічній взаємодії, характерній для деяких біологічних та біохімічних процесів. Ця взаємодія відбувається між парами речовин, які реагують в розчині з високою вибірковістю. Так, наприклад, антиген та антитіло специфічно зв'язуються між собою, фермент реагує тільки зі своїм субстратом або з інгібітором, транспортна рибонуклеїнова кислота “вибирає” тільки ту амінокислоту, яку вона може перенести всередину рибосоми, гормон реагує відповідним рецептором. Якщо одна із цих сполук, яка відноситься до будь-якої з перерахованих пар, утримується ковалентним зв'язком на відповідному носії і при цьому зберігає свої властивості (специфічні характеристики), то подібний десолубілізований препарат можна використовувати для вибіркового зв'язування із розчину другої сполуки пари. Якщо перемішати десолубілізований препарат (у вигляді частинок з розчином суміші декількох речовин, то при цьому препарат зв'яже тільки один певний компонент. Отриманий препарат звільняють від супутніх речовин фільтруванням або центрифугуванням. промивають і відповідним чином виділяють необхідну сполуку.

Якщо ввести десолубілізований препарат в хроматографічну колонку і повільно пропускати через неї розчин, то потрібний компонент зв'яжеться і буде утримуватись у колонці. Після промивання колонки відповідною десорбуючою рідиною можна

Інструментальні методи аналізу
вибірково елюювати цей компонент. За своїм апаратурним оформленням і за методикою весь процес подібний до інших методів колонкової хроматографії.

Практичний блок

Розділення амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері

Мета: Оволодіти методами розподільної хроматографії, як одним з методів якісного аналізу на прикладі розділення суміші амінокислот паперовою хроматографією.

Завдання: 1. Засвоїти методику визначення якісного складу суміші речовин за допомогою паперової хроматографії.

2. Провести розділення суміші амінокислот хроматографією на папері.

3. Розрахувати R_f кожної плями і визначити склад контрольної суміші амінокислот.

Обладнання та реактиви: прилад для виконання висхідних хроматограм, хроматографічний папір, набір амінокислот, суміш амінокислот, олівець, лінійка, скляні капіляри, суміші розчинників: а) н-бутанол-оцтова кислота – вода (4:1:5); б) ацетон- вода (3:2); в) н-бутанол- бензиловий спирт (1:1), розчин нінгідрину в ацетоні.

Хід роботи: На початку заняття одержати у викладача контрольну задачу – розчин суміші невідомих амінокислот, а у лаборанта – аркуш хроматографічного паперу, відрізаного по розміру циліндра і розкреслений, як вказано на рис. 6.4.2.

За допомогою лінійки провести на відстані 2 см від нижнього краю горизонтальну пряму АБ (лінія старту). Намалювати кільця діаметром 3 мм на відстані 2 см один від одного та проставити над ними порядкові номери. Від лінії старту на відстані 10 см провести пряму А'Б' (лінія фінішу).

Розчини амінокислот на папір нанести на окремому столі. Папір покласти на

Розділ 6

попередньо ретельно вимите скло. Під нижній край паперу підкласти скляну пластинку чи зошит так, щоб та частина паперу, де намальовані кільця, знаходилася в повітрі, не торкалась поверхні скла. Капілярами, що спеціально виготовлені для кожного розчину, на папір в кільця послідовно нанести краплі розчинів сумішей, що досліджуються. Крапля, яку наносять не повинна поширюватися за межі намальованого кільця.

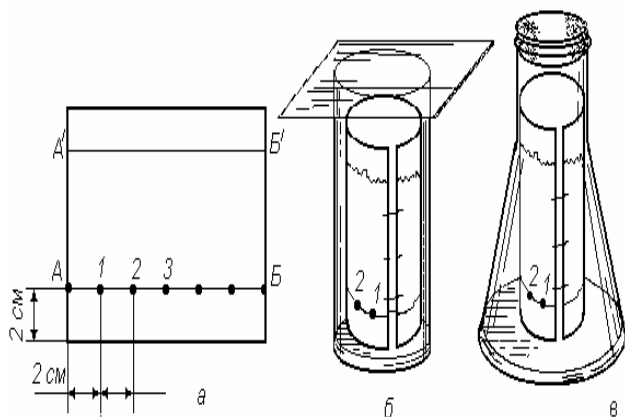


Рис. 6.4.2. Прилади для висхідної паперової хроматографії

Розчин на кожне кільце нанести 5-6 разів після висихання попередньої краплини.

Після висихання нанесених крапель ретельно вимити руки з милом, звернути папір у циліндр та зшити аркуш через край так, щоб одержати більш чи менш правильний циліндр. Особливу увагу звернути на те, щоб при зшиванні А та Б співпали. На дно скляного циліндра (обережно, не змочити стінки) налити суміш н-бутанолу, оцтової кислоти, води (4:1:5). Висота шару розчинника не повинна бути вище 1 см від дна циліндра.

Паперовий циліндр обережно вставити вертикально в скляний циліндр так, щоб він не торкався стінок і щоб нанесені краплі знаходились на нижньому кінці паперового циліндра.

Скляний циліндр щільно зачинити кришкою з гумовою прокладкою і залишити стояти до тих пір, доки розчинник підніметься до лінії фінішу. Тоді обережно вийняти паперовий циліндр, розрізати шов, розпрямити

Інструментальні методи аналізу

папір та висушити його під витяжкою чи в сушильній шафі (70-80°C).

Коли розчинник повністю випариться, хроматограму проявити. Як проявник для α -амінокислот використовувати розчин нінгідрину ($\omega(\text{нінгідрину})=0,5\%$) в ацетоні. Цим розчином оприснути хроматограму декілька разів з пульверизатора так, щоб папір став злегка вологий та на ньому не утворювалися розмиваючі струмені розчину. Потім висушити папір на повітрі та прогріти у сушильній шафі при 110°C до появи лілових плям. Значно краще висушити хроматограму поступово у темряві. Плями, що проявилися, легко обвести олівцем та при бажанні закріпити розчином необхідного сульфату, після чого ще раз просушити хроматограму на повітрі.

Якісний склад контрольної суміші амінокислот визначити по значенню R_f кожної плями, порівнюючи з R_f , що обчислені по хроматограмі контролів. Значення R_f амінокислот у цій системі: гліцин 0,13; аланін 0,18; валін 0,36; фенілаланін 0,46.

У цьому варіанті задачу можливо виконати і для інших амінокислот, а також для простіших вуглеводів. При хроматографуванні вуглеводів їх проявляють амоніачним розчином аргентум нітрата (чорна пляма).

Питання до самоконтролю:

1. У хроматографії очищають газ від ненасичених вуглеводів, пропускаючи його послідовно через поглинальні склянки, заповнені:

- Бромною водою, потім гідроксидом заліза
- Лугом, потім бромною водою
- Бромною водою, потім лугом
- Бромною водою, потім розчином бікарбонату натрію

2. Селективність хроматографічної колонки залежить від природи:

- рухомої фази
- нерухомої фази
- типу капілярних колонок

Розділ 6

г) газу-носія

3. Яка основна відмінність газової хроматографії від інших видів хроматографії?

- а) в якості рухливої фази використовується газ
- б) використання програмування температури
- в) використання капілярів
- г) у використовуваних колонках

4. Які з речовин легше піддаються газохроматографічному аналізу?

- а) металоорганічні сполуки
- б) органічні сполуки
- в) метали
- г) неорганічні сполуки металів

5. Стабільність параметрів утримування контролюють хроматографуванням:

- а) стандартного розчину
- б) стандартного розчину на початку і в кінці вимірювань
- в) стандартного розчину на початку вимірювань і через кожні 25 хроматограми
- г) повторним досліджуваного розчину

6. В якому порядку рекомендують проводити хроматографування для одержання більш точних результатів?

- а) спочатку стандартні розчини, потім досліджувані
- б) спочатку досліджувані розчини, потім стандартні
- в) спочатку досліджувані, потім стандартні і знову досліджувані розчини
- г) спочатку стандартні, потім досліджувані, потім знову стандартні розчини

7. Який із елементів газохроматографічної системи потребує термостатування?

- а) колонки
- б) прилади контролю і регулювання тиску газу і швидкості газового потоку
- в) джерело газу-носія
- а) колонки; блок вводу проби і система детектування

Інструментальні методи аналізу

8. Для аналізу малої проби використовують хроматографічні колонки:

- а) мікронасадочні
- б) насадочні спіральні
- в) насадочні прямі
- г) капілярні

9. Найбільша похибка в газохроматографічних вимірах допускається аналітиком при:

- а) розрахунках
- б) дозуванні проби
- в) порушенні герметичності приладів
- г) вимірюванні параметрів піку

10. Яка основна перевага газової хроматографії?

- а) висока чутливість
- б) висока розподільча здатність
- в) швидкість аналізу
- г) можливість автоматизації

Тема 6.5. Спектроскопія



6.5.1. Основні закони поглинання світла. Закон Ламберта-Бера. Речовини, які поглинають випромінювання у видимій частині спектру (довжина хвилі 400-760 нм), характеризуються власним забарвленням. **Фотометричні методи аналізу** базуються на вимірюванні інтенсивності світлового потоку, який проходить через речовину або її розчин. У більшості випадків у залежності від довжини хвилі та ширини смуги виділяють такі фотометричні методи:

- **фотоелектроколориметрія** – метод, заснований на вимірюванні інтенсивності поліхроматичного світла у видимій області спектра (з використанням світлофільтрів);

- **спектрофотометрія** – метод з використанням монохроматичного світла як у

Розділ 6
видимій, так і в ультрафіолетовій та інфрачервоній області спектра.

Фотоелектроколориметрія і спектروفотометрія – об'єктивні методи аналізу, оцінка інтенсивності світлових потоків проводиться за допомогою фотоелементів.

Спектроскопічні методи аналізу засновані на взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною, що супроводжується різноманітними явищами та ефектами, серед яких найбільш поширені поглинання та випускання світла.

Спектроскопію частіше всього поділяють на атомну та молекулярну.

Атомно-емісійна спектроскопія використовує здатність атомів у збудженому стані випускати світло. Джерелами збудження можуть бути: полум'я, електрична дуга, або іскра. Молекулярна абсорбційна спектроскопія використовує здатність молекул поглинати світло.

