

Лекція 14

Тема лекції: «Основи молекулярної біології та її значення в біотехнології»

План лекції

1. Предмет і завдання молекулярної біології.
2. Етапи розвитку молекулярної біології.
3. Методи молекулярної біології та їх використання в біотехнології.

Література

Польський Б. М., Торяник В. М. Основи біології: Різноманітність життя на Босчко Ф.Ф., Босчко Л.О., Шмиголь І.В.

Основи молекулярної біології (курс лекцій). – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 255 с. доорганізмених рівнях. К.: Універсальна книга. 2023. 286 с.

Вигера С. М., Ключевич М. М., Ковальчук Р. Л. Обґрунтування новітньої методології забезпечення здоров'я фітоценозів. Moderní aspekty vědy: XLVII. Díl mezinárodní kolektivní monografie / Mezinárodní Ekonomický Institut s.r.o.. Česká republika: Mezinárodní Ekonomický Institut s.r.o., 2024. P. 166–175.

Вигера С., Ключевич М. Трофологія : посібник. /за редакцією С. Вигери. Київ : ЦП «Компринт», 2022. 186 с.

Біологія: навчальний посібник / Р.В. Шаламов, В.І. Підгірний, Ю.В. Дмитрієв, Д.В. Леонт'єв. К. Х.: Веста, 2012. 304 с.

Дербеньова А. Г. Загальна біологія: Навч. посібник / А. Г. Дербеньова, Р. В. Шаламов Х.: Світ дитинства, 1998. 264 с.

Польський Б.Т. Основи біології: Різноманітність життя на доорганізмених рівнях: навчальний посібник / Б.М. Польський, В.М. Торяник. Суми : Університетська книга, 2009. 288 с.

Біотехнологія рослин : [навчальний посібник] / Т.М.Сатарова, О.Є.Абраїмова, А.І.Вінніков, А.В.Черенков. Дніпропетровськ : Адверта, 2016. 136 с.

Мотузний В.О. Біологія : навч. посіб./ За ред. О.В. Костильова. 2-ге видання. К.: Світ успіху, 2013. 752 с.

<https://www.microscopemaster.com/cell-biology.html>

<https://nautilus.com.ua/ebook/molekulyarna-biolohiya>

<http://biology.org.ua/index.php?subj=main&lang=ukr&chapter=lib>

<https://www.nature.com/scitable/topic/cell-biology-13906536/>

Зміст лекції

1. Предмет і завдання молекулярної біології

Молекулярна біологія – наука, яка вивчає основні прояви та особливості процесів життєдіяльності на молекулярному рівні, забезпечує можливість підходів до розуміння сутності життєвих явищ на основі з'ясування ролі

атомів і молекул у формуванні біологічних структур із специфічними властивостями та функціями.

- *Об'єктом вивчення молекулярної біології* є субклітинні генетичні структури представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів.

- *Предметом вивчення цієї науки* є структурна організація, властивості і функції сполук, які є основою будови живих організмів, особливості їх молекулярної організації, механізми збереження, передачі та реалізації генетичної інформації, принципи регуляції клітинного метаболізму і підтримання гомеостазу.

Метою молекулярної біології є розкриття молекулярних механізмів перебігу процесів, які лежать в основі життєдіяльності та забезпечують здатність організмів до самовідтворення, самооновлення і саморегуляції, як важливих та необхідних складових тріумвірату ознак, що відрізняють їх від неживої природи.

- *Головними задачами молекулярної біології є:*
 - з'ясування яким чином та в якій мірі ріст і розвиток живих організмів, збереження та передача генетичної інформації зумовлені особливостями структурної організації і властивостями біополімерів клітини;
 - вивчення специфічного молекулярного складу клітин живих організмів, який сформувався у процесі тривалої хімічної (добіологічної) еволюції;
 - дослідження структурної організації геномів представників різних таксономічних груп організмів, а також вірусів і бактеріофагів, їх регуляції та механізмів, які забезпечують захист генетичної інформації і підтримання стабільності геному;
- розкриття механізмів матричного синтезу біополімерів (реплікації, транскрипції, трансляції), які лежать в основі збереження, передачі і реалізації генетичної інформації внаслідок експресії генів.

