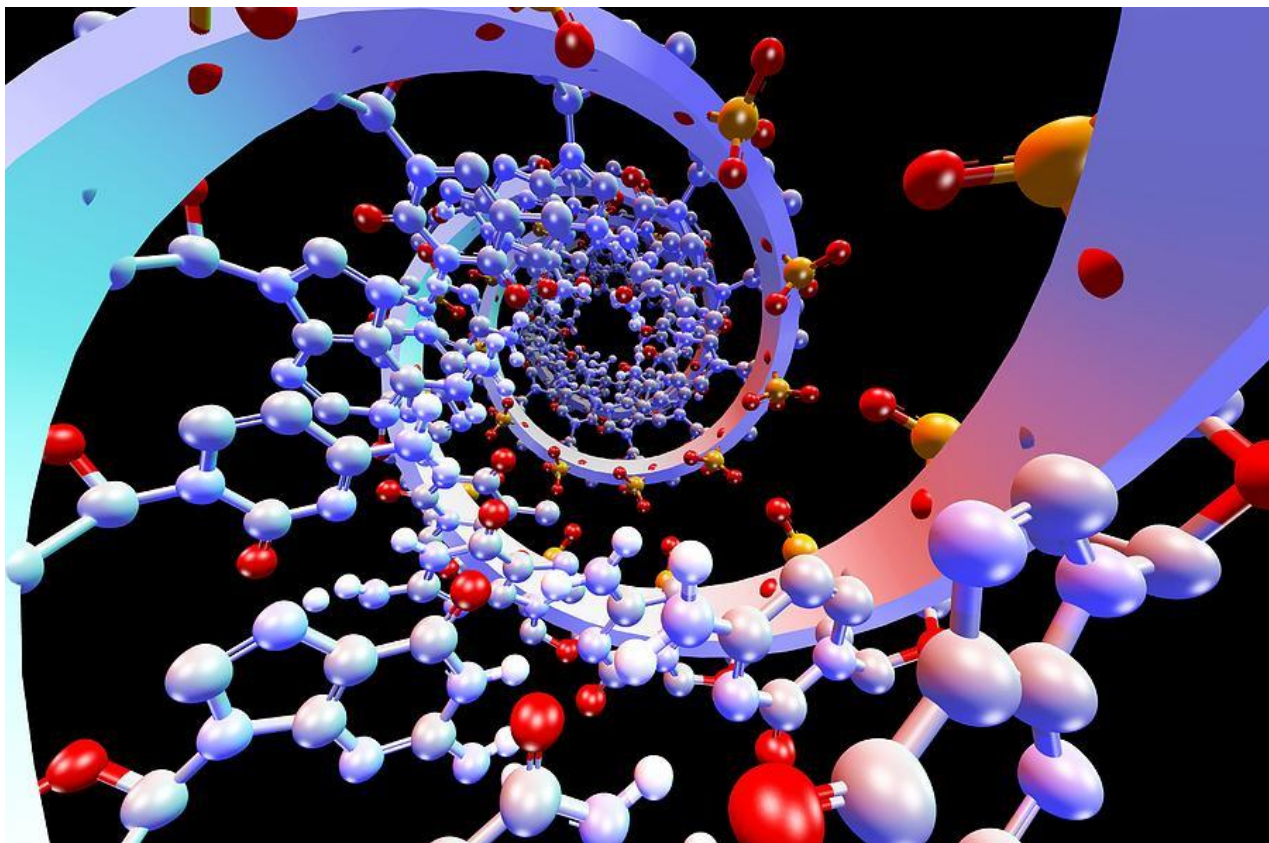


**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ А.А. ЕЖЕВСКОГО**

Факультет биотехнологии и ветеринарной медицины
Кафедра кормления, селекции и частной зоотехнии

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие для студентов специальности 36.03.02.
«Зоотехния»



Молодежный 2021

УДК 573.6.086.83:636
ББК 45.318

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия 99 с.

Авторы:

канд. с.-х. наук, доц. *Сверлова Н.Б.*, канд. с.-х. наук, доц. *Гордеева А.К.*,
канд. с.-х. наук, доц. *Молькова А.А.*, канд. с.-х. наук, доц. *Иволина О.Ю.*
нач. инф.-консультационного отдела ООО Байкальский РИСЦ *Сверлова
М.А.*, аспирант *Кулиева О.В.*

Рецензенты:

доктор с.-х. наук, *Кузнецов А.И.*, с.-х. с.-х., доцент *Хунданова Т.Л.*

Учебно-методическое пособие составлено в соответствии с учебной программой по дисциплине «Основы биотехнологии» для высших с.-х. учебных заведений, содержит методические указания по выполнению практических занятий. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов биотехнологического факультета по специальности по специальности 36.03.02 «Зоотехния» и 36.04.02 «Зоотехния».

Рассмотрено на заседании кафедры кормления, селекции и частной зоотехнии протокол № 2 от 15.02.2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ТЕМА 1. Введение в биотехнологию. Проблемы и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии в.....	6
ТЕМА 2. Применение методов генной инженерии и ДНК-технологий в сельском хозяйстве	10
ТЕМА 3. Клеточная инженерия.....	16
ТЕМА 4. Эмбриогенетическая инженерия. Трансплантация эмбрионов.....	23
ТЕМА 5. Клонированные животные, методы получения и перспективы использования	33
ТЕМА 6. Биотехнология производства антибиотиков и белка.....	34
ТЕМА 7. Биотехнология производства аминокислот, гормонов, витаминов, липидов, ферментов и их применение.....	39
ТЕМА 8. Биотехнология и окружающая среда	42
ТЕМА 9-10 Биотехнология получения биогаза.....	46
ТЕМА 11. Системы GMP, GAP, GLP.....	49
ТЕМА 12. Контроль применения биотехнологических методов.....	59
ТЕМА 13-14. Государственный контроль и госрегулирование в области генно-инженерной деятельности	61
ТЕМА 15. Словарь биотехнологических терминов.....	87
Список рекомендуемой литературы.....	98

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология относится к приоритетным областям биологической науки, достижения которой широко используются во всем мире. Она объединяет прикладные направления в микробиологии, биохимии, технологии производства ферментов, молекулярной генетике, репродукции человека и животных, обеспечивает дальнейшее их развитие. Эффективность селекции и воспроизводства животных, рациональное использование кормовых ресурсов, обеспечение экологически безопасных технологий животноводства во многом определяется успехами биотехнологии.

Главными объектами изучения биотехнологии являются биологические системы и процессы, которые используются в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и ветеринарной медицине, а также половые клетки и эмбрионы животных.

Цель дисциплины: дать студенту теоретические знания о роли генетического конструирования – как современном методе селекции организмов, о сущности биологических систем, процессов и способах их применения в животноводстве.

Основные задачи дисциплины:

- дать теоретические знания о применении ДНК-технологий в животноводстве;
- познакомить студентов с методами клеточной и генной инженерии (культивированием клеток *in vitro* и гибридизацией соматических клеток; выделением генов и конструированием рекомбинантных ДНК, введением генов в бактериальные клетки);
- дать теоретические знания об использовании модифицированных клеток для получения биологически активных веществ и различных продуктов, иммунологических материалов, а также для утилизации отходов животноводческих предприятий и получения экологически чистых энергоносителей в целях охраны окружающей среды;
- обеспечить приобретение студентами практических навыков применения в животноводстве биотехнологических способов селекции.

Выпускник должен знать:

- методы культивирования и модификации клеток, получения рекомбинантных ДНК;
- способы получения трансгенных, клонированных, химерных организмов и перспективы их использования;
- технологию получения биогаза путем переработки растительных

отходов и органического удобрения;

- методы использования стволовых клеток.

Выпускник должен уметь:

- применить на практике методы контроля репродуктивной функции животных и трансплантации эмбрионов;
- рационально использовать, получаемые биотехнологическим путем кормовые белковые, липидные, витаминные, гормональные и ферментные препараты;
- организовать на сельскохозяйственных предприятиях простейшую переработку корма для обогащения белком одноклеточных организмов и использовать другие доступные биотехнологические методы для повышения молочной и мясной продуктивности, а также для защиты окружающей среды.

Тема № 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Вид занятия: практическое

Цель занятия: изучить роль биотехнологии в ускорении научно-технического прогресса, ознакомиться с задачами, основными направлениями и перспективами развития в Республике Беларусь.

Литература: 1, 2

Материальное обеспечение: презентация, учебно-методическое пособие.

Формы и методы контроля: устный опрос и проверка выполненных заданий.

Контрольные вопросы

Понятие о биотехнологии, история ее возникновения и развития.

1. Основные направления и задачи биотехнологии. Связь биотехнологии с другими дисциплинами.
2. Достижения биотехнологии в сельском хозяйстве и ветеринарной медицине.
3. Роль биотехнологии в решении продовольственной проблемы, защите окружающей среды и в ускорении научно-технического прогресса в агропромышленном производстве.
4. Развитие биотехнологии в России

Биотехнология – это отрасль производства, основанная на использовании биологических объектов и систем.

В это понятие включают комплекс производственных процессов, основанных на использовании биокатализаторов, микроорганизмов и различных биологических систем, таких как культуры растительных и животных клеток и тканей, иммунокоррекция, манипуляции с половыми клетками. Биотехнология возникла на основе использования микроорганизмов и биосистем с запрограммированными свойствами, на основе достижений генетической инженерии и инженерной энзимологии.

Основные направления биотехнологии:

1) **Генная инженерия.** Это область молекулярной генетики, которая разрабатывает методы конструирования новых генетических программ.

2) **Клеточная инженерия.** Получение клеток нового типа, гибридная технология, конструирование генетически новых объектов путем клеточной гибридизации и введения чужеродного генетического материала.

3) **Эмбриогенетическая инженерия.** Это активная перестройка генома животных путем вмешательства в их развитие на ранних этапах онтогенеза. Перестройка генома – это реконструкция эмбрионов путем клонирования, слияния или инъекции в их ядра чужеродной ДНК.

Основные направления эмбриогенетической инженерии:

- а) клонирование животных;
- б) получение генетических химер;
- в) получение транс генных животных;

г) трансплантация эмбрионов.

4) *Традиционная биотехнология.* Использование анаэробных процессов для производства вина, силоса, квашения, получение молочнокислых продуктов, спирта и т.д.

5) *Инженерная энзимология.* Применение микробиологических, физико-химических методов для производства ферментов – специфических катализаторов белковой природы.

Биотехнология тесно связана со многими науками:

- биологической и биоорганической химией,
- молекулярной биологией,
- генетикой,
- микробиологией,
- иммунологией,
- физиологией животных и человека,
- цитологией и др.

Задание 1. Изучить перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием:



Рисунок 1- Перспективные направления биотехнологии в снабжении человечества продовольствием

Задание 2. Указать области научной деятельности, влияющие на развитие биотехнологии:

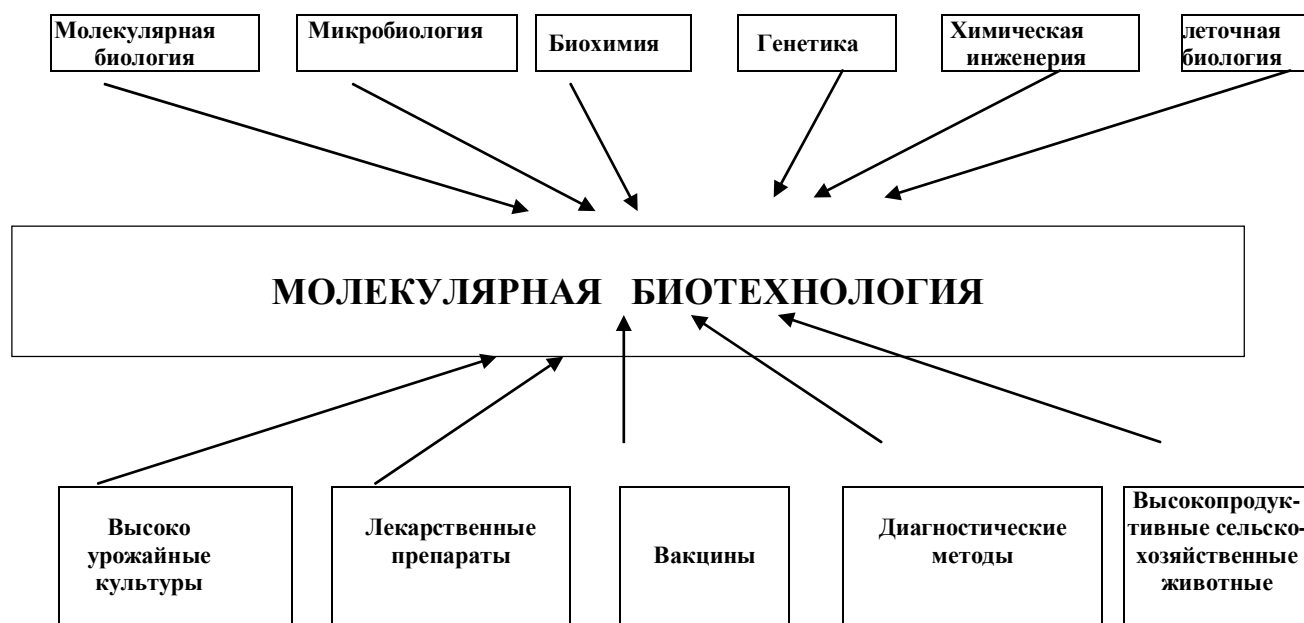


Рисунок 2 – Схема использования в биотехнологии достижений различных областей науки

Задание 3. Изучить классификацию биотехнологического производства.

Важный признак классификации — область применения биотехнологических процессов и продуктов, получаемых биотехнологическим способом.

Классификация биотехнологических производств:

1. Производства, осуществляющие процессы переработки продуктов питания и сельскохозяйственного сырья, в которых не производится выращивание больших масс микроорганизмов или извлечение продуктов метаболизма (хлебопечение, производство сыра, напитков, силосование кормов и т.д.). Микроорганизмы используются в небольшом количестве лишь на одной из стадий технологического процесса. Использование специфического технологического оборудования, связанного с применением микроорганизмов, имеет небольшой удельный вес, и усовершенствование технологии идет в основном за счет оборудования, не относящегося к биотехнологии.

2. Бродильные производства, с помощью которых получают некоторые органические кислоты, растворители и энергетическое сырье (спирт, ацетон, бутанол и так далее). Спецификой этих производств является то, что микроорганизмы можно культивировать в нестерильных условиях, поскольку температурный фактор или наличие спирта, сахара, кислот и других компонентов сред или продуктов метаболизма микроорганизмов ограничивают рост посторонней микрофлоры.

3. Биотехнологические производства со специальным оборудованием и технологией, в которых микроорганизмы используются в производственных условиях для обработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, очистки воды, почвы от загрязнений.

4. Производства, осуществляющие получение в промышленных условиях биомассы для кормовых и технологических целей. Процессы происходят в нестерильных условиях, но требуют специфического оборудования в зависимости от сырья.

5. Производства, занимающиеся получением микробной и клеточной биомассы в асептических условиях для растениеводства, пищевых целей (бактериальные удобрения и пестициды, пищевой белок). Эти производства отличаются сложностью аппаратного оформления процессов выращивания и очистки, что оправдывает выделение их в самостоятельную группу.

Следует отметить, что имеется тенденция получать белок одноклеточных для кормовых целей также в стерильных условиях. В этом случае группы производств пунктов 4 и 5 в будущем сольются.

6. Получение для нужд промышленности, сельского хозяйства и медицины микробных метаболитов сложной органической структуры, большинство из которых обладают физиологической активностью (антибиотики, витамины, ферменты, кровезаменители, некоторые полимеры, аминокислоты, полисахариды и т. п.). Эти производства осуществляются в асептических условиях выращивания. Их особенностью является необходимость специального сложного оборудования и технологии для выделения и очистки целевого продукта.

7. Производства по использованию иммобилизованных ферментов и клеточных систем.

8. Производства, занимающиеся трансформацией органических веществ (получение стерео селективных сложных органических молекул).

9. Культивирование клеток многоклеточных организмов. Производство моноклональных антител (иммунная биотехнология). Клональное размножение важнейших сельскохозяйственных растений с помощью культур клеток и тканей, методов клеточной селекции, получение гаплоидов и гибридизация соматических клеток для создания исходных форм и сортов; оздоровление посадочного материала.

10. Производства по применению микробиологических процессов в традиционно небиологических областях техники, например для выщелачивания металлов, удаления метана из шахт, обогащения руд, повышения нефтеотдачи пластов и т. д.

11. Применение методов генетической инженерии для получения новых микроорганизмов и клеток с заданными свойствами.

12. В перспективе – конструирование пород животных и сортов растений. Протеоинженерия.

Задание 4. Изучить основные области применения биотехнологии:



Рисунок 3 – Основные области применения биотехнологии

Тема № 2. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ И ДНК ТЕХНОЛОГИЙ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Вид занятия: практическое

Цель занятия: изучить основные задачи генной инженерии, ее связь с другими науками, узнать основные способы получения генов. Ознакомиться с технологией получения рекомбинантной молекулы ДНК.

Литература: 1,4,5,

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие, схемы получения рекомбинантной ДНК, видеофильм по генной инженерии,

Контрольные вопросы

1. Понятие о генной инженерии, история развития.

Основные направления и задачи генной инженерии на современном

этапе.

2. Получение генов. Химический и ферментативный синтез. Выделение генов с помощью ферментов рестрикции и трансдуцирующих фагов.
3. Рестриктазы и их значение.
4. Рекомбинантная ДНК. Векторы и их использование для переноса генетического материала.
5. Метод электрофорезного анализа ДНК в агаровом геле и метод блот-гибридизации ДНК по Саузерну. Секвенирование ДНК. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее применение в практике.
6. Методы введения генов в бактериальные клетки. Экспрессия чужеродных генов.
7. Способы получения генов.
8. Конструирование рекомбинантной ДНК (ферментативный синтез).
10. Самостоятельная подготовка студентов (сообщения по теме).

Генетическая инженерия – это конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК) и наследственно измененных организмов.

Генную инженерию используют для изучения структуры, функций и регуляции генов, также для изучения структуры хромосом. Датой возникновения генной инженерии считается 1972 год, когда в США ученый П. Берг с сотрудниками создали первую рекомбинантную молекулу ДНК, состоящую из фрагмента обезьяньего вируса SV-40 и бактериофага с галактозным опероном *E. coli*.

Области применения генной инженерии на современном этапе.

- получение генноинженерных вакцин;
- получение искусственных белков с заданными свойствами;
- получение гормонов, ферментов;
- диагностика и лечение заболеваний.

Способы получения генов:

- 1) выделение генов из ДНК;
- 2) химико-ферментативный синтез;
- 3) ферментативный синтез.

Рестриктазы и их значение

Рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктазы) – это ферменты, способные разрезать молекулу ДНК в строго определенных местах с образованием липких концов.

Рестриктазы были открыты в 1968 году.