Методи аналізу, що засновані на вимірюванні поглинання випромінювання молекулярним середовищем у видимій та ультрафіолетовій – дільниці спектра традиційно називають спектروفотометричними.

Єдиною теоретичною основою усіх різновидів спектروفотометрії являється **закон Бугера-Ламберта-Бера**, математичний вираз якого:

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon \times l \times c,$$

де A – оптична густина (світлопоглинання); I_0 – інтенсивність вихідного (падаючого) світла, Вт'с-1'см-1; I_t – інтенсивність світлового потоку, яке пройшло через поглинаюче середовище, Вт'с-1'см-1; ε – молярний коефіцієнт світлопоглинання; l – товщина поглинаючого шару, см; c – молярна концентрація розчиненої поглинаючої речовини.

Згідно закону Бугера-Ламберта-Бера, оптична густина розчину прямопропорційна концентрації поглинаючої речовини, товщині

Інструментальні методи аналізу

шару і молярному коефіцієнту світлопоглинання. Найбільш правильні розрахунки одержують при значенні оптичної густини близько 0,4. Якщо оптична густина більше ніж 0,8, то необхідно використовувати кювети з меншою товщиною поглинаючого шару, а при оптичній густині 0,1 і менше, необхідно використовувати кювети з більшою товщиною.

Основними типовими завдання, які вирішуються фотометричними методами є наступні:

- визначення, яке базується на власному забарвленні речовин;

- визначення, які базуються на утворенні інтенсивно забарвлених продуктів при додаванні відповідного реактиву до безбарвного розчину визначуваного компоненту або при хімічному перетворенні (окиснення, відновлення) визначуваної речовини;

- визначення, які базуються на вимірюванні інтенсивності забарвлення надлишку забарвленого реактиву.

6.5.2. Спектروفотометрія. Власне спектروفотометрія – це вимірювання поглинання (і пропускання) прозорих розчинів в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній ділянках спектра (220–1100 нм).

Прилади, принцип роботи яких ґрунтується на вимірюванні світлопоглинання речовин та називають **абсорбціометрами**. До них належать фотоелектроколориметри (ФЕК) і спектروفотометри (СФ). Фотоелектроколориметри дають змогу проводити вимірювання у видимій частині спектра, тоді як спектروفотометри – у широкому діапазоні хвиль, від ультрафіолетового до інфрачервоного (210 – 1100 нм), і досліджувати забарвлені та безбарвні розчини у вузькій частині спектра, у зоні максимального поглинання монохроматичного потоку світла.

Розділ 6

Спектрофотометрія у видимій і ультрафіолетовій областях дозволяє оцінювати ступінь чистоти речовини, ідентифікувати по спектру різні сполуки, визначити константи дисоціації кислот і основ, досліджувати процеси комплексоутворення.

Інфрачервоні спектри дають характеристику речовин. Наявність в інфрачервоних- спектрах тих чи інших смуг поглинання дозволяє розшифровувати структуру речовини. Ультрафіолетове спектрофотометричне вимірювання проводять в розчинах. Як розчинники використовують очищену воду, кислоти, луги, спирти (метанол, етанол), деякі інші органічні розчинники. Розчинник не повинен поглинати в тій чи іншій області спектра, що і аналізуєма речовина. Характер спектра (структура і положення смуг поглинання) може змінюватися в різних розчинниках, а також при зміні рН середовища.

Методом ультрафіолетової спектрофотометрії використовують для визначення ідентичності, чистоти і кількісного вмісту лікарських препаратів.

Спектрофотометрія широко застосовується при вивченні будови і складу різних сполук (комплексів, барвників, аналітичних реагентів тощо), для якісного і кількісного аналізу речовин (визначення слідів металів у різних елементах, сплавах, технічних об'єктах).

Сукупність спектральних ліній, що належать даній частці, становить її спектр (від латинського *spectrum* – подання). Він може бути безперервним і дискретним. Якщо спектр обумовлений переходами, при яких $E_i > E_j$, це спектр випускнення. Спектри, що випускаються термічно збудженими частками, називають *емісійними спектрами*, а нетермічно збудженими – *спектрами люмінесценції*. Якщо спектр обумовлений переходами, при яких $E_i < E_j$, то це спектр поглинання (абсорбційний спектр).

Спектри атомів в ультрафіолеті, видимої й ближньої інфрачервоній областях виникають при переходах зовнішніх

Інструментальні методи аналізу (валентних) електронів з одних енергетичних станів в інші.

Відмінною рисою атомних спектрів є їхня лінійна структура. Спектри атомів складаються з великого числа дискретних спектральних ліній, поєднаних в окремі спектральні серії. Положення ліній у межах кожної серії підпорядковується певним закономірностям, характерним для атомів кожного елемента. Досліджуючи атомні спектри зразка, можна встановити наявність у ньому тих або інших хімічних елементів.

Спектри молекул значно складніші спектрів атомів, оскільки обумовлені не тільки електронними переходами, але й коливаннями атомних ядер у молекулі, а також рухом самої молекули. Приблизно енергію молекули (E) можна представити у вигляді суми електронної ($E_{ел.}$), коливальної ($E_{кол.}$) і обертальної ($E_{вр.}$) енергії: $E = E_{ел.} + E_{кол.} + E_{вр.}$

За величинами ці види енергії істотно розрізняються: $E_{ел.} \gg E_{кол.} \gg E_{вр.}$

При зміні обертальної енергії молекули виникає лінійчатий, обертальний спектр, який можна спостерігати у інфрачервоній області спектра ($0,03-30 \text{ см}^{-1}$). Зміна коливальної енергії молекули звичайно супроводжується зміною її обертальної енергії. У результаті замість чисто коливальних переходів у молекулі спостерігаються коливально-обертальні переходи. Відповідний спектр складається з великого числа близько розташованих один до одного ліній, які групуються в окремі смуги, які спостерігаються в середній і далекій інфрачервоній області ($30-4 \cdot 10^3 \text{ см}^{-1}$).

При зміні енергії електронів у молекулі одночасно змінюються коливальна й обертальна енергії й замість електронних спостерігаються електронно-коливально-обертальні переходи. Оскільки їхнє число дуже велике, то електронно-коливально-обертальний спектр приймає вид широких смуг, що перекриваються, в ультрафіолеті, видимої й ближньої інфрачервоній області.

Розділ 6

Молекулярні спектри специфічні й широко застосовуються для ідентифікації речовин і дослідження їхньої структури.

Контур спектральної смуги може бути гладким, колоподібним або виявляти тонку структуру. Звичайно, смугу характеризують трьома параметрами: частотою ν_{\max} (довжиною хвилі λ_{\max}); значенням максимальної інтенсивності I_{\max} ; шириною $\Delta\nu$ ($\Delta\lambda$). Ширина смуг у колиально-обертальному спектрі може досягати декількох десятків зворотних сантиметрів, а в електронному спектрі – декількох тисяч зворотних сантиметрів.

6.5.3. Якісний та кількісний спектрофотометричний аналіз. Спектри використовують як для якісного (ідентифікація речовин), так і для кількісного (визначення складу речовини) аналізу.

Якісний аналіз. Найважливішими характеристиками будь-якої речовини є положення максимумів ліній (смуг) в електромагнітному спектрі (енергії, частоти, довжини хвиль). Вони визначаються тільки природою речовини й не залежать від її концентрації. Тому для ідентифікації речовин використовують спектральну вісь абсцис.

Найважливішим показником «якості» спектра при цьому є ширина ліній (смуг): при значному розширенні лінії різних компонентів можуть зливатися (перекриватися), що затрудняють ідентифікацію.

Кількісний аналіз. Для кількісного аналізу використовують інтенсивність ліній, тобто спектральну вісь ординат. Інтенсивність спектральної лінії є функцією концентрації речовини. Як і для якісного аналізу важлива ширина ліній, тому що при накладенні ліній компонентів виникає систематична погрішність визначення.

6.5.4. Інфрачервона спектрофотометрія. У результаті поглинання світла в інфрачервоній області (від 103 до 105 нм) відбуваються

Інструментальні методи аналізу

переходи між коливальними рівнями основного стану молекули. Коливальні рівні і інфрачервоні спектри виникають за рахунок характеристичних рухів (розтягування зв'язків, зміни величини кутів між зв'язками і більш складних типів рухів) різних функціональних груп (наприклад, карбонільної, амідної та ін.). Цінність спектрального аналізу в інфрачервоній області обумовлена тим, що вид коливань кожної групи дуже чутливий до змін хімічної структури, конформації і оточення, і в цьому сенсі інфрачервона спектроскопія не відрізняється від спектроскопії у видимому й ультрафіолетовому світлі. Цей метод може застосовуватися для вивчення хімічних груп, які не можна досліджувати з допомогою абсорбційної спектроскопії в ультрафіолетовому і видимому світлі.

Практичний блок

Фотоколориметричне визначення вмісту вітаміну С у природних об'єкта

Мета : Дослідити вміст вітаміну С у природних об'єктах і прослідкувати залежність вмісту аскорбінової кислоти в залежності від умов вирощування та зберігання.

Завдання : 1. Побудувати калібрувальний графік.

2. Провести екстрагування аскорбінової кислоти з природного об'єкту.

3. Фотоколориметрично визначити концентрацію вітаміну С в екстракті.

4. Розрахувати вміст вітаміну С в різних біологічних об'єктах.

Обладнання та реактиви

Фотоколориметр КФК-2, кювети $l = 10$ мм, мірні колби об'ємом 25 см^3 та 100 см^3 , ступка з пестиком, лійка, розчин реактиву Фоліна, стандартний розчин аскорбінової кислоти ($C(1/2 \text{ АК}) = 0,00125 \text{ моль/дм}^3$), дистильована вода.

Хід роботи: 1. Побудова калібрувального графіку

Розділ 6

У колби об'ємом 25 см³ відібрати 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4 см³ стандартного розчину аскорбінової кислоти (C(1/2AK)=0,00125 моль/дм³), додати по 12,5 см³ розчину реактива Фоліна і довести до мітки дистильованою водою. Колби нагрівати на водяній бані протягом 10 хвилин. Розчини охолодити і виміряти оптичну густину при довжині хвилі 670 нм, чутливість 2.