з'ясування яким чином із комплексу взаємопов'язаних фізико-хімічних процесів, що відбуваються в живих організмах, формується високовпорядкована² біологічна система, здатна до самостійного функціонування (самовідтворення, самооновлення та саморегуляції).

2. Етапи розвитку молекулярної біології

Молекулярна біологія у своєму розвитку пройшла шлях від узагальнення теоретичних надбань багатьох світових наукових шкіл до прикладних розробок, на основі широкого застосування новітніх, сучасних методів дослідження.

Виокремлення молекулярної біології, як важливої галузі знань про живу природу, на межі біохімії, генетики, біології, цитології, вірусології та інших наукових дисциплін, відбулося в 50-х роках минулого століття. Цьому, у значній мірі, сприяли суттєві революційні зміни в біологічній науці, започатковані у другій половині ХХ ст., які не спростували всі попередні наукові надбання та досягнення, а лише розширили, поглибили та вдосконалили їх.

Вперше термін „молекулярна біологія” запропонував У. Уівер (1938 р.), який вказував, що на межі хімії, фізики і біології формується нова галузь знань – *молекулярна біологія*, метою якої є розгадка найглибших таємниць живої матерії.

На початку 40-х років ХХ ст. відомий вчений У. Естбюрі отримав першу рентгенограму ДНК та започаткував вивчення ультраструктури цієї важливої біомолекули, що дало підстави йому називати себе „молекулярним біологом”. Одночасно з цим, до формування молекулярної біології як науки, пройшло ще декілька десятиліть, протягом яких було створено підґрунтя для її розвитку. За цей час було зроблено низку епохальних відкриттів, які дали змогу підійти до розуміння молекулярних аспектів процесів життєдіяльності. Серед них найважливішими є наступні:

- З’ясування сутності трансформуючого фактора Гріффітса, який було відкрито в 1928 році, що дало можливість сформулювати поняття про генетичну роль нуклеїнових кислот. Було встановлено, що носієм генетичної інформації є молекула ДНК (О. Евері, М. Маккарті, К. Маклеод, 1944 р.).
- Встановлення закономірностей чергування чотирьох нуклеотидів пуринового і піримідинового ряду в структурі ДНК (правила Чаргаффа). Це спростувало уявлення про одноманітність та недостатню інформативність первинної структури ДНК у зв’язку з чим, як вважали на той час, вона не може виконувати роль носія генетичної інформації (Е. Чаргафф, 1948 р.).

- Розкриття механізмів інфікування клітин бактерії *E. coli* бактеріофагом Т-4, що підтверджувало генетичну роль нуклеїнових кислот, оскільки, бактеріофаг, при контакті з бактеріальною клітиною, не проникає в її кампартменти, а вводить лише власну нуклеїнову кислоту, яка і є носієм патогенності (А. Херші і М. Чейз, 1952 р.).

Вивчення структурної організації білків: розроблено модель вторинної структури у вигляді α -спіралі та β -форми (Л. Полінг і Р. Корі, 1951 р.).

- Застосування рентгеноструктурного аналізу для вивчення просторової структури ДНК (Л. Уілкінс і Р. Гослінг, 1953 р.).

- Припущення про вторинну структуру ДНК у вигляді подвійної спіралі, що започаткувало уявлення про механізми матричного синтезу біополімерів (Дж. Уотсон і Ф. Крік, 1953 р.).

- З’ясування загальної схеми транскрипції та передачі інформації в напрямку ДНК→РНК (А. Коренберг, 1958 р.).

- Вивчення третинної структури білка міоглобіну, який є резервом кисню в м’язевій тканині (Дж. Кендрю, 1960 р.).