Например, рестриктаза *E. coli* под названием *EcoRI* узнает последовательность и разрезает ее на участках, помеченных стрелками. В результате, кольцевая молекула ДНК станет линейной. По краям молекулы образуются липкие концы, с одной стороны ААТТ, с другой – ТТАА. При наличии липких концов, молекула ДНК может опять замкнуться в кольцо.

-- Г ↓ ААТТ Ц --

--Ц ТТАА ↑ Г --

Рестриктазы могут узнавать различные последовательности нуклеотидов. Рестриктаза *E. coli* под названием EcoRI узнает последовательность ЦЦГГ. Соединение разрывов цепей ДНК после обработки рестриктазами производится ферментом *лигазой*.

Векторы и их использование для переноса генетического материала

Вектор – это молекулы ДНК, которые способны переносить чужеродные гены и обеспечивать их репликацию в клетке – хозяине.

Типы векторов: векторы для клонирования;

- 1) экспрессионные векторы;
- 2) векторы для трансформации.

Общие свойства вектора:

- 1) иметь свойство репликаона.
- 2) содержать сайты рестрикции, т.е. участки узнавания для рестриктаз.

При этом места разрезания и введения другой ДНК не должны влиять на репликацию вектора.

3) иметь один или несколько маркирующих генов, по которым его можно обнаружить.

4) содержать специфические для данной клетки промоторы и терминаторы транскрипции.

Методы введения генов в бактериальные клетки:

- 1) трансформация;
- 2) трансфекция;
- 3) трансдукция.

Метод электрофорезного анализа ДНК в агаровом геле

Принцип метода:

- 1) ДНК обрабатывают рестриктазами и помещают в лунки застывшего агарового геля, который затем помещается в камеру для электрофореза.
- 2) под действием электрического поля фрагменты ДНК начинают перемещаться в геле, скорость их перемещения зависит от длины фрагмента. Короткие фрагменты движутся быстрее, при этом цепочки ДНК различной длины отделяются друг от друга, но не повреждаются.
- 3) после электрофореза гель окрашивают красителем *этидиум бромидом*, который связывается с ДНК.
- 4) гель помещают под ультрафиолетовый свет и на нем хорошо видны окрашенные в красный цвет светящиеся фракции ДНК.

В результате электрофорез позволяет разделить, а затем извлечь любые фрагменты ДНК в чистом виде.

Секвенирование ДНК

Секвенирование — это определение последовательности нуклеотидов в фрагменте ДНК. В результате секвенирования определяется также аминокислотная последовательность белка в соответствии с нуклеотидной последовательностью в соответствующем гене.

Используются 2 метода:

- 1) химическое секвенирование;
- 2) ферментативное секвенирование путем терминации цепи.

Полимеразная цепная реакция – современный метод молекулярной биологии. Этот метод разработан Кэри Мюллисом (Нобелевская премия в 1993 году). Использование ПЦР позволяет *амплифицировать* (размножить) ДНК или ее фрагменты *in vitro*, увеличивая число копий в миллионы раз за несколько часов.

Полимеразно-цепная реакция протекает в 3 стадии:

1. *Денатурация*. Смесь, в которой содержится ДНК, нагревают до t^0 90^0 С. В течение 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК и образуется 2 одноцепочечных ДНК из одной двух цепочечной.

2. *Гибридизация праймеров*. Температуру снижают до 50^0 С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами в течение 30 секунд.

3. *Полимеризация*. Смесь с ДНК нагревают до температуры 70^0 С. При этом Tag - полимеразы удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Процесс протекает 90 секунд и в результате количество ДНК удваивается.

4. Tag-полимераза был выделен из термофильных бактерий и отличается устойчивостью к высоким температурам. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК возрастает в 10^6 раз. ПЦР - реакция происходит в специальном приборе-амплификаторе.

Этот метод позволяет получать точные данные по структуре генов и фрагментов ДНК при наличии минимального количества материала, используется для диагностики наследственных болезней человека, при дактилоскопии и идентификации индивидуумов, для направленного получения мутаций.

Рекомбинантные ДНК – это искусственно созданные молекулы ДНК, включающие ген и вектор.

Ферментативный способ получения рекомбинантной ДНК

Система для ферментативного синтеза генов представляет собой раствор, в котором содержатся все 4 нуклеотида, ионы магния, фермент обратная транскриптаза и матричная РНК, на которой будет синтезироваться ДНК.

Для конструирования рекомбинантной ДНК необходим ряд ферментов:

- 1) рестриктонные эндонуклеазы – находят и разрезают молекулы ДНК в сайтах с определенными последовательностями, которые узнает только определенная рестриктаза;
- 2) обратная транскриптаза (ревертаза), которая осуществляет синтез ДНК на матрице РНК;
- 3) ДНК – полимеразы – катализируют синтез ДНК на матрице ДНК;
- 4) ДНК – лигаза – склеивает молекулы ДНК, образуя связи между дезоксирибофос-фатами нуклеотидов;
- 5) терминальная трансфераза – досинтезирует к концам двойной спирали ДНК пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды;

6) эндонуклеаза фага – отщепляет одностранные концы 3' - конца двойной спирали ДНК;

7) нуклеаза – сокращает двойную спираль ДНК с обоих концов.

Полученный ген не содержит интронов, промоторов и других элементов, регулирующих генную активность.

Такие гены подключаются к промоторам прокариот и экспрессируются в прокариотах. Для введения рекомбинантной ДНК в клетку, клетка должна быть компетентной, компетентности можно добиться при использовании CaCl_2 и теплового удара.

Для облегчения проникновения ДНК в клетку бактерий, их обрабатывают лизоцимом, который гидролизует мукопептиды, входящие в состав клеточной стенки бактерий.

Клетки эукариот обрабатывают ферментами, которые разрушают полисахариды оболочки.

Также для облегчения проникновения ДНК в клетку эукариот, используют диэтиламиноэтилдекстран и полиэтиленгликоль.

Клетки дрожжей обрабатывают солями лития или электроимпульсами.

Задание 1. Записать и дополнить таблицу 1:

Таблица 1 – Некоторые рестриктазы, образующие фрагменты с липкими концами

<i>Фермент</i>	<i>Узнаваемый участок (5'...3')</i>	<i>Могут соединяться с фрагментами, образованными</i>
Ava I	Ц↓(Пу) ЦГ (Пи)Г	Sal I Xho I Xma I
Bam HI	Г↓ГАТЦЦ	Bgl II Mbo I
Bgl II	А↓ГАТЦТ	Bam HI Mbo I
Eco RI	Г↓ААТТЦ	
Eco RII	↓ЦЦАГГ	
Eco RI*	↓ААТТ	Eco RI
Hpa II		Tag I
Sal		Ava I Xho I
Tag I		Hpa II
Xho I		Ava I Sal I
Xma I		Ava I

Задание 2. Изучить историю развития биотехнологии:

Таблица 2 – История развития биотехнологии

ДАТА	СОБЫТИЕ
1917	Карл Эреки ввел термин «биотехнология».
1943	Произведен пенициллин в промышленном масштабе.
1944	Эвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что генетический материал представлен ДНК.
1953	Уотсон и Крик определили структуру молекулы ДНК.
1961	Учрежден журнал «Biotechnology and Bioengineering».
1961-1966	Расшифрован генетический код.
1970	Выделена первая рестриктирующая эндонуклеаза.
1972	Корана и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК.
1973	Бойер и Коэн положили начало технологии рекомбинантных ДНК.
1975	Келер и Мильштейн описали получение моноклональных антител.
1976	Изданы первые руководства, регламентирующие работы с рекомбинантными ДНК.
1976	Разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК
1978	Фирма Genentech выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью <i>E. coli</i> .
1982	Разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК.
1983	Для трансформации растений применены гибридные Ti-плазмиды.
1988	Создан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).
1990	В США утвержден план испытаний генной терапии с использованием соматических клеток человека.
1994-1995	Опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека.
1996	Ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд. дол.
1997	Клонировано первое млекопитающее из дифференцированной соматической клетки.

Задание 4. Зарисовать схему получения рекомбинантной ДНК:

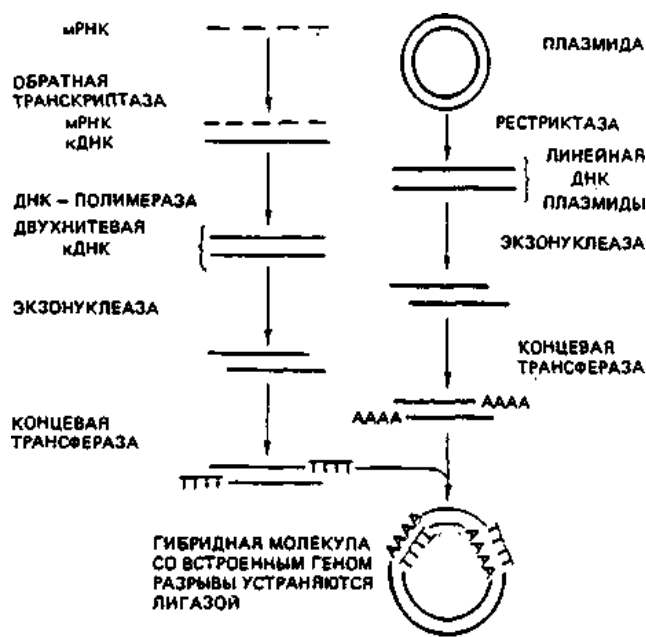


Рисунок 1 – Ферментативный синтез гена и встраивание его в векторную плазмиду

Задание 5. Получить ген молекулы белка, состоящего из последовательности аминокислот (по индивидуальным заданиям).

Задание 6. Найти рестриктазу из таблицы, которая может разрезать молекулу ДНК в определенной точке (по индивидуальным заданиям).

Задание 7. Указать на каком участке молекулы ДНК данная рестриктаза произведет разрыв (по индивидуальным заданиям).

Задание 8. Разрезать плазмиду для получения линейной формы с липкими концами (по индивидуальным заданиям).

Задание 9. Просмотр и обсуждение видеофильма по генной инженерии.

Тема № 3. КЛЕТочная ИНЖЕНЕРИЯ

Вид занятия: практическое.

Цель занятия: усвоить методы культивирования и гибридизации клеток, способы получения гибридом.

Литература: 1, 2, 4

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы

1. История развития и области применения клеточной инженерии.
2. Понятие о культуре клеток. Подбор и селекция продуцентов.
3. Сущность гибридизации соматических клеток эукариот.

4. Использование соматической гибридизации для картирования хромосом.
5. Технология получения гибридом.
6. Использование моноклональных антител.
7. Стволовые клетки и их применение.
8. Самостоятельная работа студентов (сообщения по теме).

Клеточная инженерия – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Культуры клеток, приготовленные непосредственно из тканей организма, называются *первичными*. Клетки первичной культуры можно переносить на новые питательные среды и получить *вторичные*, которые можно длительное время перевивать. Клетки на питательных средах сохраняют свойства тех тканей, из которых были получены.

Клетки человека и животных выращивают на специальных средах в виде суспензии или монослоя на стекле. Культивирование проводят при t^0 37⁰С и рН 6,8-7,5. Клетки растений можно культивировать на жидких и твердых питательных средах.

Требованиям к микроорганизмам:

- 1) расти на дешёвых и доступных субстратах;
- 2) обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокую продуктивность целевого продукта при экономичном потреблении питательного субстрата;
- 3) Проявлять направленную биосинтетическую активность при минимальном образовании побочных продуктов;
- 4) быть генетически однородными;
- 5) быть устойчивыми к посторонней микрофлоре;
- 6) быть безвредными (не обладать патогенными свойствами) для людей и окружающей среды;
- 7) целевой продукт биосинтеза должен иметь экономическую и народнохозяйственную ценность и легко выделяться из сброженного субстрата.

В настоящее время в промышленности применяют *три вида штаммов*:

- 1) природные штаммы;
- 2) штаммы, изменённые в результате индуцированных мутаций;
- 3) штаммы, полученные методами генной или клеточной инженерии.

Практическое применение культуры клеток животных

- 1) используются в научно-исследовательской работе;
- 2) для получения вирусных препаратов;
- 3) для создания материала клеток при трансплантации;
- 4) для синтеза физиологически активных веществ;
- 5) для получения иммунорегулирующих, неспецифических активных веществ, медицинских препаратов.
- 6) для изучения токсичности препаратов, применяемых в медицине, ветеринарии и биологических исследованиях.

Соматическая гибридизация - это направление клеточной инженерии, которое занимается слиянием лишенных оболочек соматических клеток и

получением гибридных клеток с хромосомными наборами неродственных видов.

Практическое применение:

- 1) построение карт хромосом;
- 2) получение моноклональных антител на основе гибридной технологии и их использование.

Гибридомы – это гибридные клетки между нормальным лимфоцитом и клеткой опухоли, способные производить моноклональные антитела.

Этапы получения гибридом на основе иммунизированных лимфоцитов и миеломных клеток:

- 1) получение миеломных клеток, погибающих при последующей селекции гибридных клеток;
- 2) получение лимфоцитов, которые продуцируют антитела к заданным антигенам. Для этого животное иммунизируют введением определенного антигена, потом выделяют клетки селезенки и от них отделяют лимфоциты;
- 3) проводят слияние миеломных клеток с лимфоцитами при помощи полиэтиленгликоля, вируса Сендай, лизолецитина и электрического импульса;
- 4) скрининг (селективный отбор) гибридных (гибридомных) клеток;
- 5) проверка способности гибридомных клеток продуцировать моноклональные антитела к заданному антигену;
- 6) клонирование гибридных клеток, которые проверены на образование моноклональных антител и контроль их иммунных свойств;
- 7) получение массовых культур гибридомных клеток.

Размножение клонов гибридомных клеток происходит *in vitro* до необходимых объемов и служит источником получения антител. Гибридомные клетки из культуры можно выращивать и в организме животного – мыши или крысы. Гибридомные клетки вводят животным, из них через 10 – 14 суток вырастают опухоли, у животного берут сыворотку, которая содержит высокие концентрации моноклональных антител.

Стволовые клетки

Стволовые клетки – популяция клеток-предшественников, обладающих высоким пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке в клетки обычно нескольких линий: в организме – в любые клетки данного органа, в эмбрионе – в любую клетку организма.

Они могут превращаться в один из 350 возможных типов клеток тканей. При этом они не входят в какую-либо тканевую структуру и сами непосредственно не выполняют каких-либо функций, а хранятся в состоянии покоя в специальных нишах до востребования.

Стволовые клетки - это незрелые клетки живых организмов, каждая из которых способна дифференцироваться. К ним относятся плюрипотентные (*омнипотентные*) и *мультипотентные* (бластные) стволовые клетки. Конечными элементами являются зрелые *юнипотентные* клетки тканей организма.

Когда происходит созревание стволовых клеток, то они проходят несколько стадий. В результате, в организме имеется ряд популяций стволовых клеток различной степени зрелости. В нормальном состоянии, чем

Стволовые клетки можно выделять и выращивать в питательной среде свойственной для данной ткани органа. Способность давать множество разнообразных клеточных типов (плюрипотентность) делает стволовые клетки важнейшим восстановительным резервом в организме, который используется для замещения удаленных в процессе операции пораженных участков органов искусственно выращенными.

Стволовые клетки применяются для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний, используются в генной и клеточной инженерии.

Обнаружить стволовые клетки можно по определению специфических белков, с помощью иммуно гистохимического метода. На каждый белок получают антитела, которые метят флюоресцирующим красителем. Такой реагент выявляет белки, присутствующие в стволовых клетках на разных стадиях развития.

Задание 1. Переписать определения терминов, используемых при культивировании.

Перечень основных терминов, которые используются при культивировании растительных и животных клеток:

Время генерации клетки – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Время удвоения популяции – интервал времени, за который число клеток в популяциях увеличивается вдвое.

Дедифференциация – переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

Дифференциация – комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Дифференцировка – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Изолированный протопласт – растительная клетка, лишенная клеточной стенки спомощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Инокулюм (трансплант) – часть суспензионной (каллусной) культуры, исполь-зуемая для пересадки в свежую среду.

Каллус – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

Клеточная селекция – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон – культура, возникшая из одной клетки.

Культура каллусных тканей — выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов (пыльники, семяпочки и т. д.) растений.

Культивирование изолированных протопластов — выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок у изолированных протопластов культура превращается в культуру клеток.

Культура клеток (суспензионная культура) — выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Культура опухолевых тканей — выращивание в длительной культуре сегментов, изолированных из растительных опухолей разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

Культура отдельных клеток — выращивание одиночных клеток при низкой плотности посева: 1) на очень богатых питательных средах, 2) с помощью культуры «няньки» или питающего слоя.

Культура эксплантов — инкубация в стерильных условиях на питательных средах, либо вызывающих, либо не вызывающих пролиферацию сегментов, изолированных из разных органов растений.

Линия — культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Популяция клеток — совокупность культивируемых клеток.

Редифференциация — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Ростовой цикл — рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризуется S-образной кривой. Фазы ростового цикла: латентная, экспоненциальная, замедления роста, стационарная, деградации.

Слияние изолированных протопластов — формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Соматональные вариации и варианты — фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных геномов растительных клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменение в структуре генов, хромосом, геномов).

Соматическая (парасексуальная) гибридизация — система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению соматических гибридов-растений и гибридных клеточных линий.

Субкультивирование – перенос клеток в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Тотипотентность – свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т. е. реализовать тотипотентность ядра с образованием целого организма.

Цикл выращивания – период от помещения инокулята или трансплантата в свежую среду до последующего субкультивирования.