Розрахувати вміст аскорбінової кислоти за формулою:

$$C(AK) = \frac{V_{ал.} \cdot C_{ст.} \left(\frac{1}{2} AK\right) \cdot M\left(\frac{1}{2} AK\right)}{V_{м.к.}}, \text{ де}$$

$C_{ст.} \left(\frac{1}{2} AK\right)$ – молярна концентрація еквіваленту стандартного розчину аскорбінової кислоти, моль/дм³;

$V_{ал.}$ – об'єм розчину аскорбінової кислоти, взятий для побудови калібрувального графіка, см³;

$V_{м.к.}$ – об'єм мірної колби, 25 см³;

$M \left(\frac{1}{2} AK\right)$ – молярна маса еквіваленту аскорбінової кислоти, г/моль.

II. Приготування екстракту з рослинного об'єкту

Взяти наважку 10 г рослинного об'єкту і ретельно розтерти з кварцовим піском у ступці, додаючи 50 см³ розчину HCl (ω (HCl) = 2%). Суміш кількісно перенести у колбу об'ємом 100 см³ і довести до риски дистильованою водою, добре перемішати і відфільтрувати через складчастий фільтр. Отриманий екстракт повинен бути прозорим.

Для побудови калібрувального графіка результати занести в таблицю:

$V_{ал.}, \text{ см}^3$			
$C(AK), \text{ мг/см}^3$			
D			

III. Визначення вмісту вітаміну С в рослинному об'єкті

Відібрати аліквоту екстракту об'ємом 10 см³, перенести у мірну колбу об'ємом 25 см³, додати 12,5 см³ реактива Фоліна і довести до мітки дистильованою водою. Колбу нагрівати на водяній бані протягом 10 хвилин. Розчин охолодити і виміряти оптичну густину при $\lambda =$

Інструментальні методи аналізу

670 нм, чутливість 2. Концентрацію вітаміну С визначити за калібрувальним графіком. Вміст вітаміну С в об'єкті розрахувати за формулою:

$$C(\text{віт.С}) = \frac{C_k(\text{віт.С}) \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{m \cdot 1000 \cdot 10}, \text{ де}$$

$C_k(\text{віт. С})$ – концентрація вітаміну С, визначена за калібрувальним графіком, мг/дм³;

V_1 – об'єм мірної колби, 25 см³;

V_2 – об'єм мірної колби, 100 см³;

100 – маса об'єкта, г;

10 – об'єм аліквоти екстракту, см³;

m – наважка природного об'єкта, г.

Зробити узагальнюючий висновок про вміст вітаміну С у природних об'єктах та вплив екологічних факторів на його вміст.

Усі дані звести у загальну таблицю

"Вміст вітаміну С у рослинних об'єктах":

Природний об'єкт	Частина природного об'єкту	Концентрація вітаміну С, мг/см ³	Вміст вітаміну С, мг/100 г

Питання до самоконтролю:

1. На чому ґрунтується спектрофотометричний метод аналізу?

а) на поглинанні світла молекулами речовини

б) на поглинанні поліхроматичного світла

в) на поглинанні монохроматичного світла частинками речовини в розчині

г) на поглинанні світла іонами речовини

2. Спектр поглинання представляє собою залежність:

а) молярного коефіцієнта світлопоглинання, пропускання або оптичної густини від довжини хвилі

б) оптичної густини від концентрації визначуваного іону

в) оптичної густини від довжини хвилі

г) оптичної густини від часу

3. Для побудови спектра поглинання вимірювання оптичної густини розчину, проводять через кожні:

Розділ 6

- а) 25 нм
- б) 1020 нм
- в) 3050 нм
- г) 12 нм

4. Яким приладом можна визначати оптичну густину безбарвного розчину?

- а) полуменевим фотометром
- б) спектрофотометром
- в) фотоелектроколориметром
- г) полярографом

5. В чому головна перевага спектрофотометричних методів перед фотоколориметричними?

- а) можливість вивчення спектрів поглинання
- б) можливість проводити вимірювання в ультрафіолетовій, інфрачервоній та видимій частинах спектра
- в) висока чутливість
- г) можна визначити більшу кількість компонентів

6. Чи змінюється вид спектра поглинання стійкої сполуки при зміні концентрації розчину?

- а) не змінюється
- б) змінюється частково
- в) змінюється
- г) змінюється в ультрафіолетовій частині спектра

7. Що є джерелом випромінювання в ультрафіолетовій частині спектра?

- а) воднева або дейтерієва лампа
- б) лампа розжарювання
- в) штифт нернста
- г) селітовий випромінювач

8. В якій частині спектра поглинають світло забарвлені розчини?

- а) ближній уф, видимій і ближній іч
- б) ультрафіолетовій і видимій
- в) видимій
- г) видимій та інфрачервоній

Інструментальні методи аналізу

9. На чому ґрунтується атомно-абсорбційна спектрофотометрія?

- а) на вимірюванні поглинання світла молекулами речовини
- б) на вимірюванні поглинання світла вільними атомами речовини
- в) на вимірюванні інтенсивності випромінювання
- г) на вимірюванні інтенсивності світла

10. На чому ґрунтується кількісний емісійний спектральний аналіз?

- а) ширині смуг
- б) кількості ліній в спектрі
- в) характеристичності лінійчатих спектрів
- г) інтенсивності спектральних ліній

Тема 6.6. Світлова мікроскопія



6.6.1. Будова світлового мікроскопа. Типи й класи світлових мікроскопів. Оптичні системи мікроскопа та їх характеристики. Процедури настроювання й обслуговування мікроскопів. Світловий мікроскоп. Мікроскоп – оптичний прилад, призначений для отримання збільшених зображень біологічних об'єктів і деталей їх будови, не видимих неозброєним оком. Мікроскоп складається з оптичних і механічних частин. Оптичні частини мікроскопа: об'єктиви, окуляр, дзеркало і конденсор з ірисовою діафрагмою. Механічні частини мікроскопа: підстава, тубусотримач, тубус, револьвер, предметний столик, механізми макро- і мікрогвинта, механізм переміщення конденсора

Оптичні частини мікроскопа.

Об'єктив – основна оптична частина мікроскопа, яка створює зображення препарату. Об'єктив є системою лінз в металевій оправі, де розрізняють фронтальну – головну або збільшувальну лінзу, найближчу до об'єкту, яка

Розділ 6

будує зображення і коректувальні – вони усувають аберацию фронтальної лінзи.

Об'єктиви підрозділяються:

А) за ступенем збільшення на – об'єктиви малих збільшень (збільшення 10), об'єктиви середніх збільшень (збільшення 40), об'єктиви великих збільшень (збільшення 90)

Б) за ступенем досконалості виправлень аберации на – монохромати (призначені для роботи при монохроматичному освітленні), ахромати (хроматична аберация виправлена для 2 кольорів спектру), апохромати (хроматична аберация виправлена для 3 кольорів спектру); планмохромати, планахромати, планмохромати (виправлена крива поверхні зображення).

В) за властивостями – на сухоповітряні і іммерсійні. При використанні сухоповітряних об'єктивів між препаратом і об'єктивом повітряний простір, при іммерсійних між препаратом і об'єктивом знаходиться рідина (іммерсійне масло, вода). Відповідно іммерсійні об'єктиви ділять на водні і масляні. Отримання максимального збільшення можливе тільки за допомогою іммерсійного об'єктиву (як правило, об'єктиву із збільшенням 90). Імерсійні об'єктиви розраховуються на роботу з покривними стекльцями не товще 0,17 мм.

Окуляр – оптична система, яка використовується для розгляду зображення, побудованого об'єктивом. Простий окуляр (Гюйгенса) складається з двох плосковипуклих лінз, обернених опуклою поверхнею у бік об'єктиву. Між лінзами знаходиться діафрагма з постійним отвором. До діафрагми кріпиться стрілка – покажчик. Верхня лінза називається очною, на її оправі вказується збільшення окуляра. Нижня лінза отримала назву польової. Окуляр зазвичай збільшує зображення в 5-25 разів.

Дзеркало – направляє потік світла через конденсор на препарат. Має плоску і увігнуту поверхні, які використовуються залежно від ступеня освітлення.

Інструментальні методи аналізу

Конденсор – збирає промені світла і фокусує їх на препарат, забезпечуючи достатнє і рівномірне освітлення останнього. Конденсор складається з двох лінз: нижньої двоопуклої і верхньої плоскоопуклою. За допомогою конденсора регулюють ступінь освітлення об'єкту, що вивчається.

Механізм переміщення конденсора дозволяє змінювати його положення і тим самим збільшити або ослабити освітлення препарату.

Ірисова діафрагма, вмонтована в конденсор, служить для зміни ступеню освітленості препарату.

Механічні частини мікроскопа

Основа – використовується для стійкого розміщення мікроскопа на столі.

Тубусотримач – об'єднує в єдине ціле всі частини мікроскопа, оскільки останні прямо або побічно з'єднуються з ним і для його транспортування.

Предметний столик – служить для розміщення препарату. У центрі столика отвір. Переміщення наочного столика в горизонтальній площині проводиться двома центровочними гвинтами, що знаходяться на основі столика.

Револьвер – складається з двох (нерухомою і рухомою) дископодібних пластин. До останньої прикріплені об'єктиви.

Тубус – порожниста металева трубка, у верхній частині якої встановлюється окуляр, а до нижньої кріпиться револьвер.

Макрогвинт – служить для грубого фокусування різкості зображення.

Мікрогвинт – необхідний для тонкого наведення на різкість і для вивчення препарату по товщині.

Найважливішими характеристиками мікроскопа є:

1) *збільшення* – здатність розсіювати промені, що йдуть від об'єктиву. Це визначається відношенням лінійних розмірів зображення до лінійних розмірів об'єкту. Збільшення залежить від лінзи – чим більше кривизна, тим більше збільшення. Загальне

Розділ 6
збільшення мікроскопа визначається множиною збільшень об'єктиву і окуляра. При цьому потрібно пам'ятати, що об'єктив збільшує об'єкт, що вивчається, а окуляр – зображення, отримане за допомогою об'єктиву, не додаючи до нього нових деталей, не виявлених об'єктивом.

2) *якість зображення* – характеризується чіткістю зображення і залежить від ступеня виправлення основних оптичних недоліків лінзи – сферичної і хроматичної аберациї.

Сферична аберация – сильніше заломлення променів, що йдуть через периферичні зони лінзи в порівнянні з тими, що пройшли через її центральні ділянки. В результаті сферичної аберациї зображення частин об'єкту стає нечітким, розпливчатим. Зменшити сферичну аберацию можна шляхом підбору різних розсіюючих і збірних лінз.