Відкриття посередника передачі генетичної інформації з ядерного апарату клітини до цитоплазми (іРНК) та з’ясування її ролі в забезпеченні видоспецифічного синтезу білка (А. Білозерський і О. Спінрін, 1965 р.).

- Виділення з бактеріальних клітин ферментів рестриктаз, здатних „розрізати” (секвенувати) молекулу РНК на певних ділянках полінуклеотидного ланцюга з утворенням невеликих фрагментів (секвентів),

•

що сприяло вивченню структури генів рестрикційно-лігазним та конекторним методами (Р. Холлі і М. Геллерт, 1965 р.).

- Вивчення четвертинної структури білка гемоглобіну, який входить до складу еритроцитів та забезпечує дихальну функцію крові (М. Перутц, 1966 р.).

Розшифрування генетичного коду – своєрідного „словника” для переведення чотирилітерної абетки нуклеїнових кислот у двадцятилітерну абетку білків, що підтверджувало передачу генетичної інформації у клітині в напрямку ДНК → іРНК → білок та сприяло розкриттю механізмів реалізації цього процесу (М. Ніренберг, С. Очоа, Г. Корана, 1968 р.).

- Вивчення молекулярних аспектів регуляції функціональної активності генів у клітинах про- і еукаріот – індукції і репресії (Ф. Жакобо і Дж. Моно, 1968 р.).

- З’ясування механізмів фрагментарної реплікації на “запізнюючому” ланцюгу ДНК (Р. Оказакі, 1968 р.).

- Розробка стратегії хімічного синтезу генів: синтез гену тРНК^{фен} (Х. Корана, 1970 р.).

- З’ясування механізмів передачі інформації у РНК-геномних вірусів за участю ферменту зворотної транскриптази або ревертази (Г. Темін, Д. Балтимор, 1970 р.).

Отримання рекомбінантних молекул ДНК з використанням специфічних векторів, що стало передумовою формування прикладного напрямку молекулярної біології – генної інженерії (С. Коєн, П. Берг, 1972 р.).

- Встановлення подібності транспозонів, мобільно деспергованих генів та онкогенів провірусів, що дало змогу з’ясувати окремі аспекти онкотрансформації клітин (Г. Темін, 1972 р.).

Застосування рестриктазно-лігазного методу для отримання гібридних молекул ДНК та створення молекулярних векторів (С. Коєн, 1973 р.)

- Розкриття механізмів SOS-репарації, яка забезпечує корегування помилок реплікації ДНК – порушення комплементарності азотистих основ нуклеотидів (М. Рідман, 1974 р.).

- Вивчення первинної структури ДНК на основі РНК-ових копій, отриманих за участю ферментів ДНК-залежних РНК-полімераз (У. Гілберт, 1975 р.).

- Розшифрування первинної структури нуклеїнових кислот та фрагментів генів на основі застосування специфічних хімічних методів (А. Максам, У. Гілберт, 1975 р.).

- Відкриття „мозаїчності” окремих генів у геномі еукаріот та встановлення причин порушення принципу колінійності при передачі генетичної інформації в клітині (відповідності первинної структури ДНК первинній структурі білків) (У. Гілберт, 1976 р.).

Вивчення первинної структури ДНК бактеріофага фХ-174 та відкриття явища перекривання генів – “гени в генах” (Ф. Сенгер, 1977 р.).

- Застосування ензиматичного методу для розшифрування фрагментів генів геному про- і еукаріот (Ф. Сенгер, А. Коулсон, 1979 р.).

-

Відкриття РНК-ферментів (рибозимаз), механізмів аутосплайсінгу та генетичної рекомбінації (Т. Чек, 1981 р.).

- Розкриття сутності посттранскрипційної модифікації первинних транскриптів (різних видів РНК), синтезованих на структурі генів еукаріот (В. Келлер, 1982 р.).