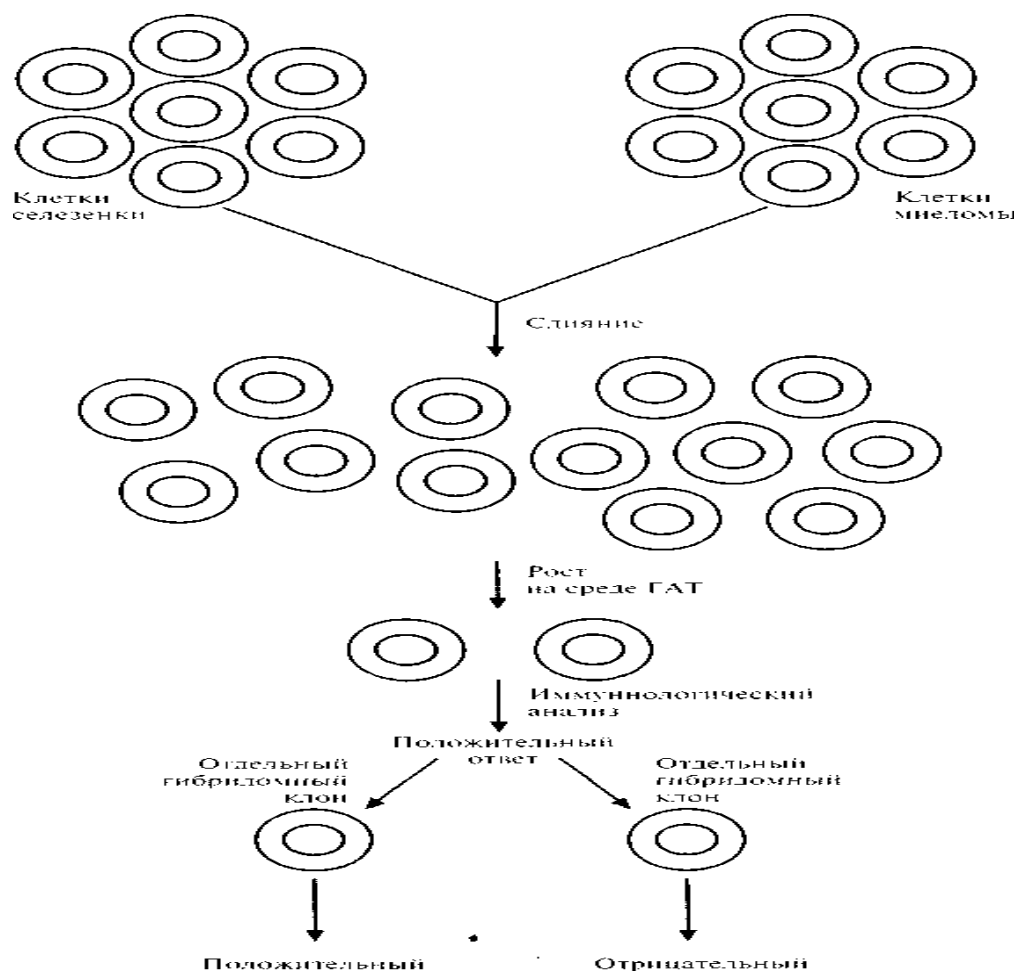
Штамм – культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

Эксплант – фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

In vitro – выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

Задание 2. На основании схемы получения гибридом записать основные этапы их получения:

Рисунок 1 – Схема получения гибридом



Задание 3. Изучить для чего используют моноклональные антитела.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ:

- совершенствование диагностики инфекционных, аутоиммунных,

аллергических, врожденных и других заболеваний;

- изучение эпидемиологии заболеваний;
- усовершенствование вакцин;
- раскрытие механизма дифференцировки тканей;
- изучение патогенеза и иммунологии заболеваний;
- расшифровка механизма иммунного ответа;
- лечение инфекционных и онкологических заболеваний;
- определение пола у крупного рогатого скота.

С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ МОЖНО ВЫЯВИТЬ:

- полипептидные гормоны (гонадотропин, роста, лютеинизирующий, ФСГ, тиреотропный, пролактин);
- маркеры опухоли (канцероэмбриональный антиген, специфический антиген предстательной железы, рецептор интерлейкина-2);
- цитокины (интерлейкины 1-8, колониестимулирующий фактор);
- лекарственные препараты (теофиллин, гентамицин, циклоспорин);
- различные соединения (тиротоксин, витамин В₁₂, ферритин, продукты распада фибрина, ТАУ-белок);
- инфекционные заболевания (хламидиоз, герпес, краснуха, гепатит В, легионеллез, СПИД).

Задание 4. Изучить микроорганизмы и получаемые от них продукты:

Таблица 1 – Микроорганизмы и получаемые от них продукты

Продуце нт	Продукт
<u>Дрожжи</u>	
Saccharomyces cerevisiae	Этанол, глицерин
Kluveromyces fragilis	Этанол
Kl. lactis	Этанол
Schizosaccharomyces pombe	Этанол
Candida lipolytica	Лимонная, изолимонная, пировиноградная кислоты
<u>Бактерии</u>	
Clostridium acetobutylicum	Ацетон, бутанол
Cl. thermohydrosulfuricum	Этанол, уксусная, молочная кислоты
Cl. thermosaccharoliticum	Глюкоза, ксилоза, этанол, уксусная кислота
Cl. auranticum	Изопропандиол
Cl. thermoacticum	Уксусная кислота
Cl. propionicum	Пропионовая, акриловая кислоты
Xanthomonas campestris	Полисахариды
Thermoanaerobacter ethanolicus	Этанол, уксусная, молочная кислоты
Dunaliella sp.	Глицерин
Aerobacter aerogenes	2, 3 – бутандиол
Bacillus polymyxa	2, 3 – бутандиол
Lactobacillus delbrueckii	Молочная кислота
Acetobacter aceti	Уксусная кислота
<u>Микромицеты (плесневые грибы)</u>	
Aspeligillus niger	Лимонная, щавелевая кислоты
Penicillium chrysogenum	Пенициллин
As. oryzae	Ферментные препараты (амилаза)
As. awamori	Ферментные препараты (пектиназа)
Yarrowia lipolitica	Ферментные препараты (липаза)

Тема № 4. ЭМБРИОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ

Вид занятия: лекция

Цель занятия: изучить методы трансплантации эмбрионов, способы их оценки и криоконсервации.

Литература: 1, 4, 5

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы

1. Понятие о трансплантации эмбрионов. Влияние трансплантации эмбрионов на генетический прогресс в популяции.
2. Технология трансплантации эмбрионов.
3. Методы извлечения эмбрионов, их эффективность. Среды для извлечения эмбрионов.
4. Оценка качества эмбрионов.
5. Методы криоконсервации эмбрионов.
6. Экстракорпоральное оплодотворение.
7. Капацитация сперматозоидов.
8. Организация работ по трансплантации эмбрионов в Беларуси.

Трансплантация эмбрионов – это биотехнологический метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных путем получения и переноса одного или нескольких эмбрионов от высокоценных животных (доноров) менее ценным животным (реципиентам).

Этот метод позволяет получить от выдающихся по продуктивности животных больше потомства.

Роль трансплантации в селекции животных:

- 1) сохранение редких видов животных;
- 2) возможность длительного хранения замороженных эмбрионов;
- 3) предотвращение передачи некоторых заболеваний (лейкоз).

Оценка качества эмбрионов.

1. Визуальная морфологическая оценка.
2. Прижизненное окрашивание.
3. Культивирование вне организма.
4. Цитологическая и цитогенетическая оценка.

По морфологическим особенностям все эмбрионы подразделяются на 5 классов: отличные, хорошие, удовлетворительные, условно пригодные и непригодные.

Микроскопическая оценка качества эмбрионов

Оценивают их качество на основании определения стадии их развития, состояния оболочек и внутренних структур. Биологически полноценными приняты считать такие эмбрионы, которые имеют:

- 1) правильную шарообразную форму;
- 2) гомогенную светлую цитоплазму;
- 3) неповрежденную прозрачную оболочку;

4) одинакового размера бластомеры с плотным межклеточным контактом.

5) они должны соответствовать по уровню дробления возрасту от момента оплодотворения до их извлечения.

При оценке эмбрионов соблюдают следующую последовательность:

1. После процедуры промывания рогов матки коровы-донора мерные бутылки с полученной жидкостью передают через окно-шлюз в стерильный бокс.

2. Осаждение эмбрионов производится в течение 20 минут в термостате при 37° С

3. Верхнюю часть жидкости из каждой емкости удаляют с помощью сифона, оставляя 50-100 мл.

4. Отстой переносят в 2-3 пластмассовые чашки Петри, дно которых для удобства подсчета эмбрионов расчерчено на квадраты 0,8 × 0,8 см.

5. Под микроскопом при 15-20-ти кратном увеличении находят эмбрионы и шприцем, емкостью на 1 см³ (через присоединенную к нему укороченную пайету), переносят на малое часовое стекло в 1мл солевого раствора Дюльбекко для кратковременного хранения и морфологической оценки при увеличении в 100 раз.

Выявляют неоплодотворенные яйцеклетки, без признаков развития и с дегенеративными изменениями оболочки или цитоплазмы.

Дегенерированные яйцеклетки имеют сморщенную, неправильной формы цитоплазму. Нередко наблюдается разрушение цитоплазмы, растягивание, разрыв или расслоение прозрачной оболочки.

Непригодными к трансплантации являются эмбрионы, резко отстающие от нормального развития, с выраженным асинхронным дроблением бластомеров, с явлениями их дегенерации. Зародыши со значительными разрывами, расслоениями прозрачной оболочки для трансплантации непригодны.

Условно пригодными к пересадке можно считать эмбрионы с небольшими морфологическими изменениями:

- 1) с невыраженной неравномерностью дробления бластомеров;
- 2) небольшим их сжатием;
- 3) с включениями в перивителлиновом пространстве;
- 4) с нарушениями прозрачной оболочки.

Бластоцисты с небольшим сжатием бластополости и незначительными деформациями прозрачной оболочки условно пригодны для трансплантации. После криоконсервации оценка эмбрионов затруднена, так как процесс глубокого замораживания и оттаивания накладывает специфический отпечаток на морфологические структуры эмбрионов. Для трансплантации допускаются половые клетки со сжатием бластополости или с небольшими дефектами (трещинами) прозрачной оболочки, с включениями в перивителлиновом пространстве, отдельно располагающимися бластомерами, незначительными разрывами между клетками.

Практическое значение длительной низкотемпературной консервации правила транспортировки

Применение метода глубокого замораживания эмбрионов в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ имеет большое практическое значение. Он позволяет:

- 1) длительное время сохранять ценный генетический материал;
- 2) проводить пересадку их реципиентам в любое удобное время в спонтанную охоту;
- 3) исключить необходимость постоянного содержания в стаде животных - реципиентов;
- 4) значительно упростить экспорт и импорт эмбрионов;
- 5) становится возможным сохранить генофонд редчайших и исчезающих пород животных.

Преимущества транспортировки и дальнейшего использования замороженных эмбрионов заключается в следующем:

- 1) это легко осуществляемое мероприятие;
- 2) нет риска переноса инфекционных и других болезней с генно-клеточным материалом из одной страны в другую;
- 3) значительно снижаются расходы, связанные с карантином по сравнению с закупкой животных за рубежом;
- 4) стоимость эмбриона и процедура его пересадки реципиенту в стране – импортере значительно дешевле по сравнению с торговлей животными.

Основные требования при организации перевозки эмбрионов

Потребность в закупке эмбрионов определяет отдел по племенному делу в животноводстве Минсельхозпрода РФ.

1. Ввоз импортированных эмбрионов на внутрихозяйственные пункты по трансплантации допускается только с разрешения Главного управления ветеринарии Минсельхоз. Требуется предоставление ветеринарных, а также наличие племенных свидетельств на быков и коров, удостоверяющих происхождение потомства.

2. Ввоз эмбрионов немедленно прекращается, если в местности, где расположен пункт по трансплантации, возникли инфекционные болезни. При этом ветеринарное свидетельство считается недействительным.

3. Поставляемые эмбрионы транспортируют в исправных сосудах Дьюара. Предварительно их дезинфицируют и заполняют жидким азотом не менее $2/3$ объема емкости. Допускается их хранение в замороженном состоянии на все время транспортировки.

Задание 1. Изучить основные этапы технологии трансплантации эмбрионов.

Технология трансплантации эмбрионов: 1.

Отбор доноров и реципиентов.

2. Гормональное индуцирование суперовуляции у доноров.

3. Отбор производителей и осеменение доноров.
4. Извлечение эмбрионов. 5. Оценка качества эмбрионов.
6. Отбор и подготовка реципиентов.
7. Синхронизация половой охоты у донора и реципиента
8. Пересадка эмбрионов реципиенту.

Задание 2. Изучить факторы, влияющие на развитие метода трансплантации эмбрионов.

Факторы, влияющие на успешное развитие метода трансплантации:

1-й фактор. Создание надлежащих условий кормления и содержания для доноров и реципиентов.

Обеспечение полноценного кормления и надлежащих условий содержания коров-доноров и реципиентов является одним из основных условий получения качественных эмбрионов и их хорошей приживляемости. При длительном использовании коров в качестве доноров нередко наступает ожирение, т. к. они уже меньше доятся. Часто животные в период проведения гормональных обработок, осеменения и извлечения эмбрионов находятся на привязи. В этом случае дачу концентрированных кормов прекращают, организуется максимальный выпас или скармливание сена вволю.

2-й фактор. Выбор правильной структуры управления и формы организации работ по трансплантации.

А. Главным заказчиком, финансирующим работу по трансплантации является племотдел Минсельхозпрода. Предприятием, доводящим задания до исполнителя выступает Племяобъединение.

Б. Главными предприятиями координирующими работу, по трансплантации эмбрионов.

В их обязанности входит:

- осуществление практической помощи в организации работы по трансплантации в республике;
- создание криобанка эмбрионов;
- обучение и переобучение специалистов по трансплантации на местах;
- осуществление всей научно-методической работы по вопросам трансплантации эмбрионов.



Рисунок 1 - Структура управления и форма организации работы по трансплантации эмбрионов

В. Исполнителями работы являются облплемпредприятия и племенные хозяйства, где сосредоточено поголовье высокоценных коров -

доноров и имеются пункты, оборудованные для работы с эмбрионами. Их основная функция:

а) получение быков-производителей для госплемпредприятий и генетически ценного молодняка для ремонта поголовья дойного стада указанных племзаводов;

б) создание криобанка эмбрионов от выдающихся коров-доноров.

3-й фактор. *Синхронизация полового цикла у донора и реципиента.*

Цель синхронизации полового цикла у животных доноров и реципиентов заключается в том, чтобы возраст полученного у донора эмбриона соответствовал стадии полового цикла реципиента. Приживляемость зависит от секрета маточных желез, обеспечивающего формирование среды, соответствующей возрасту эмбриона.

При асинхронном половом цикле у эмбрионов снижается жизнеспособность, поскольку на них отрицательно влияет не соответствующая стадии развития внутриматочная среда.

4-й фактор. *Роль специалистов в успешном осуществлении работы по трансплантации.*

Роль специалистов в успешном осуществлении работы по трансплантации заключается в следующем:

1. Специалист должен иметь глубокие практические знания вопросов биотехники размножения, акушерства и физиологии животных, в совершенстве владеть техникой извлечения и пересадки эмбрионов.

2. Не допускать нарушений в технологии подготовки доноров и реципиентов, проведении полиовуляции, оценке эмбрионов, их криоконсервации и пересадки реципиентам.

3. Использовать только те инструменты и схемы, которые предназначены для трансплантации. Не допускать применения самодельных устройств и нетрадиционных схем гормональной обработки скота.

Задание 3. Изучить этапы технологии выделения и кратковременного хранения ооцитов.

В настоящее время применение на практике нашел метод созревания ооцитов *in vitro*. Их выделяют из яичников коров двумя способами:

1 способ: яичники получают от животного после убоя, в процессе разделки туши в условиях мясокомбината.

Доставляют в лабораторию в термостатированном контейнере и не более 1,5 – 2 часов хранят в солевом растворе Хенкса с добавлением антибиотиков или в среде ТСМ – 199 при температуре 10 – 20°C. Ооциты выделяют из фолликулов, диаметр которых около 4 – 6 мм, путём отсасывания или посредством предварительного иссечения яичников лезвием на пластинки.

2 способ: прижизненного извлечения ооцитов из яичников коров с помощью ультразвукового прибора *лапароскопа*. Этим прибором ооциты отсасывают из фолликулов, диаметр которых не менее 5 мм, 1-2 раза в неделю

от одного и того же животного. В среднем за один раз получают 5-6 ооцитов. Из них от 30 до 50% пригодных для созревания *in vitro*.

Отобранные ооциты, с компактным кумулюсом, помещают в среду ТСМ 199, добавляют 20%-й раствор тёплой сыворотки крови от коровы в охоте, гранулёзные клетки (5×10^6 клеток в 1 мл) и небольшое количество антибиотиков (50 ИЕ пенициллина, 50 мкг стрептомицина на 1 мл). Гранулёзные клетки собирают из среды, в которой ооциты были отделены от фолликулов и центрифугируют дважды по 5 мин при 3000 об. Осадок гранулёзных клеток суспензируется в среде для созревания. Культивирование ооцитов, вместе с гранулёзными клетками, проводят в термостате инкубаторе при 38,5 С, при содержании в атмосфере 5% CO₂, в чашках Петри в 2 мл среды.

Задание 4. Переписать состав солевого раствора Дюльбекко:

- 1) дистиллированная вода;
- 2) натрий хлористый (NaCl) – 8 г;
- 3) калий хлористый (KCl) – 0,2 г;
- 4) натрий фосфорно-кислый двузамещенный, безводный (Na₂HPO₄) – 1,15г;
- 5) калий фосфорно-кислый однозамещенный (KH₂PO₄) – 0,2 г;
- 6) магний хлористый, содержащий 6 молекул воды (MgCl₂ 6H₂O) – 0,1 г;
- 7) кальций хлористый, безводный (Ca Cl₂) – 0,1 г;
- 8) пируват натрия – 0,036 г;
- 9) глюкоза – 1 г.

Каждый компонент включают в раствор после полного растворения предыдущего. Раствор доводят дистиллятом до 1 л, рН должен соответствовать 7,2-7,3. Раствор стерилизуют, герметически упаковывают и хранят при комнатной температуре. Перед работой с эмбрионами в солевой раствор Дюльбекко добавляют 4 мг/л сыворотки крови овцы или эмбриональной сыворотки теленка и 100 ЕД пенициллина.

Задание 5. Изучить схему обработки коров-доноров стимулирующим гипофизарным гормоном ФСГ:

Таблица 1 – Схема обработки коров-доноров фолликулостимулирующим гипофизарным гормоном ФСГ

День цикла	Препарат	Доза 1500 ЕД		
		утром	вечером	общая
9-11	ФСГ	240	240	480
10-12	ФСГ	210	210	420
11-13	ФСГ +эстрофан	180+500	180+250	360+750
12-14	ФСГ	120	120	240
13-15	Охота	-	-	-
0 день	-	1-е и 2-е осеменение		
1 день	-	3-е осеменение		
7 день	-	извлечение эмбрионов		

Задание 6. На основании рисунка изучить основные этапы применения хирургического метода трансплантации эмбрионов свиней:

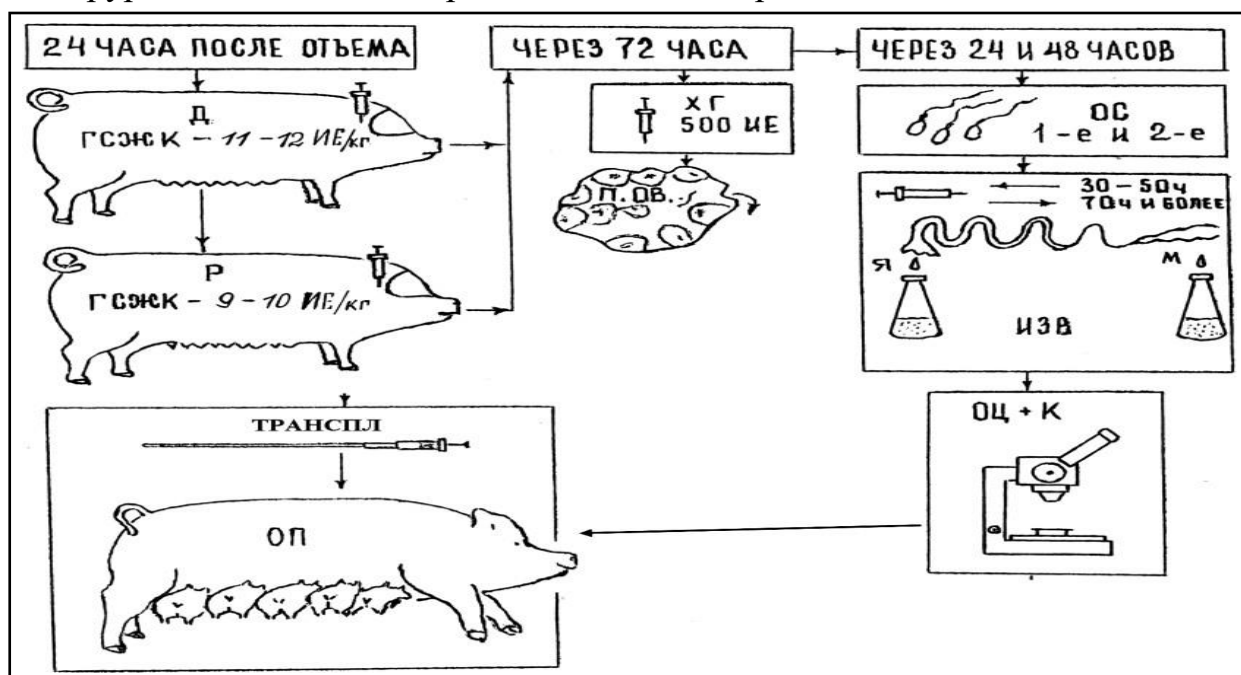


Рисунок 2 – Этапы применения хирургического метода трансплантации эмбрионов свиней.