Хроматична аберация – розкладання променів білого кольору на спектр, унаслідок неоднакового заломлення променів з різною довжиною хвилі. Для цього виду аберациї характерне спотворення кольору і зменшення чіткості зображення. Виправлення хроматичної аберациї можливе при поєднанні лінз, виготовлених з різних видів оптичного скла, що мають неоднакові показники заломлення. Цей принцип використовується при конструюванні об'єктивів мікроскопа. У зв'язку з цим розрізняють ахроматичні системи з меншим ступенем виправлення хроматичної аберациї і апохроматичні, де остання виправлена більшою мірою.

Інші види аберациї – кома, астигматизм, дисторсія мають менше значення в практиці мікроскопування

3) *роздільна здатність* – характеризує здатність лінз давати роздільне зображення найбільш дрібних деталей об'єкту. Межа розширення – це найменша відстань між двома точками об'єкту, при якому вони сприймаються роздільно. Роздільна здатність для світлового мікроскопа приблизно рівна половині довжини

Інструментальні методи аналізу
хвилі джерела світла і складає приблизно 0,2 мкм.

6.6.2. Фіксація та мікротомія біологічного матеріалу. Типи мікротомів. Методи фарбування тканин. Гістохімічні барвники для фарбування базо- та оксифільних структур. Основними етапами виготовлення фіксованих гістологічних препаратів є:

1. Збір і фіксація матеріалу для дослідження (формалін, спирт та ін.).
2. Промивка матеріалу (вода, спирт).
3. Зневоднення і ущільнення (спирт, ксилол).
4. Заливка (в парафін, або в целоїдин, або в желатин).
5. Виготовлення зрізів на мікротомі (товщина 6-8 мкм).

6. Забарвлення і заключення.

Основні етапи виготовлення препаратів для електронномікроскопічного дослідження:

1. Збір і фіксація шматочків органів і тканин (глутаральдегід, чотирьохокис осмію).
2. Зневоднення (спирт, ацетон).
3. Заливка в спеціальні синтетичні смоли (епон, аралдит).
4. Виготовлення зрізів на ультрамікротомі (товщина зрізу 400–800 нм).
5. Забарвлення (контрастування) зрізів солями важких металів (цитрат свинцю, уранілацетат).

Виготовлення зрізів, які після фарбування вивчають за допомогою світлового мікроскопа, досягається шляхом нарізання шматочків матеріалу на спеціальних апаратах, що називаються мікротомами. Існує два основні типи мікротомів. На мікротомах *першого типу* готують зрізи із парафінових і целоїдинових блоків. Вони можуть бути полозкові (ковзаючі) та барабанні (ротаційні). Такі мікротоми можуть мати програмні режими для виготовлення та вирівнювання зрізів з автоматичним їх нарізанням. Для полегшення роботи та збільшення кількості виготовлення зрізів на сьогодні використовують комбіновані

Розділ 6
та вібраційно-лезові моделі мікротомів. Комбінована модель мікротомів поєднує лінійний горизонтальний рух ручного приводу (як у полозковому мікротомі) при вертикальному переміщенні зразка (як в ротаційному).

Мікротоми другого типу – заморожувальні. На них готують зрізи із замороженого матеріалу. До складу мікротомів обов'язково входять такі компоненти: станина, тримач ножа, механізм мікроподачі, тримач блока, мікротомний ніж і механізм, який забезпечує рух тримача ножа. Залежно від модифікації мікротомів, ці компоненти можуть мати різне розміщення або доповнюватись додатковими. Станина – найбільш масивний компонент мікротому. Вона надає стійкості мікротому, і до неї кріпляться всі інші його компоненти. Тримач ножа фіксує мікротомний ніж і регулює його нахил. Тримач блока фіксує блок у певному положенні. Механізм мікроподачі забезпечує автоматичну подачу блока разом з його тримачем до мікротомного ножа для отримання зрізів заданої товщини. Мікротомним ножем нарізаються зрізи. Його рух, разом з тримачем забезпечує відповідний механізм. Заморожувальний мікротом має спеціальний пристрій для заморожування матеріалу – металевий столик. Заморожування досягається за допомогою вуглекислоти, яка по спеціальному шлангу надходить в порожнину столика від балону. Останнім часом широкого поширення у гістологічній практиці набули заморожувальні мікротоми з термоелектричним столиком із селеновим випрамлячем. Робота цього столика базується на використанні термоелектричного ефекту. Перед початком виготовлення зрізів на заморожувальних мікротоміх обов'язково слід ознайомитись з правилами роботи з ними і дотримуватись їх. Для гістологічних та гістохімічних досліджень в Україні випускають заморожувальні мікротоми марки – МЗ-2.

Інструментальні методи аналізу

6.6.3. Спеціальні методи мікроскопії.
Темнопольовий мікроскоп – застосовується для вивчення прозорих, слабо заломлюючих світло об'єктів, не видимих при освітленні звичайним способом. Для створення темнопольового освітлення використовуються спеціальні конденсори великим полем. Принцип освітлення полягає в тому, що промені направлені на об'єкт таким чином, що не відбувається попадання прямих променів на нього. Дослідник спостерігає частини зображення, що світяться, на темному фоні. Межею можливостей такого способу мікроскопування є визначення частинок до 2 нм. Істотний недолік – неможливість визначити форму і внутрішню будову спостережуваних частинок.

Фазовий – контрастний мікроскоп – застосовується для вивчення *малоконтрастних прозорих (зокрема, живих або нефарбованих) об'єктів, які майже не поглинають світла, тобто не змінюють амплітуду світлової хвилі, але змінюють фазу хвилі, що проходить.* Проте око не може реєструвати фазових змін. За допомогою спеціального конденсора і об'єктиву вони штучно перетворюються на амплітудні, які сприймаються оком. У результаті цього створюється контрастне, чітке зображення нефарбованих структур.

Різновидами фазово-контрастного мікроскопа є ***інтерференційний мікроскоп***, який призначений для кількісного визначення маси тканини, і диференціальний інтерференційний мікроскоп (з оптикою Номарського), який спеціально використовується для вивчення рельєфу поверхні клітин і інших біологічних об'єктів.

Фазово-контрастний і інтерференційний мікроскопи дозволяють вивчати живі клітини. У них використовується ефект інтерференції, що виникає при комбінації двох наборів хвиль, який створює зображення мікроструктур. Перевагою фазово-контрастної і інтерференційної мікроскопії є можливість спостерігати клітини в процесі руху і мітозу.

Розділ 6

При цьому реєстрація руху клітин може проводитися за допомогою цейтраферної (покадрової) мікрокінозйомки.

Поляризаційний мікроскоп – виявляє в гістологічних об'єктах ізо- і анізоструктури (одинарне і подвійне променезаломлення в біологічних об'єктах). Для отримання поляризованого променя використовують, зокрема, призму Ніколя, що поміщається між джерелом світла і об'єктом. Інша призма – аналізатор знаходиться в об'ємі, що обертається, між об'єктивом і окуляром. При повороті призми аналізатора на 90 градусів в полі зору залишаються видимими тільки анізотропні структури. Методом виключення визначаються ізотропні структури, які видно при нульовому положенні призми. Зображення препарату розглядається через окуляр.

Ультрафіолетовий мікроскоп – дає можливість зменшити вирішувану відстань 0,1 мкм унаслідок застосування ультрафіолетових променів. Як джерело використовують ртутно-кварцові лампи. Вся оптика мікроскопа, а також покривні і наочні скельця готуються з кварцу. У основі ультрафіолетової мікроскопії лежить виборче поглинання біологічними тканинами і клітинами короткохвильового випромінювання, унаслідок чого мікроскопування ультрафіолетових зображень дозволяє побачити їх структуру. Отримане в ультрафіолетових променях, не видиме оком зображення, перетворюється у видиме за допомогою реєстрації на фотопластині або шляхом застосування спеціальних пристроїв (люмінесцентний екран, електронно-оптичний перетворювач).

Люмінесцентний (флюоресцентний) мікроскоп – використовується для вивчення розподілу ряду хімічних компонентів в гістологічних структурах. Основою для створення цього приладу послужило явище люмінесценції, тобто збудженого свічення деяких біологічно важливих з'єднань. Будь-яка клітина живого організму володіє флюоресценцією, проте вона зазвичай буває

Інструментальні методи аналізу надзвичайно слабкою. Наведена (штучна) люмінесценція виникає при обробці препаратів спеціальними барвниками – люмінофорами (акридіновий жовтогарячий). Їх концентрація настільки мала, що вони не впливають на склад і структуру препарату, а також не порушують життєдіяльність біологічних об'єктів. Відповідно основною перевагою методу флюоресцентної мікроскопії є можливість спостережень цитологічних об'єктів, у тому числі і проведення на живому не фіксованому матеріалі деяких цито- і гістохімічних реакцій, причому в цьому застосуванні метод володіє високою чутливістю і специфічністю.

Електронний мікроскоп – дає можливість отримати зображення об'єктів, величина яких в середньому має близько 0,1-0,7 нм. Така висока роздільна здатність пояснюється застосуванням електронних променів. Джерелом електронів є електронна лампа без оболонки. Вольфрамова нитка катода під впливом нагріву випромінює потік електронів, який прямує в тубус. В умовах вакууму електронні промені в магнітному полі поведуться подібно до променів видимого світла в скляній призмі. Тому електромагніти електронного мікроскопа називають лінзами. Розрізняють конденсорна, об'єктивна і проєкційна лінзи. Між конденсором і об'єктивом поміщають об'єкт. Електронний пучок спочатку фокусується конденсорною магнітною лінзою. Велика частина електронів, проходячи через об'єкт, фокусується другою магнітною лінзою – об'єктивною, яка дає збільшене зображення об'єкту. Це зображення збільшується третьою магнітною лінзою – проєкційною. Електрони, які проходять через об'єкт, викликають свічення екрану, покритого люмінофором, проводячи на нім зображення об'єкту, тобто зображення виходить на люмінесцентному екрані. Його фотографують і, таким чином, предметом вивчення є електронна мікрофотографія. За допомогою електронного мікроскопа стало можливим вивчення ультраструктури клітин і їх похідних,

Розділ 6
макромолекул, вірусів і інших субмікроскопічних утворень.