Розробка методу ампліфікації генів, який ґрунтується на полімеразній ланцюговій реакції – ферментативному синтезі *in vitro* фрагментів ДНК на основі первинної структури матриці (К. Ньюліс, 1983 р.).

- Роботи по розшифруванню геному людини, бактеріальних геномів, геномів дріжджів (К. Вентер, Ф. Коллінз, 1984-2005 рр.).

Картування геномів клітин еукаріот – дріжджів, нематоди та плодової мушки дрозофіли (Міжнародна програма HUGO, 1996-2000 рр.).

- Ідентифікація генів, які включають програму апоптозу в нематод та розкриття механізмів запрограмованої смерті клітин (С. Бренер, Г. Хорвіц, Дж. Салстон, 2002 р.).

Відкриття вірусу папіломи людини та вивчення структури генів, що зумовлюють розвиток спадкових захворювань, канцерогенезу і старіння (Х. Хаузен, 2008 р.).

Важливий внесок у розвиток молекулярної біології зроблено працями зарубіжних і вітчизняних вчених: С. Сєверіна, О. Опаріна, В. Енгельгардта, Ю. Овчиннікова, О. Баєва, В. Ковальського, О. Браунштейна (Росія), І. Хеллера (Польща), Л. Ріда, К. Хьорса, Е. Чаргаффа, А. Коренберга, С. Очоа, Дж. Уотсона, Х. Корана, Л. Полінга, А. Ленінджера, Д. Гріна (США), Дж. Кендрю, М. Перутца, Ф. Кріка, Ф. Сенгера (Англія), Р. Оказакі (Японія), Ф. Жакобо, Ж. Моно (Франція), О. Варбурга, Ф. Лінена (Німеччина) та інших.

У наш час, на основі досягнень молекулярної біології, розроблено сучасні методи діагностики і лікування різних метаболічних розладів, спадкових та вірусних захворювань. Широкого застосування набула ДНК-діагностика для встановлення батьківства, ідентифікації особистості (молекулярна дактилоскопія).

Значного розвитку набувають науково-прикладні напрямки молекулярної біології такі як: гenna і клітинна інженерія, біотехнологія, біоінформатика, які відкривають нові перспективи для прогресу біологічної науки ХХІ ст.

Все це, у значній мірі, сприятиме розв'язанню чисельних проблем, що стоять перед людством та створить передумови для подальшого прогресу сучасної біологічної науки.

3. Методи молекулярної біології та їх використання в біотехнології.

Для вивчення живих об'єктів, їх будови, молекулярної архітектури та особливостей надмолекулярної організації окремих складових компонентів клітин і тканин організму застосовують високоспецифічні якісні та кількісні методи дослідження. Ці методи дають змогу отримати цінну інформацію про будову клітин і клітинних органел, з'ясувати локалізацію в клітині різних

•

біомолекул, вивчити особливості їх функціонування.

Фізіологічні методи. В наукових дослідженнях найчастіше використовують гісто- та цитоаналіз, електронну та світлову мікроскопію. Цитологічні та гістохімічні методи ґрунтуються на здатності різних структурних компонентів клітини забарвлюватися специфічними барвниками з наступною ідентифікацією та мікроскопічним вивченням досліджуваних зразків. Так, для виявлення білків, як правило, застосовують Бромфеноловий синій або Амідочорний 10Б, а нуклеїнових кислот – Акридиновий оранжевий, Метиленовий зелений, Піронін, Дифеніламін та ін. За допомогою цих методів можна вивчати локалізацію різних біополімерів у клітині (ДНК, РНК, білків, вуглеводів, ферментів), з'ясувати їх функції та властивості.

Методи мікроскопії дають змогу вивчати ультраструктуру клітин та клітинних органел, транспорт і синтез різних сполук, специфічні закономірності перебігу окремих фаз клітинного циклу, механізми міжклітинної взаємодії. У наукових дослідженнях широкого застосування набули методи світлової мікроскопії, за допомогою яких вивчають будову клітини та клітинних органел. Досить широко використовують такі види світлової мікроскопії: абсорбційна, інтерфераційна, поляризаційна, фазово-контрастна, флуоресцентна. Особливо високоінформативним є метод електронної мікроскопії, який дає можливість вивчати процеси, що відбуваються в різних компартментах клітини (Рис. 1).