Задание 7. Изучить методику насыщения эмбрионов криопротектором глицерином.

Таблица 2 – Методика насыщения эмбрионов криопротектором глицерином

№ раствора	1,4 М раствор глицерина	
	концентрация	время экспозиции (мин.)
1	0,35	5
2	0,7	5
3	1,05	5
4	1,4	15

Задание 8. Изучить методику приготовления раствора криопротектора глицерина.

Таблица 3 – Методика приготовления криопротектора глицерина

№ раствора	Концентрация	
	М	Компоненты для приготовления
1	1,4	1 мл глицерина + 9мл среды Дюльбекко
2	0,7	1 мл 1,4 М р-ра глицерина + 1 мл среды Дюльбекко
3	1,05	1 мл 1,4 М р-ра глицерина + 1 мл 0,7 М р-ра глицерина
4	0,35	1 мл 0,7 М р-ра глицерина + 1 мл среды Дюльбекко

Задание 9. Изучить методы криоконсервации и размораживания

эмбрионов, переписать основные технологические этапы.

Существует два основных способа глубокого замораживания эмбрионов:

1. Контролируемая медленная (постепенная) криоконсервация;
2. Несбалансированная криоконсервация с а) ультра быстрым замораживанием и б) витрификацией.

Контролируемая медленная криоконсервация является в настоящее время обычным методом консервации эмбрионов. Их охлаждают медленно, чтобы:

а) произошло обезвоживание зародыша и уменьшилось образование больших внутриклеточных кристаллов льда;

б) жидкость вышла за пределы клеток и более крупные кристаллы льда образовывались только в межклеточном пространстве;

в) зародыши оставались в равновесии с замерзающим раствором. При этом если клетки охлаждаются слишком быстро, существует опасность повреждения эмбриона из-за межклеточной и внутриклеточной кристаллизации.

Кроме того, растущая концентрация солей в межклеточном растворе может вызвать токсическое повреждение эмбриона. Для такой медленной криоконсервации необходим дорогостоящий импортный замораживатель (стоимостью около 12 тысяч евро), а сам процесс длится два с половиной часа.

При ультрабыстрых методах замораживания эмбрионы, находящиеся в растворе 3,5-4,5 М ДМСО (диметилсульфоксид) и 0,25-0,5 М сахарозы, помещают в жидкий азот. При этом образующиеся мелкие кристаллы льда, менее стабильные, чем острые крупнокристаллические, тающие при очень низких температурах.

Под витрификацией понимают переход жидкости в твердое состояние, который вызван не кристаллизацией, а повышением вязкости во время охлаждения. Витрификационный раствор состоит из смеси высококонцентрированного (10-25%) проникающего криопротектора (ДМСО, ацетамид, пропиленгликоль, глицерин, этиленгликоль) и непроникающего криопротектора (полиэтиленгликоль, фикоилл, сахароза) в буферном солевом растворе.

При витрификации значительно упрощается не только процесс охлаждения, поскольку эмбрионы после кратковременной выдержки в витрификационном растворе сразу погружаются в жидкий азот, но и исключается опасность физических и химических повреждений, вызванных межклеточной и внутриклеточной кристаллизацией воды. К тому же, здесь не нужно дорогое компьютеризированное оборудование.

Единственным недостатком витрификации является химическая токсичность витрификационных растворов, которая находится в прямой зависимости с концентрацией криопротектора, временем и температурой экспозиции эмбриона в этом растворе.

Технологические этапы процесса криоконсервации эмбрионов.

Использование технологии криоконсервации зародышей позволяет сохранить генетически ценный эмбриоматериал при отсутствии реципиентов, а также проводить трансплантацию эмбрионов в строго определенные сроки с максимальной эффективностью.

Технология глубокого замораживания эмбрионов:

1. Оценка качества полученных эмбрионов.
2. Насыщение зародышей криопротектором.
3. Постепенное охлаждение эмбрионов с помощью программных замораживателей.
4. Перенос их в жидкий азот на хранение.
5. Оттаивание эмбрионов при определенной температуре.
6. Выведение криопротектора из зародышей.
7. Морфологическая оценка эмбрионов под микроскопом на пригодность к трансплантации.
8. Заправка эмбриона в пайету и далее в катетер.
9. Пересадка эмбрионов реципиентам.

Все манипуляции с ними должны проводиться в стерильном боксе, их хранение в отдельном, хорошо проветриваемом помещении. Полученные эмбрионы оценивают под микроскопом. Криоконсервации подвергаются только половые клетки отличного и хорошего качества. Наиболее эффективно замораживание поздних морул и ранних бластоцист.

В качестве криопротекторов используют 1,4 М раствор глицерина или 1,5 М раствор этиленгликоля. Для повышения сохранности и улучшения качества замораживаемых эмбрионов после оттаивания в криопротекторные среды могут вводиться различные биологически активные соединения, такие как бычий сывороточный альбумин и водорастворимые витамины В₁ и В₆.

Альбумин способствует ускорению транспорта витаминов в эмбриональные клетки, а тиамин и пиридоксин регулируют процессы дыхания, энергообразования и обмена веществ. За счет этого происходит усиление восстановительных процессов в бластомерах, повышение их жизнедеятельности и приживляемости после пересадки.

Насыщение эмбрионов криопротектором осуществляется либо поэтапно в возрастающих концентрациях растворов, либо одноступенчато. Все работы с эмбрионами проводятся с использованием стерильной посуды, инструментов и оборудования.

После выдержки зародышей в растворе с конечной концентрацией криопротектора соблюдают следующие правила подготовки:

a) эмбрионы с помощью шприца объемом 1 см³ помещают в пайеты, при заправке которых соблюдают следующую последовательность их заполнения (рис.3):

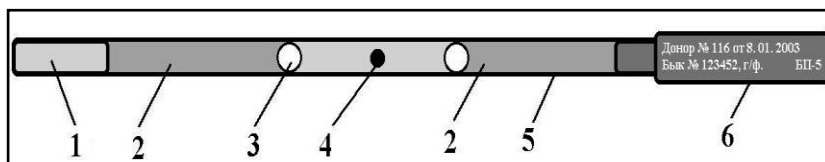


Рисунок 3 – Схема заправки пайеты с эмбрионом:

1 - пых, 2 - защитный раствор, 3 - пузырек воздуха, 4 - эмбрион, 5 - пайета, 6 - маркировочная пробка.

- вначале набирают раствор криопротектора в количестве 2/5 объема;
- затем пузырек воздуха;
- снова раствор с эмбрионом (1/5 объема);
- пузырек воздуха;
- раствор криопротектора (2/5 объема).

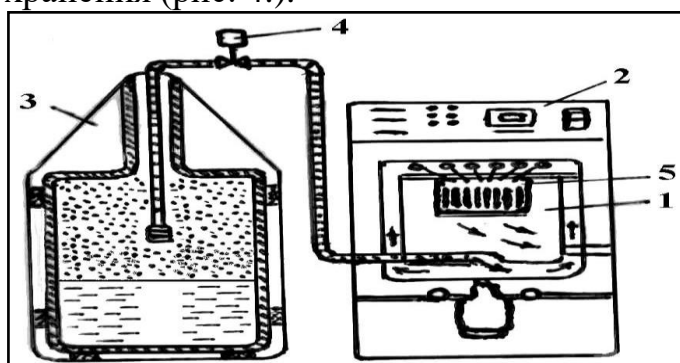
б) заправка проводится таким образом, чтобы введенный первым объемом раствора, постепенно продвигаясь дальше, смочил пых пайеты;

в) в одну пайету заправляют не более 2-х эмбрионов;

г) нижний конец пайеты закрывают пластиковой маркировочной пробкой, на которой указывают дату извлечения эмбриона, номер коровы-донора, номер быка- производителя, номер пайеты;

д) рекомендуется использовать следующие наиболее распространенные иностранные марки программных замораживателей: Минукул АС-25; CryoCell 1200; DB1 EmbryoFreeze. Режимы замораживания даны в инструкциях к замораживающим устройствам. Пайеты с эмбрионами переносят в камеру для замораживания, программируют. Схема прибора для замораживания представлена на рисунке 4.

Снижение температуры происходит автоматически до заданного программой уровня. Затем пайеты быстро переносят в жидкий азот для хранения (рис. 4.).



1. Морозильная камера
2. Блок автоматики с датчиком температуры.
3. Сосуд Дьюара.
4. Электронное клапанное устройство.
5. Фиксатор для пайет.

Рисунок 4 - Схема программного замораживателя

Методика размораживания эмбрионов:

1. Достают пайеты из сосуда Дьюара, выдерживают на воздухе 10 секунд при комнатной температуре и погружают на 10 секунд в водяную баню (оттаиватель) при температуре 25 С.
2. Содержимое пайет вместе с эмбрионом переносят на часовое стекло и делают последовательную проводку (перемещение) по нисходящей

- концентрации растворов, либо удаляют криопротектор одноступенчато.
3. После морфологической оценки качества эмбрионов их заправляют в пайеты вышеуказанным способом.
 4. Пайету вставляют в металлический цилиндр катетера.
 5. Одевают вначале защитный чехол, затем поверх него полиэтиленовый санитарный чехол. На нем указывают номер закрепленного животного-реципиента, которому и пересаживают зародыш.
 6. Для пересадки эмбрионов используют животных-реципиентов, не имеющих генетической ценности.

Тема № 5. КЛОНИРОВАННЫЕ ЖИВОТНЫЕ, МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Вид занятия: практическое.

Цель занятия: освоить методику клонирования, пересадки ядер, переноса генов и получения клонированных животных.

Литература: 1, 3, 4,

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Содержание и методика проведения занятия

Организационные вопросы (учет наличия студентов, формулирование темы и цели занятия) - 5 минут.

Контрольные вопросы и сообщения - 60 минут:

1. Дать определения понятиям «клон», «клонирование», «тотипотентность».
2. Клонирование эмбрионов. Дисекция эмбрионов.
3. Клонированные животные.
4. Перспективы использования клонированных животных.

Клон – это группа генетически идентичных клеток или организмов, которые получены в результате деления одной клетки-предшественника.

Клонирование. В 1952 году Р. Бриггс и Т. Кинг разработали метод пересадки ядер соматических клеток зародышей в энуклеированные яйцеклетки лягушек. В это время *Бесквит Р.* впервые выделил ген. Благодаря этому, стало возможным после удаления гаплоидного ядра из яйцеклетки лягушки, введение в неё диплоидного ядра соматической клетки, взятой из кишечной стенки головастика. После электростимуляции деления яйцеклетки получают нормальное развитие зародыша и потомство исходной особи. Дж. Гердон в 1962 году усовершенствовал технику пересадки ядер.

Работа по клонированию ведется по трем направлениям:

1. Пересадка ядер из соматических клеток в энуклеированную яйцеклетку.
2. Получение гомозиготных диплоидных потомков.
3. Создание партеногенетических животных.

Методы получения клонированных животных:

1. Пересадка ядра соматической клетки в яйцеклетку, из которой удалено собственное ядро.

2. Разделение эмбрионов крупного рогатого скота в возрасте до 7-8 дней, не имеющих дифференцированных клеток, на части (2-4) с последующей пересадкой реципиенту.

В 1997 году в Великобритании методом пересадки ядра соматической клетке энуклеированную яйцеклетку была получена овца, которую назвали Долли.

Клонирование было проведено путем ядерного переноса. Реципиентная яйцеклетка одной овцы была подвергнута удалению ядра. У другой овцы, находящейся на четвертом месяце беременности, из клеток кожи вымени было выделено ядро с хромосомной ДНК, которое пересадили в реципиентную яйцеклетку без генетического материала. Было взято беременное животное потому, что в этом случае клетки вымени активно делятся. После слияния некоторые клетки начали активно делиться, после доращивания *in vitro* эмбрион был имплантирован овце-реципиенту. В результате на свет появился ягненок, названный Долли, она была похожа на овцу, у которой взяли ядро для пересадки.

Задание 1. На основании рисунка написать основные этапы получения клонированных животных:

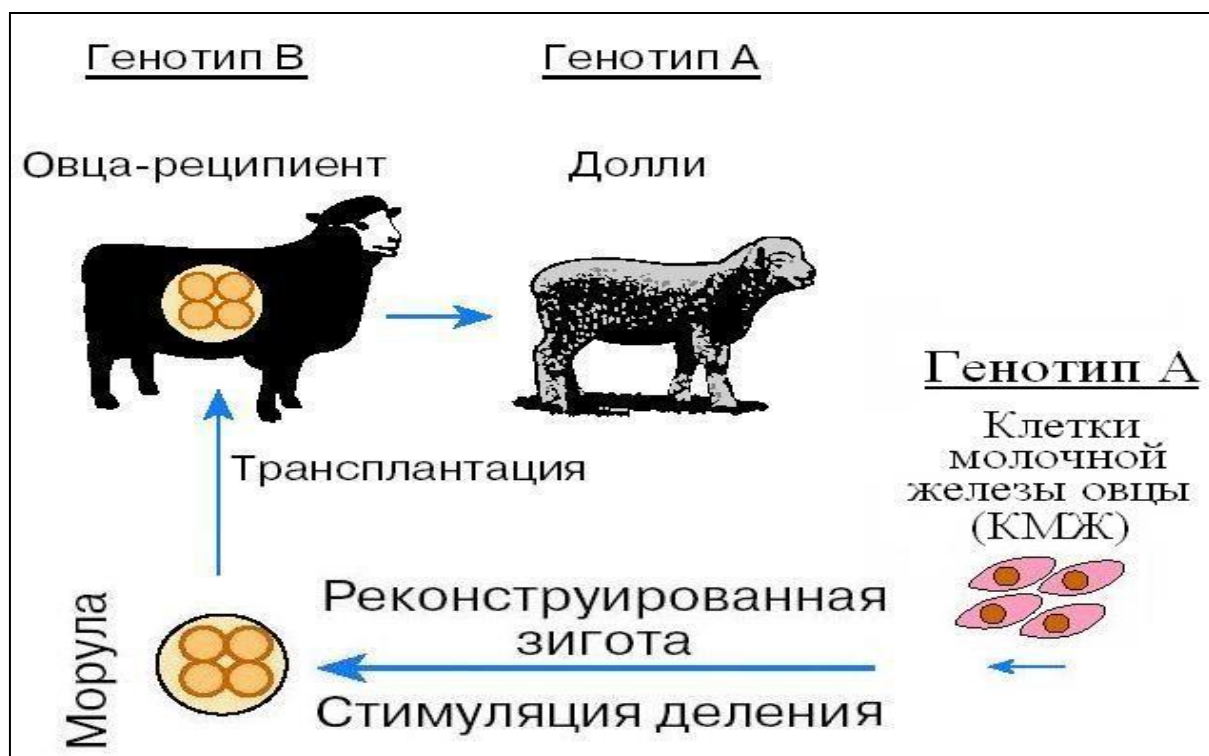


Рисунок 1 - Схема получения овцы Долли (по Вильмуту)

Тема № 6. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ И БЕЛКА

Вид занятия: практические.

Цель занятия: изучить основные виды биологически активных

веществ испособы их получения.

Литература: 1, 3, 5

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы:

1. Значение антибиотиков для животноводства и ветеринарии.
2. Биотехнологические методы производства антибиотиков.
3. Биотехнология производства белка.
4. Перспективы применения белковых продуктов в сельскохозяйственном производстве.

Антибиотики – это группа высокоэффективных биологически активных веществ, которые синтезируются микроорганизмами и способны убивать или подавлять рост живых клеток.

В зависимости от химической природы антибиотики делят на:

- лактамы (пенициллины, цефалоспорины);
- тетрациклины (тетрациклин, морфоциклин, метациклин);
- макролиды (эритромицин);
- аминогликозиды (гентамицин);
- гликопептиды (ванкомицин);
- амфениколы (левомицетин);
- линкосамиды (линкомицин);
- полиеновые (противогрибковые – нистатин);
- противоопухолевые (блеомицин) и др.

По типу действия антибиотики делят на бактерицидные и бактериостатические, по спектру действия – узкого и широкого.

В качестве продуцентов антибиотиков используются микроорганизмы, плесневые грибы, актиномицеты, высшие растения и ткани животных.

Значение антибиотиков для сельского хозяйства:

1. Антибиотики применяются для лечения животных и птиц;
2. Кормовые антибиотики используются для кормления животных и птиц.
3. Применяются антибиотики в растениеводстве для борьбы с болезнями растений, антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов и имеют ряд преимуществ перед химическими препаратами.
4. Антибиотики применяются также в пищевой промышленности для консервирования продуктов питания, для сохранения свежего мяса, молока, рыбы и т.д.

Методы получения антибиотиков:

1. Химический синтез.
2. Биосинтез (прямая ферментация микроорганизма – продуцента).
3. Мутационный биосинтез (мутасинтез).

Производство белка

Для получения кормового белка используются дрожжи, бактерии, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, различные почвенные беспозвоночные

– дождевые черви и др.

Основные этапы получения кормового белка:

- 1) подготовка питательной среды;
- 2) ферментация (культивирование продуцента);
- 3) сгущение биомассы;
- 4) сепарация и промывка;
- 5) сушка;
- 6) упаковка.

Белок одноклеточных организмов (БОО) – это белок дрожжей, водорослей.

Кормовые водоросли:

- 1) хлорелла;
- 2) сценедесмус;
- 3) спирулина.

Водоросли выращивают в открытых или закрытых культиваторах, товарный продукт приготавливают в виде порошка, суспензии или пасты.

Использование микроорганизмов в сельском хозяйстве

В животноводстве используются пробиотики, пребиотики, гербиотики, симбиотики и другие микробиологические препараты для получения кормовых продуктов.