В даний час існують два типи електронних мікроскопів:

- растровий електронний мікроскоп
- електронний мікроскоп, що просвічує.

Так звані растрові (скануючі) електронні мікроскопи дозволяють отримати об'ємне зображення об'єктів, що вивчаються. Растровий електронний мікроскоп працює за принципом сканування електронним мікрозондом досліджуваного об'єкту, тобто послідовно «обмацувати» сфокусованим електронним променем окремі точки поверхні.

Головним достоїнством растрової електронної мікроскопії є велика глибина різкості, широкий діапазон безперервної зміни збільшення і висока роздільна здатність.

Електронний мікроскоп, що просвічує, дозволяє отримати плоске зображення досліджуваного об'єкту.

Мікрометр – використовується для вимірювання лінійних розмірів мікроскопічних об'єктів.

6.6.4. Інші інструментальні методи візуального аналізу біологічних об'єктів.

Люмінесцентна мікроскопія – оптичне дослідження мікрооб'єктів, пофарбованих спеціальними барвниками (флюорохромами), що випускають світіння при дії ультрафіолетовими променями. Для люмінесцентної мікроскопії застосовуються спеціальні мікроскопи оптичні пристрої, основною частиною яких є джерело ультрафіолетових променів і система фільтрів до нього. Флюорохроми, як правило, флуоресціюють по-різному в залежності від хімічного складу структур, з якими вони взаємодіють. Деякі з них володіють спорідненістю до певних клітинних структур.

Наприклад, акридиновий помаранчевий барвник забарвлює нуклеопотеїди клітини, аурамін – воскоподібна речовина, що міститься в

Інструментальні методи аналізу мікобактеріях. Деякі мікрооб'єкти не вимагають попереднього забарвлення флюорохромами і вивчаються з допомогою люмінесцентної мікроскопії без фарбування.

Люмінесцентна мікроскопія

(флюоресцентна мікроскопія) – спеціальний вид мікроскопування, заснований на використанні власної (первинної) або наведеної (вторинної) фотолюмінесценції мікроскопічних об'єктів. Люмінесцентний мікроскоп – це звичайний біологічний мікроскоп, оснащений двома світлофільтрами. Джерелами світла служать ртутно-кварцові лампи надвисокого тиску (типу ДРП1) або лампи розжарювання точкового типу. Яскраве кольорове світіння об'єктів на темному тлі забезпечує високий контраст. Оптико-механічна промисловість випускає спеціальні люмінесцентні мікроскопи і окремі освітлювачі.

Лише деякі біологічно значущі речовини мають виражену власну люмінесценцію у видимій області спектра. До них відносяться деякі пігменти (хлорофіл, порфірини, ліпохроми), вітаміни А і В₂, алкалоїди, антибіотики (тетрациклін та ін), хіміотерапевтичні і токсичні речовини. Проникнення цих речовин в органи і клітини, їх розподіл і перетворення можуть бути простежені за допомогою прижиттєвої люмінесцентної мікроскопії.

Частіше в люмінесцентній мікроскопії використовують люмінесцентне «забарвлення» спеціальними речовинами (флюорохромами), вибірково додають тонким структурам клітини і тканин здатність люмінесціювати (люмінесцентна цитохімія).

Флюоресцентна гібридизація in situ (англ. *Fluorescence in situ hybridization, FISH*)

– це цитогенетичний метод, який використовується для визначення і локалізації певної послідовності ДНК на хромосомі. Для досягнення цієї мети використовуються спеціальні гібридизаційні ДНК-зонди з флюоресцентними властивостями та комплементарні до певної ділянки ДНК. Використання FISH дозволяє визначати

Розділ 6
різноманітні хромосомні аномалії: делеції, транслокації, ампліфікації, тощо. Для виконання FISH застосовують ДНК та РНК зонди, для візуалізації відповідно послідовностей в ДНК або РНК. Часто зонди синтезують з ізольованих фрагментів ДНК.

Ультрафіолетова мікроскопія (250-400 нм) застосовується для дослідження біологічних об'єктів (наприклад, сліди крові, сперми), інфрачервона мікроскопія (0,75-1,2 мкм) дає можливість вивчати внутрішню структуру об'єктів, непрозорих у видимому світлі (кристали, мінерали, деякі види скла тощо). В основі ультрафіолетової мікроскопії лежить здатність деяких речовин (ДНК, РНК) поглинати ультрафіолетові промені. Вона дає можливість спостерігати і кількісно встановлювати розподіл цих речовин у клітині без спеціальних методів фарбування. В ультрафіолетових мікроскопах використовується кварцова оптика, що пропускає ультрафіолетові промені.

Ультрафіолетова мікроскопія – розділ мікроскопії з методами спостереження мікрооб'єктів, що ґрунтується на використанні побудованих на застосуванні ультрафіолетових променів. В ультрафіолетовій мікроскопії невидиме оку зображення досліджуваного мікрооб'єкту, отримане в ультрафіолетових променях, перетворюється у видиме зображення різними методами. Перевагою ультрафіолетових мікроскопів є можливість підвищення роздільної здатності порівняно з класичною мікроскопією за рахунок меншої довжини хвилі ультрафіолетового випромінювання порівняно з видимим світлом та підвищення контрасту зображення досліджуваного мікрооб'єкта внаслідок більшого коефіцієнта поглинання ультрафіолетових променів багатьма речовинами. Ультрафіолетова мікроскопія використовується у біології, медицині, мінералогії, металографії, хімії тощо.

Електронна мікроскопія – сукупність методів дослідження за допомогою електронних мікроскопів мікроструктур тіл

Інструментальні методи аналізу (аж до атомно-молекулярного рівня), їх локального складу і локалізованих на поверхнях або в мікрооб'ємах тіл електричних і магнітних полів («мікрополів»). Електронна мікроскопія включає також удосконалення і розробку нових електронних мікроскопів і інших корпускулярних мікроскопів (напр., протонного мікроскопа) і приставок до них; розробку методик підготовки зразків, досліджуваних в електронних мікроскопах; вивчення механізмів формування електронно-оптичних зображень; розробку способів аналізу одержуваної інформації. Електронна мікроскопія займає провідне місце серед методів дослідження різних за призначенням та структурою об'єктів. Вона дозволила вперше візуалізувати атомну будову речовини, що мало велике наукове та прикладне значення. З часу створення перших електронних мікроскопів був пройдений шлях їх поступового удосконалення, що дозволило на сьогодні мати багатофункціональні прилади із широкими можливостями отримання інформації не лише структурно змісту. Ця багатофункціональність впливає з різних фізичних явищ, що виникають під час взаємодії електронів з об'єктами дослідження. Разом з тим вирішення проблеми отримання повної, найбільш цікавої і достатньо достовірної інформації на основі досліджень за допомогою електронних мікроскопів не втрачає своєї актуальності. Часто дослідники під час використання електронних мікроскопів наперед не планують основний напрям досліджень і лише після їх завершення приходять розуміння найбільш цікавих результатів, які на фоні широкого спектру отриманої інформації подані досить обмежено.

Для отримання зображення поверхні зразка використовуються вторинні, відбиті і поглинені електрони. Інші випромінювання, які застосовуються в електронній мікроскопії це додаткові джерела інформації.

Вторинні електрони. Первинні електрони, що проникають у зразок, взаємодіють з електронами зовнішніх оболонок

Розділ 6

атомів об'єкта, передаючи їм частину своєї енергії. Відбувається іонізація атомів зразка, а електрони, що вивільняються в цьому випадку, можуть залишити зразок і проявитися як вторинні електрони. Вони характеризуються дуже малою енергією і тому виходять з ділянок зразка дуже близьких до поверхні. Глибина шару, що дає вторинні електрони, складає 1...10 нм. У межах цього шару розсіювання електронів дуже мале, і тому при одержанні зображень у вторинних електронах роздільна здатність визначається насамперед діаметром первинного зонда. Вторинні електрони забезпечують максимальну роздільну здатність, порядку 5...10 нм. Тому вони є в електронній мікроскопії головним джерелом інформації для отримання зображення поверхні об'єкта. Кількість вторинних електронів, що утворюються, слабо залежить від атомного номера елемента. Основним параметром, що визначає вихід вторинних електронів, є кут падіння пучка первинних електронів на поверхню об'єкта. Таким чином, варіації нахилу мікроділянок поверхні відносно осі електронного зонда викликають різко виражені зміни у виході вторинних електронів. Цей ефект використовується для одержання інформації про топографію поверхні.

Відбиті електрони. Вони утворюються при розсіюванні первинних електронів на великі (до 90°) кути в результаті одноразового пружного чи багаторазового розсіювання на малі кути. В результаті первинні електрони, зазнавши ряду взаємодій з атомами зразка і втрачаючи при цьому енергію, змінюють траєкторію свого руху і залишають поверхню зразка. Розміри області генерації відбитих електронів значні і залежать від довжини вільного руху електронів у матеріалі зразка. Ця довжина зростає зі збільшенням напруги прискорення, що діє на первинні електрони, та зменшенням середнього атомного номера елементів, що входять до складу зразка. Розміри області генерації можуть змінюватися від 0,1 до 1 мкм.

Поглинені електрони. При дії зонда частина генерованих електронів залишається в

Інструментальні методи аналізу межах зразка. Так, при енергіях первинного пучка 10...20 кеВ приблизно 50% від загального числа утворених вторинних і відбитих електронів досягають поверхні зразка і залишають її. Електрони, що залишилися, утворять струм поглинених електронів. Його величина дорівнює різниці між струмом зонда і струмами відбитих і вторинних електронів. Ця різниця є сигналом для одержання зображення, на яке впливають як топографічний, так і композиційний ефекти. Поглинені електрони генеруються у великому обсязі. Роздільна здатність при одержанні зображень у цьому випадку має такий же порядок, як і для відбитих електронів. Даний метод одержання зображень використовується рідко через малу роздільну здатність.

Радіоізотопний аліз (діагностика) – метод застосування радіоактивних ізотопів і мічених сполук для аналізу досліджуваних зразків з метою виявлення і діагностики певних хворб та інших відхилень від норми.

При нормальному стані атома кількість його електронів, що рухаються навколо ядра, відповідає кількості протонів в ядрі, що приводить до нейтралізації сумарних негативних зарядів електронів і позитивного заряду ядра. У цьому стані атом є електрично нейтральною системою.