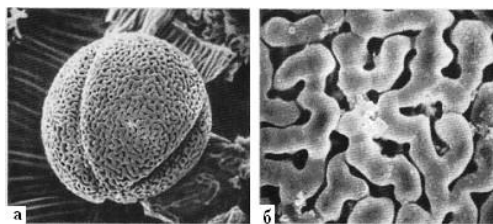


Рис.1. Мікрофотографії біооб'єктів, зроблені за допомогою скануючого електронного мікроскопу (за К. Свенсоном і П. Уебстером)

- **Фізико-хімічні методи.** Ці методи застосовують для вивчення структури біополімерів, їх складу, видів зв'язків між атомами та молекулами, їх довжину та локалізацію. Серед них найпоширенішими є: електронний парамагнітний резонанс, мас-спектрометрія, радіоавтографія, рентгеноструктурний аналіз та ін.

Радіоізотопний метод (радіоавтографія). Метод дає змогу з'ясувати локалізацію процесів синтезу і розкладу біополімерів у клітині, шляхи транспорту різних речовин та йонів, особливості функціонування окремих клітинних органел і біомолекул. Він ґрунтується на включенні радіоізоотопів (^{14}C , ^{32}P , ^3H) у досліджувані об'єкти – мономерні ланки біополімерів (амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти), або різні метаболіти, які зазнають певних перетворень у клітині, та реєструвати їх за допомогою фотоемульсії (Рис. 2). При розпаді радіоізоотопів, β -часточки потрапляють в зону чутливого фотошару і активують в його складі гранули AgBr локалізацію яких, після проявлення та відновлення, визначають за допомогою мікроскопії.

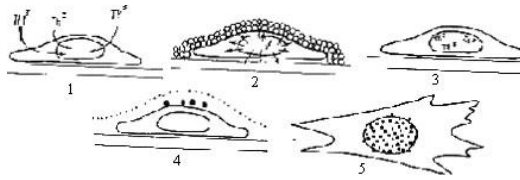


Рис. 2. Введення радіоізоотопів та їх ідентифікація.

Рентгеноструктурний аналіз. Один з високоінформативних методів дослідження, який дає змогу вивчити особливості структурної організації біополімерів, отримати тривимірне зображення молекул та виявити розміщення атомів у їх складі, будову зв'язків, що стабілізують нативну конформацію. Метод ґрунтується на дифракції рентгенівських променів (електромагнітного випромінювання довжиною хвилі 10^{-10} м). При проходженні променів через об'єкт вивчення, вони вступають з ним у певну взаємодію. Це зумовлює збудження атомів та надає кінетичної енергії вибитим електронам, що індукує випромінювання специфічного спектру та появу вторинних ефектів у вигляді ліній, які реєструються спеціальними приладами. Дозволяючи здатність цього методу знаходиться в межах 0,1 нм.

Біохімічні методи. Найпоширенішими серед цих методів є оптичні (фотоелектроколориметрія, спектрофотометрія, нефелометрія, спектрофлуориметрія), хроматографія, електрофорез, седиментаційний аналіз та ін. Біохімічні методи використовують для виділення, розділення та очищення різних сполук, кількісного визначення складових компонентів рідин і тканин організму. Вони дають змогу вивчати окремі аспекти обміну речовин в організмі та особливості функціональної активності різних біосубстратів.