Пробиотики - это живые микробные культуры или споры полезных микроорганизмов, которые заселяют желудочно-кишечный тракт и улучшают микробный баланс.

Пребиотики - это неперевариваемые кормовые ингредиенты, которые выборочно стимулируют рост и активность полезных бактерий в толстом кишечнике, что способствует улучшению состояния здоровья.

Гербиотики - это растительные экстракты, которые оказывают мембраностабилизирующее, противовоспалительное и анаболизирующее действие. Также они подавляют патогенную микрофлору и стимулируют иммунитет.

Симбиотики - это смесь пробиотиков и пребиотиков.

Задание 1. Изучить этапы технологии производства неочищенных антибиотиков.

Этапы технологии производства неочищенных антибиотиков:

1. Посуду, инструменты, материалы стерилизуют, используя для этой цели автоклав. В него закладывают стеклянную посуду, затем герметически закрывают и проводят стерилизацию водяным паром в течение 30-45 минут. Наиболее эффективным способом стерилизации рабочего бокса является ультрафиолетовое облучение его бактерицидной лампой в течение 60 минут.

2. Для размножения гриба используют его исходную культуру, расфасованную в стеклянные флаконы. Для раскладки посевного материала производят посев грибка в колбу над пламенем спиртовой горелки. Колбы с посевным материалом ставят на специальную качалку для лучшей аэрации с

целью более интенсивного роста грибка при температуре от 26 до 28° С на 18-24 ч.

3. Переносят посевной материал в большие бутылки и вновь помещают на качалку и подвергают встряхиванию при температуре 26-28° С в течение 18-24 ч.

4. Производят загрузку расплодки гриба и необходимых компонентов питательной среды в специальные реакторы для ферментации.

При изготовлении кормового нативного антибиотика ферментация протекает 24—36 ч. Через каждые 6-12 ч из ферментатора отбирают пробу для проверки антибиотика на активность. В процессе развития грибка в ферментаторе скапливаются газообразные продукты его жизнедеятельности, которые удаляются через шланг.

5. По окончании процесса ферментации антибиотиков культуральную жидкость проверяют на активность преимущественно следующими микробиологическими методами:

- методом перпендикулярных штрихов на агаре. Для этого вырезанную в питательной среде канавку заполняют средой с антибиотиком. Перпендикулярно канавке засевают различные виды микроорганизмов. Длина белых полосок указывает на неодинаковую чувствительность микробов к антибиотику.

- *методом бумажных дисков.* Для этого на питательную среду, засеянную микробами, накладывают диски из фильтровальной бумаги, пропитанные антибиотиком. В центре наложен диск без антибиотиков (контрольный). Вокруг диска с антибиотиками роста микроорганизмов не наблюдается (зона угнетения);

- *методом цилиндриков.* Для этого в питательную среду, засеянную бактериями, погружают стеклянные или металлические не запаянные цилиндрики, которые заполняют антибиотиками. Ширина зоны угнетения вокруг цилиндриков указывает на антимикробные свойства антибиотиков.

- Антибиотики выпускаются в жидком и сухом виде. После проверки на активность их расфасовывают в соответствующую посуду и этикетируют. Каждая серия антибиотиков обязательно снабжается наставлением о способе их использования.

Задание 2. Изучить и записать нормы введения антибиотиков на 1 т корма:

Таблица 1 - Нормы введения антибиотиков (г) на 1 т корма

Вид животных	Бацитрацин	Гризин	Тетрациклин
Телята: 1-12 месяцев	40	4	40
12-18 месяцев	20	2	20
Молодняк овец	30	3	30
Свиньи на откорме	20	2,5	20
Поросята - отъемыши (1-4 мес.)	³⁷ 20	2,5	20
Поросята-сосуны	50	5	40

Задание 3. Изучить названия и механизм действия белковых препаратов, аминокислот и заменителей белка, применяемых в животноводстве.

Глобулины неспецифические - представляют собой водный раствор глобулиновой фракции белка сыворотки крови животных. Прозрачный раствор. Содержит α - и β -глобулины. Белковый препарат.

Действует стимулирующее, ускоряет рост и развитие животных.

Применяют для ускорения развития молодняка животных и предупреждения желудочно-кишечных заболеваний. Препарат назначают внутримышечно с первых дней жизни.

Дозы для ускорения роста и развития (на 1 кг живой массы): телятам - 0,7 мл, ягнятам и пороссятам - 1 мл; с профилактической целью применяют: телятам - 0,5 мл, пороссятам - 2 мл, ягнятам - 0,7 мл.

Метионин - белый кристаллический порошок, растворимый в воде. Получают синтетически. Метионин - незаменимая аминокислота, постоянно присутствующая в организме.

Действие: участвует в обмене веществ, обезвреживании в организме ядов и продуктов обмена, синтезе многих гормонов и витаминов.

Применяют для ускорения роста и развития свиней. Большое количество метионина содержит творог, который также используют цыплятам для ускорения их развития.

Дозы внутрь: пороссятам - 0,15 г на 1 кг живой массы.

Мочевина (карбамид) - белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Выпускают для кормовых целей в полиэтиленовых мешках, а для лечебных - во флаконах по 30 г, 60 и 90 г. К каждому флакону прилагается флакон с 10-процентным раствором глюкозы для получения 30-процентного раствора мочевины.

Является заменителем кормового протеина в рационе жвачных животных. В преджелудках жвачных животных бактерии рубца превращают белковый и небелковый азот рациона, в том числе азот мочевины, в аммиак, который затем используется для синтеза белка бактериальной клетки. В кишечнике бактерии перевариваются

и белок усваивается организмом.

Действует мочегонно. В больших дозах мочевина токсична. Токсичность обуславливается образованием в рубце жвачных животных больших количеств аммиака. Избыток его не успевает утилизироваться в печени, поступает в кровяное русло и действует как сильный яд.

Применяют в качестве подкормки при недостатке протеина в рационе жвачных. Для лучшего прироста массы и продуктивности она должна обеспечить не более одной трети потребности животного в белке. Ежедневное применение бычкам по 60-70 г мочевины с рационом, богатым грубыми кормами, дает хорошие привесы при их выращивании. На рационе, богатом кукурузой, бычки могут усваивать до 100 г мочевины в сутки и давать хороший привес. Лактирующим коровам ее можно назначать до 1% от всего

рациона или до 3% от массы концентратов.

При силосовании кукурузы в фазе молочно-восковой спелости добавляют на 1 т силоса 4-5 кг мочевины и 2 кг аммония сернокислого. В фазе восковой спелости применяют по 2 кг мочевины и аммония сернокислого на 1 т силоса. Такая добавка значительно повышает питательную ценность корма.

Тема № 7. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА АМИНОКИСЛОТ, ГОРМОНОВ, ВИТАМИНОВ, ЛИПИДОВ, ФЕРМЕНТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Вид занятия: практические

Цель занятия: изучить способы получения аминокислот, гормонов, витаминов, липидов, ферментов.

Литература: 1, 2, 3

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы и сообщения

Аминокислоты, принципы получения.

1. Использование аминокислот в пищевой промышленности и животноводстве.

2. Применение витаминов и гормонов в животноводстве. Способы получения.

3. Перспективы применения липидов и ферментов в сельскохозяйственном производстве.

Производство аминокислот

Составные части белка – аминокислоты – человек и высшие животные могут синтезировать лишь ограниченно, некоторые из них являются незаменимыми, т.е. они или не синтезируются в организме или синтезируются с недостаточной скоростью.

К незаменимым аминокислотам относятся - *валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин.*

Аминокислоты можно получать следующими способами:

- 1) гидролизом природного белоксодержащего сырья;
- 2) химическим синтезом;
- 3) микробиологическим синтезом;
- 4) химико-микробиологическим методом.

Аминокислоты в большом количестве используются в пищевой промышленности, являются вкусовыми добавками, дезодорантами пищевых продуктов, пищевыми красителями, консервирующими агентами и т.д.

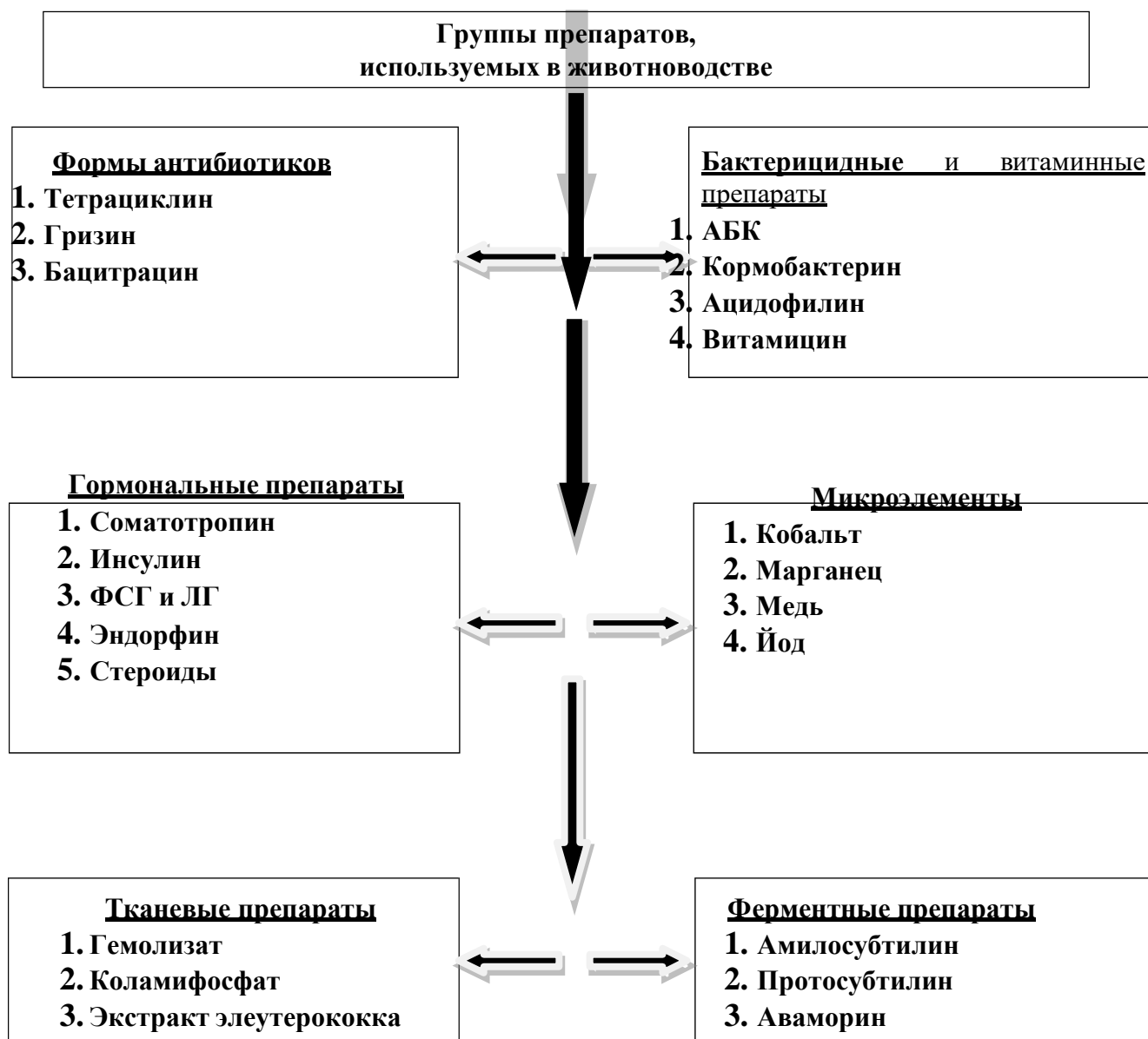
Аминокислоты применяются в животноводстве для сбалансирования кормов. При добавлении 2-4 дефицитных аминокислот к 1 т комбикорма общий расход кормов уменьшается на 10-20%, а выход продукции увеличивается на 20%. Аминокислоты используются в растениеводстве (могут ускорять или замедлять рост растений, используются в качестве средств защиты).

Задание 1. Изучить и записать содержание незаменимых аминокислот в различных белках:

Таблица 1- Содержание незаменимых аминокислот в различных белках (в г на 100 г белка)

Аминокислоты	Молоко от коровы	Эталон ФАО	Соя	Горох	Рис	Пшеница	Кукуруза	Ячмень
Лизин	6,6	4,2	6,6	6,5	3,5	2,6	2,5	3,2
Триптофан	1,4	1,4	1,3	0,8	1,3	1,3	0,6	1,2
Метионин	2,4	2,2	1,4	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7
Треонин	4,6	2,8	3,8	3,8	3,5	2,6	3,2	2,9
Валин	6,9	4,2	5,4	4,5	6,5	4,6	4,4	5,4
Лейцин	9,9	4,8	7,9	6,5	8,0	6,9	11,2	7,2
Изолейцин	6,6	4,2	5,3	5,0	4,6	3,4	2,7	3,5
Фенилаланин	4,9	2,8	5,1	4,8	5,2	4,3	4,1	5,1

Задание 2. Зарисовать схему используемых в животноводстве средств:



Задание 3. Изучить важнейшие ферментные препараты, применяемые в животноводстве:

Таблица 2 - Важнейшие ферментные препараты, применяемые в животноводстве

Препарат	Область применения
Амилосубтилин ГЗх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика желудочных, паразитарных заболеваний
Протосубтилин ГЗх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных, птиц и рыбы; получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика желудочных и паразитарных заболеваний
Глюкаваморин Пх	Добавление в кормовые рационы телят и ягнят, свиней, крупного рогатого скота; при силосовании картофеля, бобовых трав
Пектаваморин Пх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; при силосовании картофеля, бобовых трав
Пектофоедин ГЗх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; гидролиз БВК, дрожжей и растительных отходов; силосование бобовых трав;
Амилоризин Пх	Добавление в кормовые рационы ягнят и при откорме свиней
Дрожжелитин ГЗх	Получение ферментативных гидролизатов
Целловиридин ГЗх	Добавление в кормовые рационы крупного рогатого скота и птиц; гидролиз растительных отходов; силосование бобовых трав
Гликозидаза ГЗх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получение ферментативных гидролизатов
Лизосубтилин Г10х	Получение ферментативных гидролизатов; лечение и профилактика паразитарных заболеваний крупного рогатого скота
Протезим ГЗх	Добавление в кормовые рационы свиней и птиц
Лизоцеллюлозин Г10х	Гидролиз дрожжей и растительных отходов; добавление в кормовые рационы птиц
Лизогризеин Г10х	Гидролиз дрожжей и растительных отходов
Мальтаваморин Г10х	Гидролиз растительных отходов
Целлолигнорин Пх	Гидролиз растительных отходов, силосование бобовых трав
Целлокандин ГЗх	Гидролиз растительных отходов, силосование бобовых трав
Лизоцим ГЗх	Добавление в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; лечение и профилактика паразитарных заболеваний

Примечание. Буква Г означает, что препарат получен при глубинном выращивании микроорганизмов, П - получен из поверхностной культуры микроскопических грибов, 2- показывает, что это конц. сироп, 3 — сухой ферментный препарат, 10- очищенный фермент. препарат, Пх — высушенная поверхностная культура грибов.

Задание 4. Изучить и записать содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов:

Таблица 3 - Содержание незаменимых аминокислот в некоторых микроорганизмах (на 100 г белка)

Аминокислота	Микроорганизмы				
	дрожжи	водоросли	бактерии	грибы	актиномицеты
Валин	5-7	5-7	4-6	5-7	5,5
Лейцин	6-9	6-10	5-11	6-9	7,7
Изолейцин	4-6	4-7	5-7	3-6	5,3
Треонин	4-6	3-6	4-5	3-6	4
Метионин	1-3	1,5-2,5	2-3	2,5	1,3
Лизин	6-8	5-10	6-7	3-7	6,4
Фенилаланин	3-5	3-5	3-4	3-6	5
Триптофан	1-1,5	до 2	1,5	1,5-2	1,4

Тема № 8. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА

Вид занятия: практическое

Цель занятия: изучить основные аспекты проблемы защиты окружающей среды.

Литература: 1,2,3,

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы

1. Проблема утилизации навоза и отходов растениеводства.
2. Биотехнологическая переработка навоза.
3. Типы загрязнений поверхностных и подземных вод. Основные источники загрязнения водоёмов.
4. Методы очистки сточных вод.
5. Переработка твердых отходов. Биодegradация ксенобиотиков.
6. Биотехнологические методы утилизации целлюлозы, крахмала и жировых отходов.

Биотехнология переработки органических отходов направлена на решение таких важных задач, как:

- защита окружающей среды от токсических отходов животноводства,
- получение экологически чистого удобрения – зоогумуса,
- получение белково-липидного концентрата, который используется при разведении птицы, рыб, тутового шелкопряда, свиней, а также микроорганизмов.

Основные методы биотехнологической переработки навоза:

1. Компостирование.
2. Получение биогаза из навоза.
3. Использование птичьего помета.
4. Извлечение полезных веществ (воды, кормов для животных, удобрений, витаминов и др.) в процессе биотехнологической переработки навоза.
5. Получение органического удобрения – метанизированного навоза

крупного рогатого скота в виде гранул.

6. Метод биологической переработки навоза с помощью личинок комнатной мухи – получение зоогумуса.

Типы загрязнения поверхностных и подземных вод:

1) механическое, сопровождающееся повышением содержания механических примесей и относящееся в основном к поверхностным видам загрязнений;

2) химическое, обусловленное присутствием в воде органических и неорганических веществ токсического и нетоксического действия;

3) биологическое, связанное с наличием в воде разнообразных патогенных микроорганизмов, грибов и мелких водорослей;

4) радиоактивное;

5) тепловое.

Основные источники загрязнения и засорения водоёмов:

- недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов, отходы производства при разработке рудных ископаемых (воды шахт, рудников);

- сбросы водного и железнодорожного транспорта;

- пестициды и загрязняющие вещества, попадая в природные водоёмы, качественно изменяют их состав.

Методы очистки сточных вод:

1. *Механические методы.* Путём отстаивания и фильтрации удаляют механические примеси. Грубодисперсные частицы в зависимости от размеров улавливаются решётками, ситами, песколовками, навозоуловителями, нефтеловушками. Механическая очистка позволяет выделять из бытовых сточных вод до 60-75% нерастворимых примесей, а из промышленных – до 95%, многие из которых как ценные примеси используются в производстве.

2. *Химические методы.* Добавление в сточные воды различных химических реагентов, которые вступают в реакцию с загрязнителями и осаждают их в виде нерастворимых осадков. Химическая очистка уменьшает количество нерастворимых примесей до 95 %, а растворимых – до 25 %.

3. *Физико-химические методы* (электролиз, окисление, адсорбция, экстракция, ионообменная хроматография, ультразвук, высокое давление) используют для удаления тонкодисперсных и растворённых неорганических примесей, а также для разрушения органических и плохо окисляемых веществ.

4. *Биологические методы* основаны на использовании закономерностей биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоёмов. Для очистки сточных вод используют биофильтры, биологические пруды и аэротенки.