Радіоактивний розпад (радіоактивність) – це внутрішньоядерні перетворення, що призводять до зміни числа протонів у ядрі. Він полягає у мимовільному перетворенні нестабільних ядер атомів у більш стабільні, супроводжується виділенням внутрішньоядерної енергії, радіоактивним випромінюванням, тобто випусканням у навколишнє середовище альфа, бета і гамма променів.

Іонізуючими називаються випромінювання взаємодія яких з атомами і молекулами середовища приводить до утворення позитивно і негативно заряджених іонів, тобто до іонізації речовини.

Іонізація атомів або молекул виникає тоді, коли енергія, яка передається іонізуючій

Розділ 6
частинці, або фотону, вища за енергію зв'язку електрона з ядром. Для повітря цей показник у середньому становить 34 еВ, для більшості речовин, які входять до складу організмів, від 10 до 65 еВ.

Типи радіоактивного розпаду:

Альфа-розпад характерний для трансуранових елементів. При цьому з ядра вилітає цілий блок частинок, які складаються з двох протонів і двох нейтронів і являють собою ядро атома гелію або альфа-частинку. Випустивши альфа-частинку, атом радіоактивного елемента перетворюється на атом іншого елемента, атомний номер його зменшується на 2, а атомна маса – на 4. Знову створений дочірній елемент розміщується в таблиці Менделєєва на дві клітинки ліворуч від материнського. При альфа-розпаді можуть виникати збуджені, або метастабільні, ядра, які, переходячи в основний стан, випускають гамма-кванти. Маса атомів знову створених елементів не завжди збігаються з атомною масою елемента, зазначеного в таблиці Менделєєва, тобто виникають різновиди даного елемента – *ізотопи*.

Бета(-)-розпад настає тоді, коли число нейтронів в ядрі більше, ніж потрібно для стабільності ядра. При бета-розпаді один із внутрішніх нейтронів перетворюється на протон, а з ядра виділяються β -частинка (або електрон ядерного походження) і антинейтрино. При цьому атомний номер елемента збільшується на одиницю і дочірній елемент переходить вправо в сусідню клітинку таблиці Менделєєва. При бета-розпаді сумарна енергія β -частинок та антинейтрино дорівнює величині енергії зв'язку, що характерна для даного ізотопу. Якщо антинейтрино забирає більшу частину енергії, то енергетично β -частинка дістає менше енергії, і навпаки, тому енергія β -частинки одного й того ж радіонукліда неоднорідна, їх енергетичний спектр суцільний або неперервний. Середня енергія частинки в спектрі дорівнює приблизно третині максимальної енергії, і її зазначають при енергетичній характеристиці β – частинки.

Інструментальні методи аналізу
К-захоплення, або електронне захоплення, спостерігається у нейтронодефіцитному ядрі тоді, коли у збудженому ядрі не має енергії, достатньої для позитронного розпаду. Ядро атома звільняється від надлишкових протонів, захоплюючи електрон з ближчого до ядра К-шару (іноді й L-шару). Надлишковий протон, який з'єднався з електроном, перетворюється на нейтрон і нейтрино, масове його число при цьому те саме, а змінюється лише заряд ядра або кількість протонів, і утворюється новий елемент, розміщений у таблиці Менделєєва правіше від материнського на одну клітинку. У цьому разі ядерне перетворення відбувається з виділенням з ядра тільки нейтрино. Під час переходу з одного шару в інший з атома виділяється енергія у вигляді характеристичного випромінювання. Отже, при розпаді радіоактивних елементів виникає *випромінювання* альфа- і бета-частинок (електронів і позитронів), гамма і характеристичне випромінювання.

Характерною властивістю природної радіоактивності є інтенсивність, з якою відбувається розпад ядра.

Активність радіонукліда – це кількість атомів радіоактивного елемента, які розпадаються за одиницю часу, міра кількості радіоактивної речовини, виражена кількістю радіоактивних перетворень за одиницю часу. Швидкість розпаду атомів кожного радіонукліда залежить від двох взаємопов'язаних величин: сталої розпаду (λ) та періоду напіврозпаду (T).

Швидкість, з якою розпадаються радіоактивні елементи досить різна. Вона характеризується так званою **сталю розпаду** – кількісна характеристика швидкості розпаду радіоактивних елементів, що показує, яка частина від загального числа атомів розпадається за 1 секунду. Чим більша стала розпаду, тим швидше розпадається елемент. Швидкість радіоактивного розпаду не залишається постійною під час розпаду.

Розділ 6

Період напіврозпаду – це час, впродовж якого кількість атомів даного радіонукліда зменшується удвічі.

Період напіврозпаду та стала розпаду пов'язані між собою: чим менший період напіврозпаду, тим менша стала розпаду, тим з меншою швидкістю розпадаються ядра радіоактивних елементів, тобто вони довше «живуть».

Розрізняють короткоживучі і довгоживучі радіонукліди. Час існування короткоживучих радіонуклідів вимірюється частками секунди, секундами, хвилинами, годинами, а довгоживучих – добами, роками.

Зважаючи на те, що у людини відсутня можливість відчувати дію іонізуючих випромінювань, важливими є прилади. Завдяки їм можна виявити і встановити рівень дії радіоактивних випромінювань. Відомі методи можна розділити на групи:

1) *за іонізацією середовища* – тобто за рахунок розпаду молекул під дією енергії випромінювання і за наявністю електричного току, який можна виміряти приладами - дозиметрами;

2) *викликають світіння* – сцинтиляцію або люмінесценцію (світіння) в деяких речовинах, що використовують у фотоелектронних примножувачах - в них утворюється електроімпульс;

3) *фотографічний метод* – засвічують фотопапір, фотоплівку, викликаючи фотоліз броміду срібла;

4) *калориметричний метод* – вимірюють кількість тепла, що виділяється в спеціальному детекторі при поглинанні ним випромінювань;

5) *хімічний метод* – заснований на певних змінах різноманітних речовин, чутливих до дії таких випромінювань, наприклад, змінюється колір - колориметричний метод;

б) *нейтронно-активаційний метод* – пов'язаний із вимірюванням наведеної радіоактивності, наприклад бета-активності, що виникає під впливом повільних нейтронів. Цей метод використовують для оцінки доз в

Інструментальні методи аналізу

аварійних ситуаціях, коли відбувається короткочасне опромінення великими потоками нейтронів;

7) *біологічний метод* – заснований на визначенні біологічних наслідків дії випромінювань на живі системи – за летальністю тварин, ступеня лейкопенії (зміни у крові), кількості хромосомних аберацій (змін), випаданню волосся, наявності в сечі дезоксицитидину;

8) *розрахунковий метод* – заснований на використанні математичних методів вимірів за кількістю радіонуклідів, що потрапили в організм;

9) *дозиметричний метод, який є найбільш вживаним*. В цьому випадку за допомогою спеціального пристроя – детектора Гейгера-Мюллера вимірюють електричний струм, який утворюється при іонізації речовини через яку проходить радіоактивне випромінювання. Такі прилади використовують в наукових дослідженнях, побуті, цивільній обороні. Для оцінки радіаційної обстановки застосовують прилади, принцип дії яких заснований на вимірюванні ефектів, що виникають при взаємодії випромінювання з речовиною.

Практичний блок**Види мікроскопів. Бінокулярний мікроскоп**

Мета роботи: Вивчити будову і принцип роботи мікроскопа. Навчитись визначати розмір об'єкта із застосуванням розмірного окуляра.

Обладнання: Мікроскоп моделі *Itbon* голландської фірми "*Nedoptifa*", набір оптичних окулярів, механізм координатного переміщення, зразки для спостережень.

Теоретичні відомості

Мікроскоп (грец. *цікрод* – маленький и *акоси* – дивлюся) – лабораторна оптична система для отримання збільшених зображень малих об'єктів з метою розглядування,

Розділ 6
вивчення і використання на практиці. За допомогою мікроскопів визначають форму, розміри, будову і багато інших характеристик мікрооб'єктів, а також мікроструктури макрооб'єктів.

Мікроскопи в залежності від конструкції розділяються на *стаціонарні та переносні*. До перших відносяться так звані "робочі" мікроскопи (електронні). Студентські (Біолам С-11, Біолам С-13) та дорожні (Біолам Д-11, Біолам Д-13) належать до переносних.

На відміну від стаціонарних, дорожні мікроскопи призначені для роботи в експедиційних умовах і транспортуються в спеціальних футлярах.

Робочі та студентські мікроскопи призначені для експлуатації в макрокліматичних районах з помірним та холодним кліматом в лабораторних або іншого подібного типу приміщеннях при t повітря від +10 до +35°C.

Дорожні мікроскопи призначені для експлуатації в макрокліматичних районах з помірним кліматом в приміщеннях і короткочасно на відкритому повітрі при t повітря від +10 до 40°C.

Залежно від необхідної величини розширення розглядуваних мікрочастин матерії, мікроскопи розділяються на: оптичні (світлові); електронні; рентгенівські; лазерні рентгенівські мікроскопи.

Електронний мікроскоп відрізняється можливістю отримувати в багато разів збільшене зображення об'єктів, використовуючи для їх освітлення електрони. На відміну від оптичного мікроскопа, в електронному мікроскопі використовують потоки електронів і магнітні або електростатичні лінзи. Деякі електронні мікроскопи дозволяють збільшувати зображення в 2 млн. разів, у той час, як максимальне збільшення кращих оптичних мікроскопів досягає 2000 разів. Як електронні, так і оптичні мікроскопи мають обмеження в роздільній здатності залежно від довжини хвиль. У електронних мікроскопах

Інструментальні методи аналізу використовуються електростатичні або електромагнітні лінзи для формування зображення шляхом управління пучком електронів і концентрації його на окремих ділянках зображення подібно до того, як оптичний мікроскоп використовує скляні лінзи для фокусування світла на (або крізь) зображенні.

Рентгенівський мікроскоп – *пристрій для дослідження мікроскопічної будови речовини за допомогою рентгенівського випромінювання*. Роздільна здатність досягає 100 нм, що в 2 рази вище, ніж в оптичних мікроскопів (200 нм). Теоретично рентгенівська мікроскопія дозволяє досягти на 2 порядки кращого розширення, ніж оптична (оскільки довжина хвилі рентгенівського випромінювання менше на 2 порядки). Розрізняють рентгенівські мікроскопи відбивні і проєкційні.