Оптичні методи. Ці методи можуть надати цінну інформацію про кількісний вміст різних метаболітів у рідинах організму, ідентифікувати різні речовини за властивостями, якісним складом та функціями, з'ясувати механізми біохімічних перетворень різних сполук. Вони дають змогу вивчити окремі показники гомеостазу на основі вимірювання зміни інтенсивності гомо- чи гетерохроматичного потоку світлового випромінювання, внаслідок вибіркового поглинання чи розсіювання його речовиною, що знаходиться в розчині. З цією метою, найчастіше застосовують абсорбційну та емісійну фотометрію. На принципі абсорбційної фотометрії ґрунтується колориметрія, спектрофотометрія і нефелометрія. Емісійна фотометрія забезпечує кількісне визначення різних сполук внаслідок вимірювання енергії, яку випромінює досліджуваний об'єкт у збудженому стані (спектрофлуориметрія, полум'яна фотометрія).

Седиментаційний аналіз. Впроваджено в наукові дослідження Т. Сведбергом (1926 р.). Метод ґрунтується на різниці у швидкості седиментації часточок при відцентровому прискоренні, залежно від їх щільності, форми та розмірів. Особливістю методу є те, що для його проведення необхідне отримання гомогенатів тканин чи суспензій клітин, які використовують для вивчення. Застосування седиментаційного аналізу мало важливе значення в дослідженнях по визначенню молекулярної маси біополімерів та вивченню

цілого ряду внутрішньоклітинних процесів. Значного поширення набули різні варіанти седиментаційного аналізу такі, як: препаративне та аналітичне центрифугування, а також центрифугування в градієнті густини. Залежно від способу проведення розрізняють такі види препаративного центрифугування: розподільне (диференційне), зонально-швидкісне та рівноважне (ізопікнічне).

Хроматографія. Високоінформативний метод, який застосовують для розділення складних сумішей речовин невідомого складу та виділення цінних компонентів, ідентифікації сполук, подібних за будовою і властивостями. Метод було відкрито М. Цветом (1903 р.) для вивчення екстрактів зелених листків рослин (фракцій хлорофілу). Існує велика кількість модифікацій цього методу залежно від носіїв, на яких проводять розділення (рідких, твердих і газоподібних), механізму розділення, способу проведення, тощо. Так, *за механізмом розділення* виділяють такі види хроматографії як: адсорбційна, розподільна, дифузна, іонообмінна, афінна. *За видом носіїв* – паперова, колонкова, тонкошарова, молекулярно-ситова. Крім аналітичних цілей, хроматографію, в наш час, широко застосовують в різних галузях народного господарства для розділення і виділення різних сполук.

Електрофорез. Один з найпоширеніших методів розділення та кількісного визначення різних сполук, вивчення їх компонентного складу. Електрофорез ґрунтується на здатності полярних молекул, що несуть певний сумарний заряд, внаслідок протонування чи іонізації функціональних груп у водному середовищі, при певних значеннях рН, рухатися в електричному полі до позитивного чи негативного джерела струму (аноду чи катоду). На електрофоретичну рухливість впливають сила струму, електричний опір, рН буферних систем та іонна сила розчинів. Швидкість руху досліджуваних зразків в електричному полі прямо пропорційна силі струму та електричній напрузі. Метод електрофорезу дає змогу розділити на специфічних носіях різні біомолекули за величиною їх заряду, формою молекул, молекулярною масою та іншими критеріями.

Залежно від виду носія виділяють електрофорез на папері, плівках ацетату целюлози, крохмальному, агаровому та поліакриламідному гелях.

Залежно від способу розділення розрізняють фронтальний електрофорез (метод рухомої межі), зональний (електрофорез на носіях), а також ізоелектрофокусування, ізотахофорез, імуноелектрофорез та інші.

За величиною електричної напруги між електродами електрофорез поділяють на низьковольтний (менше 500В) і високовольтний (більше 500В).