Отстой сточных вод

В зависимости от степени обработки отстой городских сточных вод обычно делят на:

- *первичный* (необработанный), состоящий из твёрдых веществ;

- *вторичный* – твёрдые вещества, выделяющиеся после вторичного отстоя, или отстой с биофильтров очистных сооружений;

- *третичный* – результат третичного отстоя сточных вод (известь и глина);

- *отстой, перегнивший в анаэробных условиях.*

Переработка твердых отходов

Наиболее простым техническим решением проблемы твердых отходов при весьма низких финансовых затратах является их захоронение. Но этот способ экологически бесперспективен: на десятки лет занимают огромные площади, идет загрязнение окружающей среды.

Органическое вещество в таких захоронениях разлагается достаточно медленно до 30-50 лет.

В начальной стадии переработки твердых отходов преобладают аэробные процессы, в ходе которых наиболее легко разрушаемые молекулы используются беспозвоночными (клещами, червями, нематодами), низшими грибами и микроорганизмами.

На следующей стадии происходит разложение таких макромолекул, как лигноцеллюлозы, лигнина, танина и меланина, которые способны только к медленной деградации. Продолжительность этого периода сильно варьируется и частично зависит от предобработки.

Высокая температура (до 80 С) и присутствие антибиотиков микробного происхождения приводят к гибели или инактивации патогенных микроорганизмов и вирусов, личинок насекомых и семян растений.

Через некоторое время кислород поглощается аэробной микрофлорой, накапливается CO_2 и начинается деятельность анаэробной микрофлоры, образующей метан, а затем метаногены.

В зависимости от местных условий через несколько месяцев или через год наступает стабильное метановое брожение, в выделяющемся газе содержится 50 – 55% CH_4 , около 40% CO_2 и 5% N_2 .

Использование газа, образующегося на свалках, имеет огромные перспективы, так как его можно получать в больших количествах. Однако в настоящее время он не находит сбыта, представляет собой только отходы и создает неудобства в эксплуатации свалок. Газ, образующийся на свалках, научились извлекать с помощью труб из полиэтилена. После удаления конденсата и пыли этот биогаз можно использовать как топливо.

Биодеградация ксенобиотиков

Ксенобиотики - это чужеродные вещества, непригодные, химические, синтетические, попавшие в окружающую среду.

Биодеградация органических соединений (ксенобиотиков) в среде – полная минерализация, частичное разрушение и детоксикация, которая может быть достигнута путем всего лишь одной модификации структуры молекулы.

К трудноразлагаемым веществам относят: хлорпроизводные углеводородов, нафталины, эмульгаторы, азокрасители, полиароматические углеводороды, полистирол.

Судьба ксенобиотика зависит как от его внутренних особенностей (устойчивости к различным воздействиям, растворению в воде, размера и

заряда молекулы, летучести), так и от внешних факторов (рН, фотоокисления, выветривания).

Шины, изготовленные из стирол-бутадиеновой резины, частично разлагаются микроорганизмами при тонком предварительном измельчении. Но антиозонаты, антиоксиданты и ускорители существенно замедляют биодеградацию.

При удалении ингибитора полимеризации из технологии изготовления шин полистирол разрушается соответствующим сообществом микроорганизмов. Для успешного разложения ксенобиотиков их структура должна быть близкой к природным веществам.

В сообществе микроорганизмов создаются идеальные условия для обмена генетической информацией за счет переноса плазмид между организмами, так как в плазидах кодируется информация о синтезе ферментов, разрушающих ксенобиотики.

Микроорганизмы, растущие на одном субстрате (ксенобиотике), превращают его в источник питания для других членов сообщества. Таким образом, микробное сообщество осуществляет совместную «метаболическую атаку» на субстрат – ксенобиотик.

Образцы из нескольких мест на свалках культивируют в течение нескольких месяцев, постепенно увеличивая концентрацию ксенобиотика. Если в сообществах микроорганизмов со свалок имеются организмы, способные к деградации ксенобиотика, они начинают активно развиваться. В дальнейшем из наиболее активных вариантов удастся выделить активные штаммы с плазидами инактивации данного ксенобиотика.

Токсичность пестицидов утрачивается уже на первой стадии их преобразования. Для этого успешно можно использовать такие внеклеточные ферменты, как гидролазы, эстеразы, ациламидазы, фосфоэстеразы. Описаны гидролазы для деградации некоторых пестицидов. Ферменты в виде аэрозолей можно использовать для удаления пестицидов с поверхностей установок, реакторов и тары.

Чтобы осуществить биодеградацию ядохимикатов, в них рекомендуется вносить микродобавки (специально подобранные микробные сообщества) для быстрой ликвидации самого вредного агента и, таким образом, его позитивного воздействия на вредителя.

Моющие средства подразделяются на «жесткие» и «мягкие». Созданные в 80-е годы анионные «жесткие» моющие вещества (алкилбензол сульфонаты) с разветвленными алкильными цепями накапливались в окружающей среде в значительных количествах.

Сейчас в быту применяют неионные моющие вещества, содержащие 30 % поверхностно-активных веществ, а также отбеливатели, ферменты и антикоррозийные добавки. Такие составы быстрее и полностью разлагаются.

Задание 1. Изучить этапы биотехнологической переработки навоза.

Задание 2. Изучить основные методы очистки сточных вод.

Тема № 9-10. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОГАЗА

Вид занятия: практическое.

Цель занятия: изучить основные этапы метаногенеза.

Литература: 1-10

Материальное обеспечение: таблицы, учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы

1. Биотехнология получения биогаза из биомассы (навоза).
2. Практическая реализация полученного биогаза.
3. Самостоятельная подготовка студентов (сообщения по теме).

Биотехнология получения биогаза из биомассы (навоза).

Биогаз – это смесь, содержащая 50-80% метана и 20-50% углекислого газа, также содержащая 1% сероводорода и примеси азота, кислорода, водорода и угарного газа.

Производство биогаза осуществляется периодическим или непрерывным способом в железобетонных или металлических аппаратах для анаэробного культиви-рования, которые называются *биореакторы* или *метантенк*.

Биометаногенез – это процесс превращения биомассы в энергию. Это сложный микробиологический процесс, при котором органическое вещество разлагается до диоксида углерода и метана в анаэробных условиях. В анаэробном процессе биометаногенеза участвуют свыше 190 различных микроорганизмов.

Стадии биометаногенеза:

1) Ферментативный гидролиз. Под действием экстрацеллюлярных ферментов гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения – белки, липиды, полисахариды. Около 76% органических веществ переходит в высшие жирные кислоты, до 20% - в ацетат и 4% в водород.

2) Ацидогенез (кислотообразование). На этой стадии участвуют две группы микроорганизмов: 1-ацетогенные (ферментируют моносахариды, спирты и органические кислоты с образованием H_2 и CO_2 , низших жирных кислот, в основном ацетата, спиртов и некоторых других низкомолекулярных соединений) и 2-гомоацетатные (усваивают H_2 и CO_2 , образуют водород). Образуется 52% ацетата и 24% водорода.

3) Метаногенез. Метаногенные бактерии образуют из ацетата 72% метана, из H_2 и CO_2 - 28% метана.

Для получения биогаза используются отходы сельскохозяйственного производства, испорченные продукты, стоки крахмало-перерабатывающих предприятий, отходы сахарных и спиртовых заводов, бытовые отходы, сточные воды городов.

Задание 1. Зарисовать схему биогазовой установки:

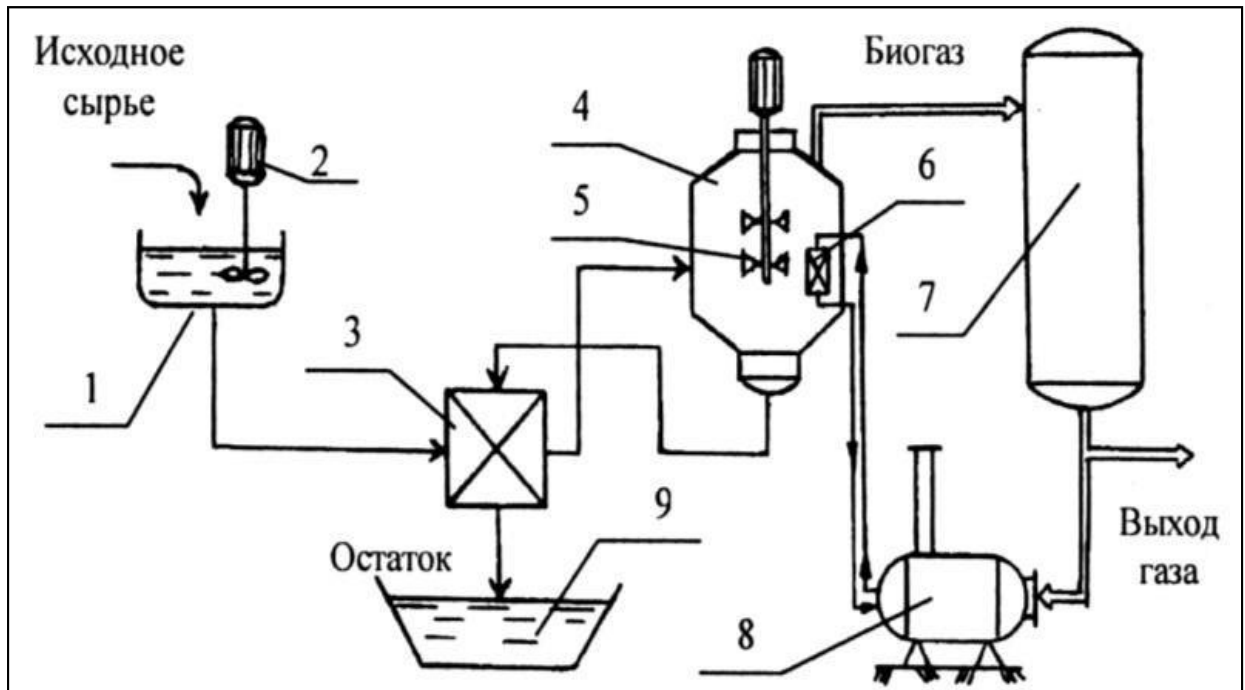


Рисунок 1 - Схема биогазовой установки

Задание 2. Изучить схему действия микробного сообщества при получении биогаза:

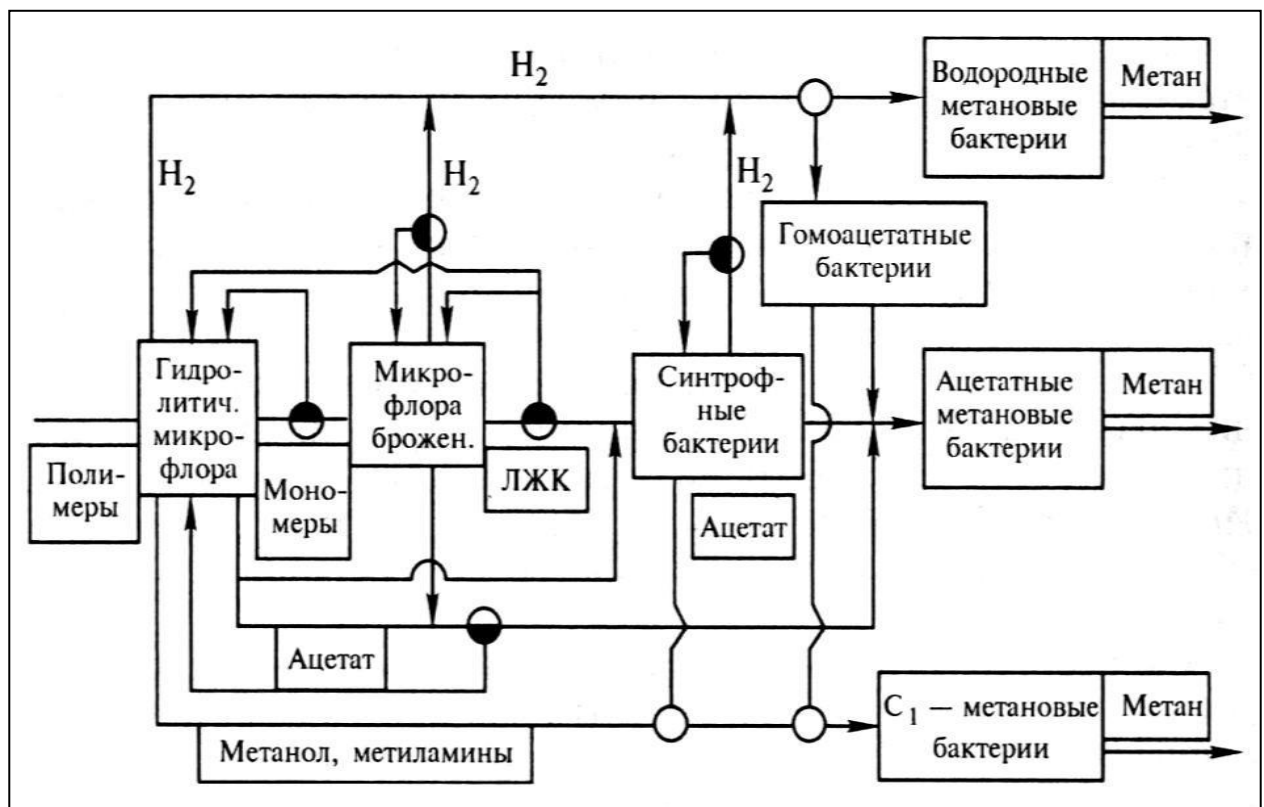


Рисунок 2 - Схема действия микробного сообщества при получении биогаза

Задание 3. Изучить классификацию биогазовых установок:

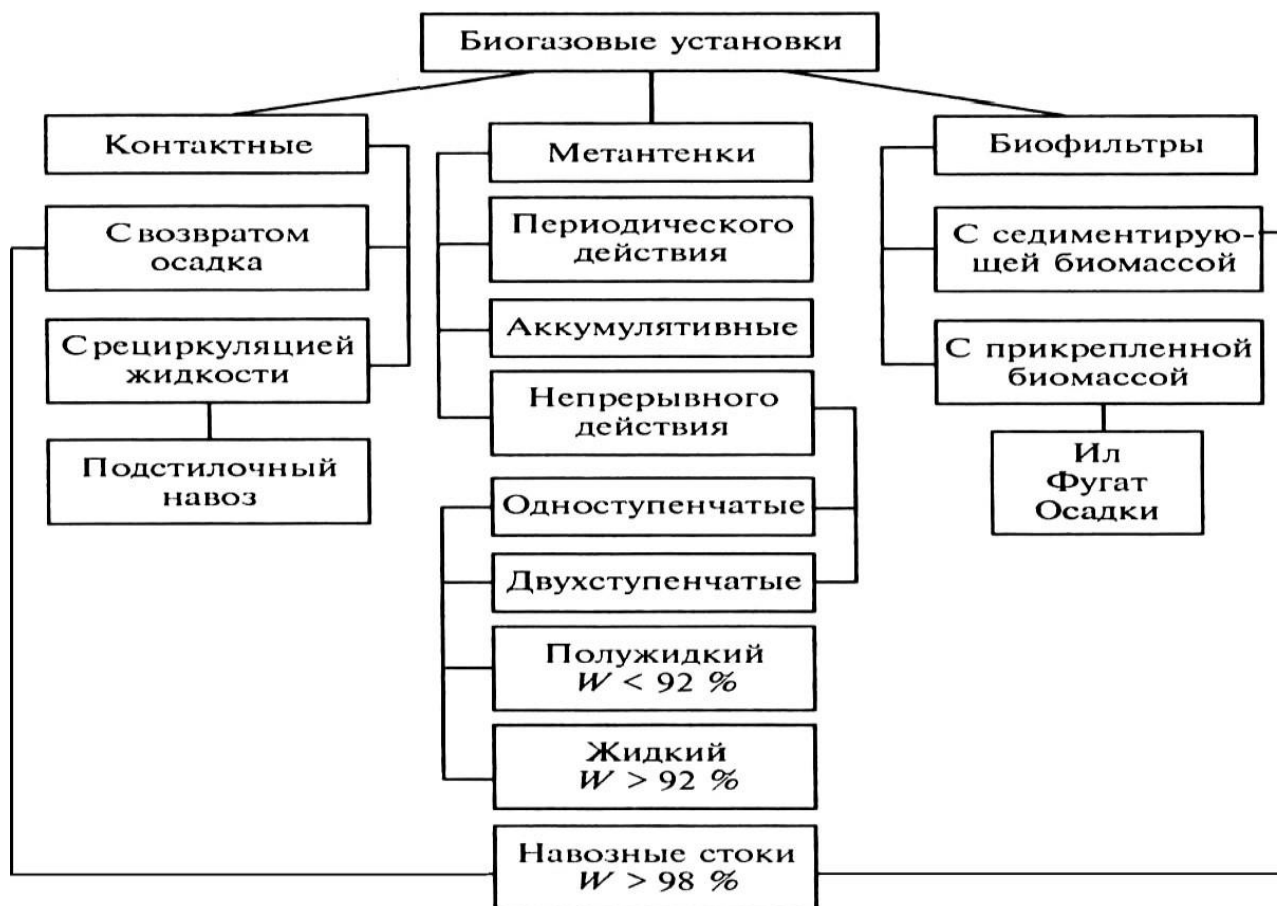


Рисунок 3 – Классификация биогазовых установок

Задание 4. Изучить соотношение теплоты сгорания топлива различных видов:

Таблица 1– Соотношение теплоты сгорания топлива различных видов

Вид топлива (теплота сгорания)	Биогаз (на 1 м ³) с содержанием CH ₄ , %			Природный газ (на 1 м ³)	Пропан (на 1 кг)	Котельное топливо (на 1 кг)	Дизельное топливо (на 1 л)	Электрический ток (на кВт·ч)
	56	62	70					
Биогаз с 56% CH ₄ (20,0 МДж / м ³)	1,00	0,91	0,80	0,60	0,44	0,47	0,56	5,6
Природный газ (33,5 МДж / м ³)	1,68	1,52	1,34	1,00	0,73	0,79	0,93	9,3
Котельное топливо (42,3 МДж / м ³)	2,12	1,91	1,69	1,26	0,78	1,00	1,17	11,7

Задание 5. Изучить показатели выхода биогаза из навоза животных и птицы:

Таблица 2 – Показатели выхода биогаза из навоза животных и птицы

Показатель	Молочные коровы	Птица	Свиньи
Выход навоза, кг/гол/сут	55,0	0,2	3,5
Выход биогаза, м ³ /гол/сут	1,62	0,02	0,32
Объем биогаза, м ³ на 1 т сухого вещества навоза	300	600	500

Тема № 11. Системы GMP, GAP, GLP

Вид занятия: лекция

Цель занятия: изучить основные системы GMP, GAP, GLP

Литература: 1, 2, 3,

Вид занятия: лекция

Материальное обеспечение: учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы

1. Система GMP
2. Система GAP
3. Система GLP

GMP – (Good Manufacturing Practice) – хорошая производственная практика – правила организации производства и контроля качества лекарственных средств, это единая система требований к производству и контролю.