Лазерний рентгенівський мікроскоп – *прилад або мікроскоп із застосуванням рентгенівських лазерних променів, які відрізняються роздільною здатністю, що забезпечує отримання зображень на субатомному, атомному рівні на базі використання вимушеного променя, що генерується*. Наприклад, (інфрачервоного) потужністю 14,2 кіловата з довжиною хвилі 1,61 ангстрема.

Оптичний (світловий) мікроскоп складається з двох систем (рис.6.6.1) – механічної та оптичної. Механічна частина цього приладу складається з масивної підковоподібної основи, до якої прикріплено штатив. До штатива прикріплена труба (тубус), яку можна піднімати чи опускати за допомогою макрометричного гвинта та мікрометричного гвинта. (Мікрогвинтом користуються тільки для чіткої наводки при великому збільшенні! У всіх інших випадках користуються макрогвинтом). Знизу тубуса розміщена револьверна насадка у яку вгвинчуються об'єктиви. До штативу прикріплено також предметний столик з отвором посередині та

Розділ 6

двома лапками, за допомогою яких закріплюється препарат.

На предметний столик можна встановити механізм координатного переміщення препарату. Цей механізм оснащений двома тримачами препаратів і двома напрямними з рукоятками, за допомогою яких можливе горизонтальне і вертикальне переміщення препарату відносно об'єктива.

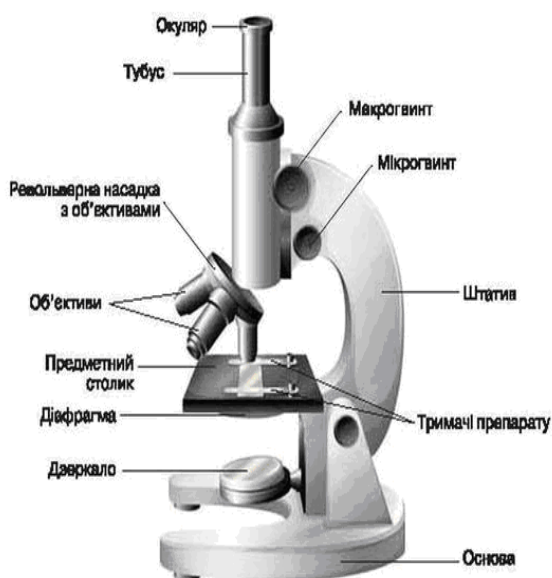


Рис. 6.6.1. Будова мікроскопа

Оптична система складається з об'єктива, окуляра та приладів для освітлення.

Об'єктиви мікроскопа – оптичні системи (рис. 6.6.2, а), призначені для побудови мікроскопічного зображення в площинні зображення з відповідним збільшенням, розширенням елементів, точністю відтворення за формою і кольором об'єкту дослідження.

Вони мають складну оптико-механічну конструкцію, яка включає декілька одинарних лінз і компонентів, склеєних з 2-х або 3-х лінз.



Рис. 6.6.2. Об'єктиви (а), окуляр (б) та їх маркування

Кількість лінз обумовлена областю вирішуваних об'єктивом завдань. Чим вище якість зображення, що дається об'єктивом, тим складніша його оптична схема. Загальне число

Інструментальні методи аналізу

лінз в складному об'єктиві може доходити до 14.

Окуляри (рис. 6.6.2, б) – оптичні системи, призначені для побудови мікроскопічного зображення на сітківці ока спостерігача. У загальному вигляді окуляр складається з двох груп лінз: очної – найближчої до ока спостерігача і польової – найближчої до площини у якій об'єктив буде зображення даного об'єкту.

Щоб визначити збільшення мікроскопа, потрібно збільшення окуляра перемножити на збільшення об'єктива (на об'єктиві та окулярі вказано їх збільшення).

Мікроскоп *Ibbon* споряджений окулярами 4, 7, 10, 15 і об'єктивами 10, 42, 97. Окуляр 10 оснащений лінійкою.

До приладів для освітлення відносять два оптичні блоки (рис. 6.6.3) – *освітлювач* і *конденсор*.

Освітлювач створює потік світла, який освітлює досліджуваний препарат. У класичних світлових мікроскопах конструкція освітлювача (вбудованого або зовнішнього) передбачає низьковольтну лампу, збираючу лінзу і діафрагму, що змінює діаметр світлової плями на зразку. Конденсор, що є збираючою лінзою, призначений для фокусування променів освітлювача на зразку. Конденсор також має ірисову діафрагму (польову і апертурну), за допомогою якої регулюється інтенсивність освітлення.

При роботі з світлопроникаючими об'єктами (рідинами, тонкими зрізами рослин тощо) їх освітлюють світлом, – освітлювач і конденсор розташовуються під предметним столиком. Непрозорі зразки потрібно освітлювати спереду. Для цього освітлювач розташовують над предметним столиком, і його промені за допомогою напівпрозорого дзеркала направляють на об'єкт через об'єктив.

Освітлювач може бути пасивним, активним (лампа) або складатися з обох елементів. Найпростіші мікроскопи не мають ламп для підсвічування зразків. Під столиком у них розташовується двостороннє дзеркало, в

Розділ 6

якого одна сторона плоска, а інша – увігнута. При денному освітленні, якщо мікроскоп стоїть біля вікна отримати освітлення можна за допомогою увігнутого дзеркала. Якщо ж мікроскоп знаходиться в темному приміщенні, для підсвічування використовуються плоске дзеркало і зовнішній освітлювач.

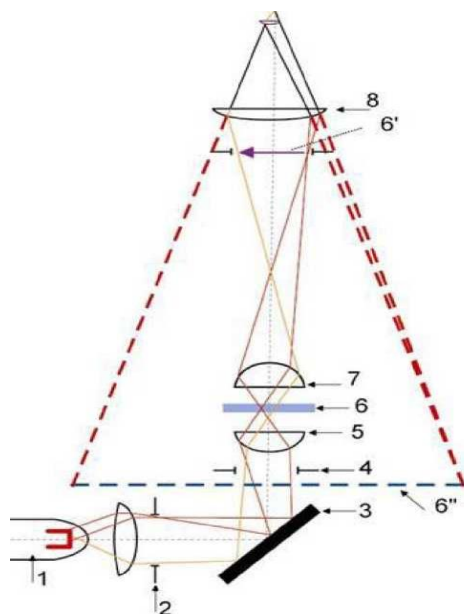


Рис. 6.6.3. Будова освітлювальної системи мікроскопа (1. Освітлювач; 2. Ірисова польова діафрагма; 3. Дзеркало; 4. Ірисова апертурна діафрагма; 5. Конденсор; 6. Препарат; 6'. Збільшене дійсне проміжне зображення препарату, що утворюється об'єктивом; 6''. Збільшене уявне остаточне зображення препарату, яке спостерігається в окулярі; 7. Об'єктив; 8. Окуляр)

Роздільна здатність – інша важлива характеристика мікроскопа, що визначає якість і чіткість формованого ним зображення. Чим більша роздільна здатність, тим більше дрібних деталей можна розгледіти при сильному збільшенні. У зв'язку з роздільною здатністю говорять про «корисне» і «некорисне» збільшення. **«Корисне»** називається граничне збільшення, при якому забезпечується максимальне деталювання зображення. «Некорисне» збільшення не підтримується роздільною здатністю мікроскопа і не виявляє нових деталей та може негативно вплинути на чіткість і контраст зображення. Таким чином, межа корисного збільшення світлового мікроскопа обмежується не спільним коефіцієнтом збільшення об'єктива і окуляра.

Інструментальні методи аналізу

Хід виконання: 1. Встановіть в тубус окуляр зі збільшенням *10. Прилад поставте перед собою так, щоб було зручно дивитися в окуляр.

2. Поверніть револьвер так, щоб проти тубуса розмістився об'єктив з найменшим збільшенням, тобто *10.

3. Визначте збільшення мікроскопа.

4. Дивлячись одним оком в окуляр, поверніть дзеркало так, щоб світло, яке падає з вікна, відбивалось від дзеркала, і рівно та яскраво освітлювалось все поле зору, тобто, щоб коло, яке було видно в окуляр, було яскраво біле. (Після цього мікроскоп переставляти не можна – зіб'ється чіткість світла.)

5. Візьміть у викладача запропонований ним препарат і притисніть його металевими лапками на предметному столику.

6. Рухом макрометричного гвинта (кремальєри) наведіть прилад так, щоб було видно зображення. Обертаючи мікрогвинт легким рухом в той чи інший бік, досягніть чіткої наводки на фокус.

7. Відцентруйте зображення по лінійці.

8. Визначить розмір препарату.

Вимоги до оформлення звіту

1. Замалуйте загальний вигляд запропонованої моделі мікроскопу і поясніть призначення його складових елементів.

2. Визначте збільшення мікроскопу в залежності від поєднання окуляра та об'єктива і заповніть таблицю.

3. Замалуйте загальний вигляд препарату і вкажіть його геометричні розміри. Збільшення оптичної системи мікроскопу

Питання до самоконтролю:

1. Роздільна здатність мікроскопа залежить від довжини хвилі джерела світла. Яка роздільна здатність світлового мікроскопа?

а) 0,1 мкм

б) 0,2 мкм

в) 0,4 мкм

г) 0,1 нм

д) 0,2 нм

Розділ 6

2. У експерименті використовувалися живі об'єкти, в яких необхідно визначити ряд хімічних компонентів, використовуючи вітальне спостереження. Який мікроскопічний метод дослідження буде використаний?

- а) фазово-контрастна мікроскопія
- б) електронна мікроскопія
- в) флуоресцентна мікроскопія
- г) поляризаційна мікроскопія
- д) темнопольова мікроскопія.

3. Об'єктив – оптична частина мікроскопа, яка створює зображення об'єкту, що вивчається. Які об'єктиви не використовуються в світловій мікроскопії?

- а) сухоповітряні
- б) імерсійні
- в) ахроматичні
- г) апохроматичні
- д) електромагнітні

4. Мікроскоп складається з оптичних і механічних частин. Що відносять до оптичних частин?

- а) тубус, окуляр, конденсор
- б) револьвер, макро- і мікрогвинт, дзеркало
- в) револьвер, окуляр
- г) окуляр, конденсор, об'єктив
- д) тубус, окуляр, револьвер

5. У яких мікроскопічних приладах використовується ультрафіолетове джерело світла?