- *Імунологічні методи.*

Імуноелектрофорез. Високоінформативний метод, за допомогою якого проводять виявлення антигенів у складі рідин організму та різних біологічно активних сполук. Він ґрунтується на поєднанні принципів тонкошарового електрофорезу та імунодифузії. Основою методу є реакція преципітації та утворення комплексу антиген/антитіло. Досліджуваний зразок спочатку розділяють електрофорезом на агаровому гелі, після чого у вирізані на поверхні гелю жолобки вносять суміш антитіл. Через певний час проходить дифузія антитіл і антигенів відповідно в латеральному та радіальному

напрямах. Після їх зустрічі відбувається утворення комплексу антиген/антитіло, свідченням чого є поява дуг преципітації, які дають змогу ідентифікувати наявність певних антигенів.

Імуноферментний аналіз (ІФА. Сучасний метод дослідження, який застосовують для ранньої діагностики, так званих, TORCH- інфекцій (токсоплазмозу, цитомегаловірусу, вірусу герпесу, червонички, паразитарних інвазій), проведення тестів на наявність онкомаркерів, контролю за вживанням ліків та наркотичних засобів, діагностики вагітності та ін. Імуноферментний аналіз поєднує високу чутливість імунологічних реакцій та специфічність каталітичної дії ферментів. Антиген, зв'язаний з ферментом у твердій фазі, конкурує з досліджуванним вільним антигеном за специфічні антитіла. Тобто, індикаторами імунологічних реакцій, в цьому випадку, є маркерні ферменти.

Методи молекулярної генетики та генної інженерії.

Розробка цих методів мала важливе значення для становлення та розвитку молекулярної біології, конструювання рекомбінантних ДНК, можливості ампліфікації генів, за допомогою хіміко-ензиматичних методів і полімеразної ланцюгової реакції. Це забезпечило формування специфічних генетичних структур із заздалегідь передбачуваними властивостями та функціями і створило умови для широкого застосування досягнень генної інженерії в різних галузях народного господарства і медицини.

Методи молекулярної генетики та генної інженерії ґрунтуються на специфічних особливостях геному представників різних таксономічних груп живих організмів, а також вірусів і бактеріофагів. Це, в першу чергу, стосується здатності їх до взаємного інтегрування трансформації, а також універсальності генетичного коду, що забезпечує можливість експресії в організмі чужорідних генів. Особливістю цих методів є те, що вони, на відміну від штучного мутагенезу та гібридизації, які застосовують в межах одного виду організму, дають змогу цілеспрямованої зміни структури і функції геномів організмів розділених міжвидовими бар'єрами. Застосування цих методів в наукових дослідженнях сприяло вивченню структури нуклеїнових кислот, ідентифікації та виділенню генів, з'ясуванню їх будови та молекулярних механізмів регуляції, завдяки чому було створено передумови для розвитку сучасних біотехнологій.

Важливим для становлення сучасних біотехнологій було відкриття ферментів рестриктаз та вивчення їх субстратної специфічності, що сприяло детальному вивченню первинної структури ДНК, генів та їх фрагментів за допомогою рестрикційно-лігазного та коннекторного методів. Вказані методи дають змогу проводити не лише фрагментацію генетичних структур та отримувати необхідні гени але і з'єднувати їх з ДНК реципієнтних клітин при формуванні рекомбінантних молекул.

Значного поширення для вивчення структури генів набули методи з використанням плюс/мінус систем. В плюс - системах до кожного з варіантів ДНКових копій додається один з чотирьох видів нуклеотидів, позначених радіоізотопами, а в мінус - системах, кожен з варіантів ДНКових копій не містить одного з чотирьох нуклеотидів. У зв'язку з цим, при застосуванні