Правила GMP – это руководящий, нормативный документ, которому и производство и фирма обязаны подчиняться.

Правила GMP обязательны для всех предприятий, выпускающих готовые лекарственные формы, продукцию медицинского назначения, а также субстанции.

Самые жесткие требования предъявляются к инъекционным лекарственным препаратам.

В 1969 г. около 100 государств в мире заключили многостороннее соглашения между собой. «Система удостоверения качества фармацевтических препаратов в международной торговле». Система была введена под эгидой Всемирной Организации Здравоохранения. Эта система была введена для оказания помощи органам здравоохранения импортирующих стран в оценке технического уровня производства и качества закупаемых ими лекарственных препаратов. В последующие годы эта система многократно пересматривалась.

В стране должна быть государственная регистрация лекарственных средств;

- в стране должно быть государственное инспектирование фармацевтических предприятий;

- в стране должны быть приняты правила GMP.

Подобно Фармакопеям правила GMP неоднородны. Имеются:

- Международные правила GMP – принимает и разрабатывает Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ).

- Региональные правила GMP – принимают и разрабатывают страны европейского экономического сообщества (ЕЭС).

- Правила GMP ассоциации стран Юго-Восточной Азии.

- Национальные правила GMP – приняты в 30 странах мира.

Международные правила GMP по строгости требований усреднены, в ряде стран правила более либеральные (в соответствии с техническим уровнем производства). В Японии национальные правила GMP строже международных.

Правила GMP имеют 8 разделов: I – Терминология; II – Обеспечение качества; III – Персонал; IV – Здания и помещения; V – Оборудование; VI – Процесс производства; VII – Отдел технического контроля; VIII – Валидация (утверждение).

I раздел «Терминология» состоит из 25 пунктов (определений): фармацевтическое предприятие, лекарственное вещество, лекарственное средство, карантин на сырье, определение чистоты помещений, асептических условий и т.д.

II раздел «Обеспечение качества». Гарантию качества дает руководитель и квалифицированный персонал. Условия обеспечения качества продукции на производстве: четкая регламентация всех производственных процессов; квалифицированный персонал; чистые помещения; современное оборудование; регистрация всех этапов производства и всех проводимых анализов.

III раздел «Персонал»:

- руководящий персонал должен иметь профильное образование и практический опыт по производству лекарственных средств;

- каждый специалист и руководящий работник на предприятии должен иметь строго определенные функции;

- не руководящий персонал должен иметь график подготовки и переподготовки и график должен быть зарегистрирован;

- требования соблюдения личной гигиены, гигиена и поведение регламентируются.

IV раздел «Здания и помещения»:

- производство должно располагаться вне жилых зон;

- требуется исключить пересечение технологических линий;

- производство бета-лактамовых антибиотиков должно осуществляться в отдельном помещении (для исключения аллергических реакций);

- классификация помещений по степени загрязненности механическими и микробными частицами;
- помещения должны быть сухими;
- помещения для производства и контроля качества должны иметь гладкие поверхности, доступные для мытья и дезинфекции;
- должны быть ультрафиолетовые установки (стационарные и переносные);
- для производства стерильных лекарственных средств соединения между стенами и потолками должны быть закругленными;
- давление внутри помещений должно быть выше, чем снаружи на несколько мм ртутного столба;
- должен быть минимум открытых коммуникаций;
- не должно быть скользящих дверей, двери должны быть загерметизированы;
- помещения для хранения сырья должны быть отделены от цехов производства.

V раздел «Оборудование»:

- оборудование должно быть адекватно технологическому процессу;
- оборудование должно размещаться так, чтобы его можно было легко эксплуатировать;
- все регистрирующие приборы должны быть откалиброваны;
- поверхность оборудования должна быть гладкой, не корродирующей, не должна реагировать с веществами, задействованными в производстве;
- должно быть рациональное и продуманное размещение оборудования – у персонала не должно быть лишних переходов в процессе работы;
- оборудование должно регулярно проходить профилактический осмотр, что регистрируется в журналах;
- оборудование для производства бета-лактамовых антибиотиков должно быть отдельным.

VI раздел «Процесс производства»:

- должен быть сертификат качества на сырье;
- перед отправлением на производство партия сырья проверяется;
- выдача сырья регистрируется;
- сырье подвергается проверке на микробную контаминацию или стерильность;
- производственный процесс должен быть так построен, чтобы все было согласовано и безаварийно;
- поэтапный контроль процесса производства и его регистрация в журналах (сырье – полупродукты – рабочее место – операции – технологический режим и т.д.). Порядок регистрации регламентируется, все записи делаются сразу после контроля и результаты хранят не менее 1 года.

VII раздел «Отдел контроля качества» (ОТК) – обязательный для фармацевтических предприятий. ОТК руководствуется государственными и отраслевыми документами, регламентирующими его деятельность

Задачи ОТК: не допускать выпуска брака; укреплять производственную дисциплину. ОТК контролирует сырье и полупродукты, участвует в планировании и проведении постадийного контроля и хранит образцы каждой серии продукции не менее 3-х лет.

VIII раздел «Валидация»:

Валидация – это оценка и документальное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукции установленным требованиям.

Директор предприятия специальным приказом назначает руководящего сотрудника или специалиста со стороны для проверки качества работы какого-либо цеха, технологической линии и т.д.

Валидация может быть периодическая (проводится постоянно) и внеплановая (при чрезвычайных происшествиях, при изменении технологии).

Валидация позволяет установить:

- соответствует ли технологический процесс регламенту;
- соответствует ли качество готовой продукции требованиям нормативной технологической документации;
- соответствует ли оборудование производственным целям;
- каков предел возможности производственного процесса.

Валидация оценивает сам процесс и предел возможных отклонений. При этом составляется отчет, если имеются какие-либо несоответствия или нарушения – то производственный процесс прерывается.

На биотехнологическом производстве внеплановая валидация проводится, если производство меняет штамм продуцента; изменена питательная среда (так как изменяется метаболизм продуцента, и он может давать примеси).

GCP – (Good Clinical Practice) – хорошая клиническая практика – правила организации клинических испытаний.

GCP – правила организации клинических испытаний.

Лекарственное средство допускается к клиническим испытаниям только после проведения лабораторных испытаний.

В правилах GCP изложены права больных и добровольцев:

- испытуемые должны быть информированы о том, что им вводится новый лекарственный препарат и о его свойствах;
- больные имеют право на финансовое вознаграждение;
- должен быть контроль за ходом испытаний со стороны медиков.

В Европе, Соединенных Штатах Америки (США) и России введены общественные комитеты по контролю за клиническими испытаниями лекарственных препаратов. В эти комитеты входят священники, представители милиции и прокуратуры, медицинской общественности, которые наблюдают за испытаниями лекарственных препаратов.

Цель клинических испытаний – получение достоверных результатов: лекарство лечит, оно безвредно и т.д.

Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice; GCP) представляет собой международный этический и научный стандарт планирования и проведения исследований с участием человека в качестве субъекта, а также документального оформления и представления результатов таких исследований.

Соблюдение указанного стандарта служит для общества гарантией того, что права, безопасность и благополучие субъектов исследования защищены, согласуются с принципами, заложенными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (ВМА), и что данные клинического исследования достоверны.

Целью настоящего национального стандарта является установление единых со странами Европейского Союза, Соединенными Штатами Америки и Японией правил, что должно способствовать взаимному признанию данных клинических исследований уполномоченными органами названных стран.

GLP – (Good Laboratory Practice) – хорошая лабораторная практика – правила организации лабораторных направлений.

GLP – правила организации лабораторных исследований.

Новое лекарственное средство необходимо подвергнуть лабораторным испытаниям, прежде чем приступить к проведению клинических испытаний.

Лабораторные испытания (*in vitro*, *in vivo*) проводятся на клетках, бесклеточных системах и животных.

При испытании на животных можно получить различные результаты, поэтому важна правильная организация исследований.

Животные должны быть гетерогенны (разные), корм должен быть постоянным, одинаковым; требуется определенная планировка вивария, чтобы исключить стресс у животных; животные должны быть жизнеспособны

В целях организации качественного проведения доклинических испытаний лекарственных и других биологически активных веществ в промышленно развитых странах (Англия, Германия, США, Франция, Япония и др.) утверждены единые правила «добротной лабораторной практики» (Good Laboratory Practice, GLP).

GLP представляет собой международный стандарт при доклинической разработке новых лекарственных средств. До проведения клинических исследований безопасность медицинских средств проверяется на животных. В международной практике испытания безопасности лекарственных препаратов, производимых в разных странах и в разных производственных условиях биотехнологической или фармацевтической фирм, осуществляются в соответствии с требованиями GLP.

Существует группа GLP в Европейском Центре по экологии и токсикологии химической промышленности; в США система GLP действует с 1979 г. В настоящее время стандарты GLP вводятся и в России.

Так, в частности государственная регистрация, сертификация и контроль за обеспечением надлежащих условий производства, транспортировки, хранения и применения медицинских иммунологических препаратов

осуществляется Государственным институтом стандартизации и контроля им. Л.А. Тарасевича.

В РФ в настоящее время действуют только три сертифицированных по GLP функционирующих испытательных лабораторий или центров. На базе Пущинского филиала ИБХ РАН с 1995 г. действует Российский национальный центр доклинических испытаний медицинских препаратов по международному стандарту GLP, созданный на инвестиционные средства Международного научно-технического центра (МНТЦ). Площадки и технологические модули в режиме GLP имеются также в Институте молекулярной биологии и вирусологии (Центр «Вектор») в п. Кольцово Новосибирской обл. и в Институте прикладной микробиологии и биотехнологии в п. Оболенск Московской обл.

Главными в системе GLP для Российского национального центра являются следующие основные действия и инфраструктурные компоненты инженерного обеспечения работы испытательного комплекса:

- заблаговременная разработка стандартной методики проведения испытаний (Standard Operating Procedure, SOP) применительно ко всем ее этапам;

- назначение руководителя и ответственных за каждый вид испытаний;

- ведение специального протокола с результатами выполнения операций;

- проведение внутренней инспекции службой качественной оценки испытаний (Quality Assurance Unit, QAU);

- обеспечение работы подразделения – Биоцентра;

- обеспечение работы подразделения – Главного питомника;

- обеспечение работы подразделения – Лабораторного корпуса.

Биоцентр включает в себя два барьерных питомника лабораторных животных (общая площадь 2700 м² и 640 м², производительность – 70 тысяч животных в год) и лабораторный корпус биомедицинских исследований (общая площадь 2450 м²). Все здания и помещения спроектированы и построены в соответствии с рекомендациями GLP. Питомники барьерного типа предназначены для разведения и массового размножения линейных лабораторных животных (мыши, крысы, кролики, морские свинки) категорированного генетического и гигиенического качества (Specific Pathogens Free, SPF; Virus Antibody Free, VAF).

Главный питомник имеет две независимые, полностью изолированные барьерные зоны, расположенные в разных уровнях на противоположных сторонах здания. Это позволяет избегать перекрестных загрязнений. В барьерной зоне первого этажа имеются 11 комнат содержания животных по 18 м² каждая для мелких грызунов, 4 комнаты по 36 м² барьерной зоны второго этажа используются для разведения и содержания морских свинок и кроликов. На первом этаже имеется полностью изолированная зона карантинирования вновь поступающих животных. Персонал по уходу за животными попадает в чистую зону через шлюз после санитарно-гигиенической обработки и одевания в стерильную спецодежду.

Клетки, поилки, стеллажи, корма, материал подстилки и прочие принадлежности подвергаются стерилизации и передаются в чистую зону через проходные автоклавы. Кондиционированный воздух, прошедший три ступени очистки (99,95 %), попадает в комнату содержания сверху, а выводится через низ.

Соотношение подаваемого системой вентиляции воздуха и выходящего – 15:10 объемов в час, что обеспечивает во всех комнатах содержания животных избыточное давление по сравнению с коридором чистой зоны. Микропроцессорная система контролирует в комнатах содержания давление, температуру, относительную влажность воздуха, а также освещенность. Для аварийных ситуаций системы вентиляции и фильтрации продублированы. В конвенциональной зоне находятся моечно-стерилизационный блок и лаборатория патоморфологического мониторинга.

Лабораторный корпус имеет две изолированные зоны: конвенциональная (лабораторная) общей площадью 1910 м² и зона гигиенического барьера для содержания экспериментальных животных общей площадью 640 м². В конвенциональной зоне расположены лабораторные боксы бактериологического и вирусологического анализа, бокс для клеточных работ, лабораторные комнаты токсикологической биохимии. В чистой зоне находятся 14 комнат содержания экспериментальных животных, лаборатории пирогенности и для физиологических и фармакологических исследований.

Технологическое оборудование обеспечивает поддержание барьерных условий в чистой зоне на том же уровне, что и в главном питомнике.

Персонал Биоцентра наряду с технологией разведения (размножения) лабораторных животных статуса SPF и VAF способен проводить следующие исследования и анализы:

- общая токсичность (острая, подострая и хроническая);
- иммунотоксичность и аллергенность;
- эмбриотоксичность и тератогенность;
- цитотоксичность и мутагенность;
- канцерогенность;
- биохимическая токсикология;
- пирогенность;
- фармакокинетика и фармакодинамика.

Специфическая биологическая активность новых препаратов изучается по их воздействию на следующие системы организма и процессы:

- иммунная система;
- сердечно-сосудистая система;
- нервная система;
- общий метаболизм;
- водно-солевой метаболизм;
- противовоспалительное действие;
- противоопухолевое действие.

Во время пуска всего комплекса (Центра) в эксплуатацию в качестве тестового объекта были проведены доклинические испытания нового пептидного препарата С-1-6 – синтетического аналога фрагмента человеческого интерлейкина-2 (IL-2). Создан полный комплект документации практического регламента GLP применительно к принятым условиям. Создана электронная система слежения и безопасности главного питомника и корпуса биомедицинских исследований.

Одобренный препарат после лабораторных доклинических испытаний по системе GLP и последующей клинической проверки может быть разрешен к выпуску в условиях промышленного производства. Для обеспечения изготовления высокого качества биопродукта последний должен пройти стадию производства, удовлетворяющей следующему системному международному стандарту – «добротной производственной практике» (Good Manufacturing Practice, GMP).

Тема № 12. Контроль применения биотехнологических методов

Цель занятия: изучить основы контроля биотехнологических методов

Литература: 6, 7,8,9,10

Вид занятия: лекция

Материальное обеспечение: учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы:

1. Контроль биотехнологических методов
2. Понятие о биоэтике и биобезопасности

В настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. Так, в России Федеральный Закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят 5 июня 1996 г. (№ 86 – ФЗ). В этом законе установлены четыре уровня риска возможного потенциально вредного воздействия генно-инженерной деятельности на здоровье человека:

– уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность для здоровья и сопоставимы с риском при работе с непатогенными микроорганизмами;

– уровень риска соответствует работам, которые представляют незначительную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с условно-патогенными микроорганизмами;

– риск работ, которые представляют умеренную опасность для здоровья человека и сопоставимы с опасностью при работах с микроорганизмами, потенциально способными к передаче инфекции;

– уровень риска соответствует работам, которые представляют опасность при работах с возбудителями особо опасных инфекций.

В законе определены требования к лицам, осуществляющим генно-инженерную деятельность; требования по стандартизации и сертификации генно-инженерной продукции (услуг); закон определяет ответственность юридических и физических лиц, осуществляющих генно-инженерную деятельность и пр. С 2001 г. в России установлена система обязательной маркировки пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников.

Это обеспечивает условия выбора гражданами продовольственной и другой продукции с учетом ее генетической природы и личного отношения каждого к такой продукции.

Для производства и реализации всех товаров, в т.ч. полученным из ГМО, обязательным является их стандартизация. Госстандарт России предложил создать Федеральную программу «Проблемы производства и реализации продуктов питания, полученных из генно-модифицированных источников пищи».

Главная задача этой программы – нормативное и нормативно-методическое обеспечение качества и генетической безопасности генно-инженерно-модифицированных продуктов питания и продовольственного сырья.

Приоритетным направлением в области нормативного обеспечения является разработка «Концепции стандартизации генно-модифицированных продуктов», внесение изменений в действующую нормативную документацию на пищевую продукцию, продовольственное сырье и методы испытания, в частности включение дополнительных требований по генетической чистоте, идентификации и маркировке генно-модифицированных продуктов питания; на пороговые уровни потребления для человека ГМ-продуктов питания.

Необходимо разработать правила и порядок оценки соответствия ГМ-продуктов питания требованиям генетической безопасности; нормативных документов по государственному контролю и надзору за производством, хранением, реализации и обращением ГМ-продуктов.

Понятие о биоэтике и биобезопасности

Биологическая технология коренным образом изменяет фундаментальные свойства организмов: наследственность, изменчивость, энерго- и массообмен, адаптацию и устойчивость, продуктивность и качество.

Такое искусственное вмешательство в строго запрограммированные генетические структуры не позволяют всегда точно прогнозировать возможные последствия. Это, естественно, вызывает большое беспокойство людей во многих странах, что может серьезно затормозить развитие биотехнологии и особенно биоинженерии.

Однако оснований для этого нет, о чем, в частности, свидетельствует развитие новейшей биотехнологии уже на протяжении пятидесяти лет. На

человека и среду его обитания постоянно действуют природные, техногенные и другие факторы.

Если они действуют отрицательно, то наука, общество и государство должны им эффективно противодействовать, т.е. обеспечить безопасность человека – состояние защищенности жизненно важных интересов личности и самой жизни.

Безопасность человека не может быть обеспечена без защиты среды его обитания и жизнедеятельности. Безопасность может быть биологической, экологической, экономической, продовольственной, военной и т.д.

Важнейшей составной частью безопасности является биобезопасность. Биобезопасность – это защищенность человека и окружающей среды от вредного воздействия различных биологических соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктов.

Биобезопасность важна не только для человека, но и для растений, животных и полезных микроорганизмов. В самом деле, биологически опасные организмы и продукты их жизнедеятельности могут лишить человека продовольственных и других источников и возможностей существования. Поэтому разработаны различные методы контроля за технологическими процессами и качеством биологических веществ, вновь вовлекаемых в сферу использования человеком. Особую опасность для здоровья и жизни людей представляет алкогольная интоксикация, наркомания и ядовитые грибы.

Манипуляции с растительными и животными клетками и их органеллами основаны на фундаментальных свойствах клеток и тканей, тотипотентности, соматической гибридизации, дифференциации и дедифференциации.

В клеточных технологиях постоянно используется спонтанный и направленный мутагенез. Это приводит к генетической гетерогенности клеток. Исходя из этого, в клеточных биотехнологиях должен быть построенный мониторинг полученных мутантов. Они должны иметь устойчивые генотипы, ибо распространение неустойчивых мутантов может привести, например, в сельском хозяйстве к большим потерям урожая.

Биотехнологические процессы нужно непрерывно контролировать и своевременно выявлять возможные отклонения от нормы основных параметров и качества продукции.

Показано, что при работе с животными тканями и клетками возможно накопление токсических веществ, необычных продуктов метаболизма, в т.ч. при их хранении.