- а) темнопольовий і люмінесцентний
- б) люмінесцентний, ультрафіолетовий
- в) світловий електронний
- г) фазово-контрастний, ультрафіолетовий
- в) поляризаційний, ультрафіолетовий

6. Мікроскоп складається з механічних і оптичних частин. У яких деталях мікроскопа є діафрагма?

- а) окуляр і об'єктив
- б) окуляр і конденсор
- в) тубус і окуляр

Інструментальні методи аналізу

г) об'єктив і конденсор

д) тубус, об'єктив, окуляр

7. Роздільна здатність мікроскопа характеризується здатністю лінз давати роздільне зображення найбільш дрібних деталей об'єкту. Від чого залежить межа дозволу?

- а) наявність конденсора
- б) довжини хвилі джерела світла
- в) наявність хроматичної аберації
- г) наявність сферичної аберації
- д) збільшення мікроскопа

8. У експерименті використовуються живі, не забарвлені об'єкти, що містять структури, по різному заломлюють світлові промені. Який вид мікроскопії необхідно використовувати в даному випадку?

- а) електронний мікроскоп
- б) поляризаційний мікроскоп
- в) фазово-контрастний мікроскоп
- г) ультрафіолетовий мікроскоп
- д) люмінесцентний мікроскоп

9. При дослідженні вірусів отримано тривимірне зображення об'єктів, що вивчаються. Який вид мікроскопії використовувався?

- а) електронний мікроскоп
- б) поляризаційний мікроскоп
- в) фазово-контрастний мікроскоп
- г) ультрафіолетовий мікроскоп
- д) люмінесцентний мікроскоп

10. Якість зображення об'єктів, що вивчаються, залежить від ступеня виправлення аберації. Яким чином можна зменшити хроматичну аберацію зображення?

- а) використовуючи люмінофори
- б) використовуючи лінзи, різні по хімічному складу
- в) використовуючи лінзи, різної кривизни
- г) діафрагмуванням
- д) використовуючи ультрафіолетове випромінювання

Література

1. Алексеев В.Н. Инструментальные методы анализа. М.: Химия, 2003. 286 с.

2. Архіпова Т. Ф., Осадчук А. Ю. Прикладне матеріалознавство : навчальний посібник. Вінниця : ВНТУ, 2013. 60 с.

3. Бабко А. К., Пилипенко А. Т., Пятницкий И. В., Рябушко О. П. Физико-химические методы анализа. М. : Высшая школа, 1968. 336 с.

4. Баженов В. А. Ісаєнко В. М., Саталкін Ю. М. та ін. Інженерна екологія: Підручник з теорії і практики сталого розвитку. К. : НАУ, 2006. 492 с.

5. Базель Я.Р., Шкумбатюк Р.С., Сухарева О.Ю., Воронич О.Г. Навчальний посібник з курсу «Аналітична хімія». Частина 1. Якісний хімічний аналіз. Ужгород: в-во УжНУ, 2010. ч. 1. 116 с.

6. Бондар О. І., Корінько І. В., Ткач В. М., Федоренко О. І. Моніторинг навколишнього середовища : навч. пос. К.; Х.: ДЕІ-ГТІ, 2005. 126 с.

Балоян Б.М., Колмаков А.Г., Алымов М.И. и др. Наноматериалы. Классификация, особенности свойств, применение и технологии получения: учеб. Пособие. М.: АгроПрессДизайн, 2007. 102 с.

7. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд. Л.:Химия, 1986. 432 с.

8. Георгиевский В. П., Гризодуб А. И. Стандартизация и контроль качества лекарственных средств. Технология и стандартизация лекарств. Х., 1996;

9. Гризодуб А. И., Георгиевский В.П. Линейные зависимости в тонкослойной хроматографии с двухкомпонентными системами растворителей. Журн. аналит. химии. 1981. Т. 36, № 5.

10. Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. Устойчивость значений R_f и R_m к колебаниям в составе бинарных подвижных фаз. Журн. физ.

Инструментальные методы анализа химии. 1984. Т. 58, № 6; ДФУ. Х., 2001. Дополнения 1. Х., 2004.

11. Дворкин В. И. Метрология и обеспечение качества количественного химического анализа. М.:Химия, 2001. 263 с.

12. Зінчук В. К., Левицька Г. Д., Дубенська Л. О. Фізико-хімічні методи аналізу: Навчальний посібник. Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 362 с.

13. Золотов Ю. А., Вершинин В. И. История и методология аналитической химии. Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.:Издательский центр «Академия». 2007. 464 с.

14. Ісаєнко В. М., Лисиченко Г. В., Дудар Т. В. та ін. Моніторинг і методи вимірювання параметрів навколишнього середовища : навч. посібник. К. : Вид-во Нац. авіа. ун-ту «НАУ-друк», 2009. 312 с.

15. Израэль Ю. А. Экология и контроль состояния природной среды. Л. : Гидрометеоздат, 1984. 560 с.

16. Кельнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы.: пер с англ. под ред. Ю.А.Золотова. Москва : Мир, АСТ. 2004. Том 1. 608 с.

17. Кельнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы.: пер с англ. под ред. Ю.А.Золотова. Москва : Мир, АСТ. 2004. Том 2. 729 с..

18. Кічно В. О., Поліщук С. В., Гудков І. М. Основи радіобіології та радіоекології: Навч. посіб. 3-те видання. К.: «Хай-Тек Прес», 2010. 320 с.

19. Коваленко Г.Д., Волошин В.С. Основи радіоекології : навч. посіб. Маріуполь : Вид. ПДТУ, 2003. 138 с.

20. Копілевич В. А., Косматий В. Є., Войтенко Л. В., Абарбарчук Л. М. та ін. Аналітична хімія для аграрних спеціальностей (хімічний аналіз) : Навчальний посібник. К.: НАУ, 2002. 295 с.

21. Кочеров В. И., Сараевой С. Ю. и др. Химические и физико-химические методы анализа : сб. задач : учеб. пособие; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал.

Розділ 6

федер. ун-т. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2016. 208 с. Електронний ресурс: Режим доступу – http://elar.urfu.ru/bitstream/10995/43904/1/978-5-7996-1860-5_2016.pdf.

22. Крешков А.П. Основы аналитической химии. Физико-химические (инструментальн Інфрачервоні) методы анализа. М.:Химия, 1970. 472 с.

23. Лисенко О. М., Набиванець Б. Й. Вступ до хроматографічного аналізу. Навчальний посібник. К.: Корвін-прес, 2005. 187 с.

24. Масікевич Ю. Г., Гринь С. О., Герещун Г. М. та ін. Методи вимірювання параметрів навколишнього середовища. Чернівці, Зелена Буковина, 2005. 341 с.

25. Пилипенко А. Т., Пятницький И. В. Аналитическая химия. Книга 1-2. М.: Химия, 1990. 846 с.

26. Посудін Ю. І. Методи вимірювання параметрів навколишнього середовища. К. : Світ, 2003. 288 с.

27. Пупань Л.І. Методичні вказівки до виконання лабораторної роботи «Вивчення структури матеріалів методом електронної мікроскопії» з курсів «Введення до нанотехнологій», «Технології і техніка нанорівня», «Наноматеріали і нанотехнології» для студентів машинобудівних спеціальностей денної та заочної форм навчання. Харків: НТУ «ХПІ», 2011. 35 с. Електронний ресурс: Режим доступу – <https://presentacii.ru/presentation/atomnoabsorbciopnaaya-spektroskopiya>

28. Рожков А.О., Пузі В.П., Каленська С.М. та ін. Дослідна справа в агрономії : навчальний посібник Кн.1 – Теоретичні аспекти дослідної справи. Харків,Майдан. 2016. 316 с.

29. Скоробогатий Я. П., Федорко В. Ф. Хімія і методи дослідження сировини і матеріалів. Фізична і колоїдна хімія та фізико-хімічні методи дослідження. Львів, 2005. 245 с.

30. Студеняк Я. І., Воронич О. Г., Сухаревич О. Ю., Фершал М.В., Базель Я.Р.

Інструментальні методи аналізу

Практикум з аналітичної хімії : інструментальні методи аналізу. Ужгород. 2014. 129 с.

31. Федорко В.Ф. Хімія і методи дослідження сировини і матеріалів. Фізична і колоїдна хімія та фізико-хімічні методи дослідження. Львів, 2005. 245 с.

32. Франчук Г. М., Ісаєнко В. М., Запорожець О. І. Урбоекологія і техноекоелогія : навч.-метод. посіб.К. : НАУ, 2004. 200 с.

33. Чеботарьов О. М., Щербакова Т. М., Гузенко О. М. Аналітична хімія. Якісний та кількісний аналіз: методичні вказівки до лабораторних робіт для студентів I–II курсів заочного відділення хімічного та біологічного факультетів. Одеса: «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2015. 84 с.

34. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа Методическое пособие для специального курса. Москва, 2007. 109 с. Електронний ресурс: Режим доступу – <http://www.chem.msu.su/rus/teaching/analyt/chrom/part1.pdf>

35. Fifiield F.W., Kealey D. Principles and Practice of Analytical Chemistry. Fifth Edition Blackwell Science Ltd. 2000. 564 p.

36. Francis Rouessac, Annick Rouessac Chemical analysis : modern instrumentation and methods and techniques /translated by Steve Brooks and Francis and Annick Rouessac. 2nd ed. 2007 by John Wiley & Sons Ltd. 586 p.

37. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry /Ed. F. Settle.-Prentice Hall PTR. 1997. 995 p.

38. Handbook of Analytical Techniques/edited by Helmut Giinzler and Alex Williams. WILEY-VCH. 2001. 1183 p.

39. Harris D.C. Quantitative chemical analysis. 7-ed.-Freeman&company.New-York.. 2007. 807 p.

40. James N. Miller, Jane C. Miller. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 5th ed. Pearson Education Limited. 2005. 285 p.

41. James W. Robinson, Eileen M. Skelly Frame, George M. Frame II Undergraduate

Розділ 6

instrumental analysis 6th Ed. Marcel Dekker, New-York, 2005. 1083 p.

42. Practical Guide to Chemometrics / Edited by Paul Gemperline. LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group Boca Raton London New York. 2006. 520 p.

43. Skoog D.A., West M.D., Holler F.J. Analytical Chemistry. An Introduction. 6th ed. Philadelphia etc: Saunders College Publishing, 1994. 612 p.