даних систем, синтез полінуклеотидних ланцюгів завершується в місцях наявності чи відсутності цих нуклеотидів. Важливе значення для розвитку молекулярної біології, генетики та генної інженерії мало застосування синтезу генів *in vitro* хімічними та ензиматичними методами на основі інформації про чергування залишків амінокислот в структурі певних генних продуктів. Для вивчення специфічного нуклеотидного складу ДНК, зокрема ділянок, що містять тандемні повтори нуклеотидів, використовують блот-гібридизацію (ДНК-фінгерпринтинг). Суть методу в тому, що фрагментовані і розділені методом електрофорезу сайти ДНК переносять на мембранні фільтри (блотінги), які містять зонди з радіоізотопною міткою. Після гібридизації виявляють рестрикційні фрагменти, гомологічні до ДНК зондів. Для синтезу генів широко використовують також фермент зворотню транскриптазу. Цим методом було синтезовано гени глобіну, вірусу віспи та ряду бактеріофагів. Отримання виділених чи синтезованих генів для синтезу необхідних генних продуктів включає ампліфікацію, збільшення їх кількості. З цією метою застосовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). В дослідженнях генної інженерії широко використовують також методи відбору та клонування клітин, що містять рекомбінантні ДНК, експресію їх у різних системах *in vivo* чи *in vitro*. Це дає змогу отримання генних продуктів із заздалегідь передбачуваними властивостями.

Методи клітинної інженерії

Клітинні культури. Один з найпоширеніших сучасних методів, який дає змогу вивчити особливості функціонування клітин *in vitro* в специфічних культуральних середовищах. За допомогою цього методу можна досліджувати морфогенез та диференціювання клітин, вплив на них різних ушкоджуючих чинників (хімічних сполук, різних токсинів, отрут, лікарських препаратів, вірусів, електромагнітних хвиль, радіоактивного випромінювання), проводити певні маніпуляції на рівні клітини (мікрохірургію, ін'єкцію розчинів різних сполук).

Метод культури тканин і органів. Цей метод застосовують для вивчення механізмів клітинного диференціювання, гістогенезу, міжтканинної і міжклітинної взаємодії. На відміну від культури клітин, цей метод дає змогу вивчати особливості функціонування клітин, тканин і органів при збереженні їх нативної структури та функцій. У зв'язку з цим, його широко застосовують для з'ясування закономірностей формування і розвитку зачатків органів у нормі та при експериментально змінених умовах. Важливим напрямком застосування культури тканин і органів рослин є мікроклональне розмноження внаслідок якого отримують генетично ідентичні форми посадкового матеріалу. У вигляді експлантатів використовують генеративні та вегетативні органи рослин.

Технологія мікроклонального розмноження включає кілька етапів: введення вихідної форми в стерильну культуру, мікророзмноження, укорінення та перенесення стерильної культури в ґрунт. Одним з важливих напрямків культури тканин є культивування клітинних суспензій у завислому стані в рідкому живильному середовищі. Використання культури тканин може

забезпечити збереження генетичної інформації (мікроклональне розмноження), зміну цієї інформації внаслідок мутагенезу під впливом фізичних чи хімічних методів (культура кулусів, суспензій, протопластів), перенесення та інтеграцію генетичної інформації (гено-інженерне конструювання та отримання продуктів з цінними якостями, соматична гібридизація).

Метод безклітинних систем. За допомогою безклітинних систем вивчають молекулярні механізми біохімічних процесів, які за цих умов є ізольованими, тому їх перебіг відбувається в нативних умовах без будь-якого зовнішнього впливу та артефактів, що можуть призвести до хибних уявлень і висновків. Використання безклітинних систем з успіхом застосовували при з'ясуванні механізмів білкового синтезу М. Ніренберг і Х. Корана (1966 р.). З цією метою із неочищених клітинних екстрактів, після багаторазового фракціонування, отримували рибосоми, тРНК та інші компоненти білоксинтезуючої системи. Ці компоненти вносили в безклітинне середовище (гомогенати клітин), яке містило відповідні матриці та необхідні сполуки, і вивчали їх роль у перебігу трансляції. За участю безклітинних систем було розшифровано генетичний код. У вигляді матриці, в цьому випадку, використовували штучні гомо- та гетерорибополінуклеотиди відомого складу, що дало можливість з'ясувати будову кодонів іРНК, які відповідають за включення до складу білкових молекул певних амінокислот.