Считают, что клеточная биотехнология растений (селекция сортов, получение продуктов для фармацевтической и пищевой промышленности) более безопасна, чем использование клеточных и тканевых технологий в животноводстве, где нужен более жесткий контроль и управление.

При проведении ДНК-биотехнологии важной проблемой является возможность получения мутантов с содержанием токсичных или аллергенных

для человека белков или других опасных соединений. Не исключено, что при трансгенезе могут активироваться «молчащие» гены, поэтому вероятно появление генотипов, опасных для здоровья и жизни человека.

Возможность появления таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных, синтетических генов для трансгенных растений, животных и микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами.

Не исключено также взаимодействие полученных модифицированных генов с генами третьих генотипов, что может привести к становлению новых генотипов с опасными свойствами для людей и окружающей среды.

Однако 40 лет интенсивных работ в области новейшей биотехнологии – генетической инженерии – показывают их безопасность. Это объясняется исходя из следующих основных положений:

1. В биоинженерных работах используются природные гены, которые за все время эволюции подвергались отбору, элиминации, рекомбинации и т.д. В результате этого выработались механизмы, которые обеспечивают устойчивый характер репарации биосинтеза белков и их качества.

2. В биоинженерных лабораториях постоянно проводится мониторинг за качеством получаемых трансгенных организмов.

Это позволяет заблаговременно, на этапе создания генетически-модифицированных объектов (ГМО) в лаборатории, выявить опасные генотипы и не допускать их в производство.

3. Для создания ГМО используются проверенные гены и их регуляторные генетические структуры, что позволяет получать трансгенные организмы с заданными свойствами.

Тема 12. О НАДЗОРЕ ЗА ПИЩЕВЫМИ ПРОДУКТАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ГМО

Вид занятия: практическое.

Цель занятия: изучить положения, законы о надзоре за ГМО в пищевых продуктах.

Литература: 1-10

Материальное обеспечение: учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы

1. Оценка безопасности пищевых продуктов
2. Маркировка пищевых продуктов

По данным Роспотребнадзора, Российская система оценки безопасности пищевых продуктов, содержащих генно-инженерно-модифицированные организмы (ГМО) является одной из самых современных в мире. В отличие от подходов, принятых в Европейском Союзе и США, в Российской Федерации оценка безопасности ГМО включает проведение полного спектра исследований, выполнение каждого из которых обязательно и включает оценку возможных

аллергенных, иммуномодулирующих и мутагенных свойств пищевого продукта, изучение показателей его качества и безопасности.

Согласно п.9 главы 2 технического регламента Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (ТР ТС 021/2011) при производстве (изготовлении) пищевой продукции из продовольственного (пищевого) сырья, полученного из ГМО растительного, животного и микробного происхождения, должны использоваться линии ГМО, прошедшие государственную регистрацию.

В настоящее время в РФ 72 пищевых продукта, полученных с применением ГМО прошли полный цикл оценки безопасности и зарегистрированы Роспотребнадзором, из них 36 растительного происхождения (соя, кукуруза, рис, свекла) 2 биологически-активные добавки и 34 ферментных препарата.

Согласно п.4.11. «Требования к указанию в маркировке сведений о наличии в пищевой продукции компонентов, полученных с применением генно-модифицированных организмов», утвержденного Техническим регламентом Таможенного союза "Пищевая продукция в части ее маркировки" (ТР ТС 022/2011), потребитель должен знать:

1. Для пищевой продукции, полученной с применением ГМО, в том числе не содержащей дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и белок, должна быть приведена информация: "генетически модифицированная продукция" или "продукция, полученная из генно-модифицированных организмов", или "продукция содержит компоненты генно-модифицированных организмов".

В случае, если изготовитель при производстве пищевой продукции не использовал генно-модифицированные организмы, содержание в пищевой продукции 0,9 процентов и менее ГМО является случайной или технически неустранимой примесью, и такая пищевая продукция не относится к пищевой продукции, содержащей ГМО. При маркировке такой пищевой продукции сведения о наличии ГМО не указываются.

2. Для пищевой продукции, полученной из генно-модифицированных микроорганизмов (бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов, генетический материал которых изменен с применением методов генной инженерии) (далее - ГММ) или с их использованием, обязательна информация:

- для содержащих живые ГММ - "Продукт содержит живые генно-модифицированные микроорганизмы";

- для содержащих нежизнеспособные ГММ - "Продукт получен с использованием генно-модифицированных микроорганизмов";

- для освобожденных от технологических ГММ или для полученных с использованием компонентов, освобожденных от ГММ, - "Продукт содержит компоненты, полученные с использованием генно-модифицированных микроорганизмов".

3. В маркировке пищевой продукции сведения о наличии ГМО не указываются в отношении использованных технологических вспомогательных средств, изготовленных из или с использованием ГМО.

С целью контроля содержания ГМО в отечественной и импортной пищевой продукции, по поручению Управления Роспотребнадзора по Самарской области, аккредитованной лабораторией ФБУЗ» Центр гигиены и эпидемиологии в Самарской области» в 2015 и 1 полугодии 2016 года проведено 777 исследований различного вида пищевой продукции на содержание ГМО, из них 27 импортного производства. При этом содержание в продуктах ГМО более 0,9 % не обнаружено.

В целях усиления ответственности за несоблюдение требований к маркировке пищевой продукции, содержащей сведения о получении её с использованием ГМО или содержащей такие организмы ФЗ-521 от 01.12.2014 в КоАП РФ внесена дополнительно ст.14.46.1 «Нарушение обязательных требований к маркировке пищевой продукции, полученной с применением генно-инженерно-модифицированных организмов или содержащей такие организмы, в части сведений о наличии в пищевой продукции компонентов, полученных из генно-инженерно-модифицированных организмов или с использованием таких организмов», нарушение требований которой влечет наложение административного штрафа :

на индивидуальных предпринимателей - от двадцати тысяч до пятидесяти тысяч рублей с конфискацией предметов административного правонарушения или без таковой;

на юридических лиц - от ста тысяч до трехсот тысяч рублей с конфискацией предметов административного правонарушения или без таковой.

Тема 13-14. ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОНТРОЛЬ И ГОСРЕГУЛИРОВАНИЕ В ОБЛАСТИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Вид занятия: практическое.

Цель занятия: изучить методику контроля при проведении экспертизы ГИММ

Литература: 1-10 и дополнительная

Материальное обеспечение: учебно-методическое пособие.

Контрольные вопросы:

1. *Этапы стандартной проверки токсикологической и экологической безопасности микроорганизмов, предназначенных для использования в биотехнологии сельского хозяйства*

2. *Разделы производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов для культивирования и выпуска в окружающую среду на территории Российской Федерации.*

3. *Список микроорганизмов, имеющих длительную историю безопасного применения*

4. *Область применения методики*

5. *Общие положения*

6 Проведение экспертизы

7. Мониторинг информации о последствиях промышленного использования ГММ

8. Требования к информации, предоставляемой Заявителем.

9. Группы штаммов-реципиентов.

Раздел 1.

Методические указания для проведения экспертизы генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов, предназначенных для использования в замкнутых промышленных системах

I. Область применения

1. Настоящие методические указания определяют порядок проведения экспертизы (включая молекулярно-генетические исследования и оценку биологической безопасности) генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (далее - ГММ), предназначенных для использования в замкнутых промышленных системах, осуществляемых в целях их государственной регистрации.

2. К ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации, относят микроорганизмы, генетический материал которых изменен с использованием методологии генетической инженерии, за исключением случаев, когда:

- осуществляется мутагенез с использованием любых генетических конструкций, не связанный с внесением чужеродной ДНК, в результате которого происходит ослабление или усиление активности генов, приводящих к уменьшению или увеличению синтеза веществ, присутствующих в данном микроорганизме;

- *invitro* воспроизводятся известные естественные процессы, происходящие эффективно *invivo*, например, перенос ДНК между микроорганизмами одного таксономического вида или таксономически близких видов;

- в микроорганизм-реципиент переносится чужеродная ДНК, содержащая только охарактеризованные некодирующие регуляторные области.

II. Общие положения

3. Экспертиза основана на анализе сведений о генно-инженерно-модифицированных микроорганизмах (далее - ГММ), предоставляемых лицом (физическим или юридическим, независимо от формы собственности), уполномоченным собственником ГММ подавать заявку и осуществлять от его лица все действия по государственной регистрации ГММ (далее - Заявитель).

4. Ответственность заявителя за предоставляемую информацию о ГММ и условиях планируемого использования определяется в соответствии с законодательством Российской Федерации.

5. Экспертиза не предполагает проведение обязательных экспериментальных проверок данных, предоставленных Заявителем. При этом

обеспечивается возможность проверки сведений, предоставляемых Заявителем путем депонирования стандартного образца штамма ГММ в уполномоченной коллекции на территории РФ.

6. При проведении экспертизы определяются:

- правильность отнесения штамма к ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации;
- выполнение обязательных требований, предъявляемых к внесенному генетическому материалу (в соответствии с приложением N 1 к методическим указаниям);
- соответствие действующим нормативам результатов стандартных проверок, предусмотренных для штаммов (не ГММ), предназначенных для использования в промышленности (перечень стандартных проверок приведен в приложении N 2 к методическим указаниям).
- необходимые меры обеспечения биобезопасности при промышленном использовании регистрируемого штамма ГММ и их соответствие мерам физической защиты, предлагаемых заявителем.

7. Организация, осуществляющая экспертизу, несет ответственность за качество проведенной экспертизы (включая учет всех возможных факторов риска) и за обоснованность требований к биобезопасности, в частности, в тех случаях, когда необоснованно завышенные требования к обеспечению биобезопасности понижают конкурентоспособность биотехнологий, основанных на использовании ГММ.

8. Экспертиза проводится профессиональными экспертами из уполномоченных государственных организаций. При анализе представленных сведений, эксперт делает вывод об их достоверности и полноте, в случае возникновения сомнений, вправе предъявить обоснованные претензии. При этом эксперт может потребовать проведение экспериментальной проверки представленных сведений в аккредитованной испытательной лаборатории.

9. Проведение экспертизы ГММ осуществляют БРЦ*, имеющие в своем штате высококвалифицированных специалистов в области обеспечения биологической безопасности при использовании ГММ в промышленных масштабах.

* биоресурсные (в области микробных биоресурсов) центры (БРЦ)- государственные научные организации (или подразделения в составе государственной научной организации), основная деятельность которых связана с выполнением закрепленных государственно-значимых функций в области микробных биоресурсов (генетических ресурсов), включающих стандартизацию штаммов микроорганизмов, использующихся в промышленности; формирование, поддержание и обеспечение регулируемой доступности национального коллекционного фонда микробных биоресурсов на всей территории Российской Федерации.

10. Функции БРЦ.

БРЦ осуществляют экспертизу (подробное описание этапов процедуры экспертизы и регистрации приведено в Приложении N 3 к методическим указаниям), состоящую из следующих этапов:

- приёмка документов от Заявителя, которые должны содержать сведения, приведенные в Приложении N 4 к методическим указаниям;

- депонирование штамма ГММ;

- подготовка паспорта штамма ГММ, в котором должна содержаться информация об отнесении к ГММ подлежащим регистрации и о выполнении обязательных требований при конструировании ГММ (перечень обязательных требований к внесенному генетическому материалу приведен Приложении N 1 к методическим указаниям);

- проверка валидированной методики определения регистрируемого штамма ГММ

- проведение экспертизы;

- подготовка экспертного заключения о возможности промышленного использования ГММ

- подготовка Досье на штамм ГММ на основе паспорта штамма, результатов экспертизы (молекулярно-генетических исследований и оценки биологической безопасности) и данных о регистрируемом штамме ГММ;

- подготовка дополнительных рекомендаций для разработчиков ГММ на основании анализа опыта использования различных ГММ;

- подготовка рекомендаций о необходимом объеме проведения экспертизы продукции, полученной с использованием или содержащей регистрируемый ГММ.

- анализ результатов мониторинга использования ГММ.

III. Проведение экспертизы

11. На основании данных, представленных Заявителем, БРЦ определяет:

- относится ли регистрируемый штамм к ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации в соответствии с пунктом 4 настоящих методических указаний;

- соответствие регистрируемого штамма ГММ обязательным требованиям;

12. БРЦ, в течение установленного срока готовит экспертное заключение о возможности промышленного использования ГММ.

В случае принятия отрицательного решения аргументируют свое заключение и возвращают документы Заявителю, а в случае положительного - выдают экспертное заключение о возможности регистрации.

13. В зависимости от группы, к которой относится штамм-реципиент (группы штаммов- реципиентов приведены в Приложении N5 к методическим указаниям) при проведении экспертизы определяются необходимые меры физической защиты.

В международной практике используется 3 уровня физической защиты для обеспечения биобезопасности при промышленном использовании ГММ (описание уровней физической защиты приведено в Приложении N6 к методическим указаниям).

В случае использования при конструировании ГММ рекомендованного штамма-реципиента применяется первый (минимальный) уровень физической защиты.

В остальных случаях при проведении экспертизы устанавливается необходимый уровень физической защиты и соответствие его требований мерам предлагаемым Заявителем.

14. Результаты экспертизы биобезопасности ГММ, полученные в зарубежных экспертных организациях, принимаются во внимание, но не являются определяющими при вынесении решения.

15. В процессе экспертизы БРЦ может запрашивать дополнительную информацию о ГММ или способах его использования, которая является существенной для определения биобезопасности использования ГММ.

В случае выявления при проведении экспертизы противоречий в представленных документах, а также недостаточности данных, процедура экспертизы штамма ГММ приостанавливается, о чем в течение 3 дней в письменной форме БРЦ уведомляет Заявителя, с указанием перечня необходимых изменений для устранения недостатков в документации. Срок, на который приостанавливается процедура, не может превышать 90 дней. В случае невозможности устранения в указанный срок Заявителем выявленных несоответствий проведение экспертизы прекращается и Заявителю выдается отрицательное заключение.

16. При отрицательном решении БРЦ о возможности промышленного использования регистрируемого штамма ГММ, Заявителю представляется аргументированный отказ с указанием его причин и путей возможного устранения недостатков.

17. В случае если Заявителем устранена причина, в соответствии с которой БРЦ было вынесено отрицательное заключение, проведение повторной экспертизы возможно не ранее, чем через 30 дней с момента получения такого заключения.

IV. Мониторинг информации о последствиях промышленного использования ГММ

18. Мониторинг осуществляется федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим регистрацию ГММ, а также организациями, осуществляющими проведение экспертизы, и иными уполномоченными Правительством Российской Федерации федеральными органами исполнительной власти.

19. Мониторинг осуществляется на основании данных программ производственного контроля, а также проверок, предусмотренных действующими санитарными правилами и нормативами.

Результаты мониторинга предоставляются БРЦ для рассмотрения в предусмотренном порядке.

Эксперты, осуществляющие анализ результатов мониторинга, оценивают всю поступающую информацию, включая обращения граждан.

20. Любое физическое или юридическое лицо имеет право обратиться в, федеральный орган исполнительной власти, осуществляющий регистрацию ГММ, или в организации, осуществляющие проведение экспертизы с заявлением о негативном воздействии ГММ на здоровье населения и окружающую среду.

Обращения физических или юридических лиц рассматриваются в два этапа:

на первом этапе проводится предварительная оценка обращения и его обоснованность (в случае отсутствия обоснований негативного воздействия на здоровье населения и окружающую среду дальнейшее рассмотрение обращения не осуществляется).

на втором этапе выявляются причины негативного воздействия, и производится корректировка мер обеспечения биобезопасности вплоть до аннулирования регистрации конкретного ГММ и прекращения его промышленного использования.

21. Рассмотрение результатов мониторинга проводится БРЦ.

На основании результатов мониторинга промышленного использования ГММ может осуществляться корректировка требований к обеспечению биобезопасности производства.

22. По результатам мониторинга БРЦ может внести изменения в экспертное заключение в связи с получением дополнительной информации о биобезопасности промышленного использования ГММ. При этом организации, осуществляющие проведение экспертизы, направляют соответствующее уведомление в уполномоченный орган, осуществивший регистрацию данного ГММ.

V. Приложения

Приложение N 1

К Методическим Указаниям

Требования к внесенному генетическому материалу

Для государственной регистрации штамма ГММ обязательно выполнение всех требований, предъявляемых к внесенному генетическому материалу.

1. Лимитированный размер. Внесенный чужеродный генетический материал должен состоять только из следующих компонентов:

1.1. Структурного гена(ов)

1.2. Регуляторной последовательности, позволяющей экспрессировать только структурный ген(ы),

1.3. Ассоциированных нуклеотидных последовательностей, необходимых для генно-инженерных манипуляций, стабильности и экспрессии вносимого генетического материала, включая линкеры, гомополимеры, адапторы, транспозоны, сайты рестрикционных ферментов.

2. Характеристика генетического материала должна содержать следующую информацию:

2.1. нуклеотидная последовательность внесенного генетического материала;

2.2. функции всех продуктов, синтез которых контролируется или определяется (кодируется) внесенным генетическим материалом;

2.3. функции последовательностей, которые участвуют в регуляции экспрессии внесенного генетического материала;

2.4. отсутствие ассоциированных нуклеотидных последовательностей, за исключением перечисленных в пункте 1.3.

3. Отсутствие определенных последовательностей. Такое свойство внесенной последовательности должно означать, что в нее и, соответственно, в реципиент не должны попасть последовательности, кодирующие опасные токсины или их функционально значимые фрагменты (Список опасных токсинов *).

4. Низкая способность к мобильности. Это требование необходимо для обеспечения низкой частоты переноса генетического материала в другие микроорганизмы из окружающей среды. Такой перенос возможен за счет конъюгации, трансдукции или трансформации, при этом генетический материал может попасть в различные популяции микроорганизмов, свойства которых уже невозможно будет предсказать. Допустимая частота переноса ДНК меньше 10⁻⁸.

Использование перечисленных критериев для внесенного генетического материала позволяет минимизировать риск от попадания в реципиент не охарактеризованного генетического материала и от непрогнозируемых последствий генетической модификации.

Заявитель должен предоставить описание проведенных генно-инженерных манипуляций, полную нуклеотидную последовательность внесенного генетического материала с указанием всех элементов и их функций.

* В Российской Федерации до настоящего времени нет подобного списка. За основу можно взять список токсинов из Указа Президента Российской Федерации от 20.08.2007 N 1083 "Об утверждении списка микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю" и дополнить его токсинами, перечисленными в правилах TSCA в секции 725.421. (<http://www2.epa.gov/laws-regulations/summary-toxic-substances-control-act>)

Перечисленные в списке токсины обладают высокой токсичностью и по своей структуре являются полипептидами. Другие виды токсинов (модифицированные аминокислоты, гетероциклические соединения, комплексные полисахариды, гликопротеиды, пептиды) не указаны в списке по двум причинам. Первая связана с их невысокой токсичностью; вторая - с тем, что активность этих токсинов имеет мультигенную регуляцию. Для синтеза таких токсинов в реципиентный микроорганизм необходимо внести в достаточно большое количество экспрессируемых генетических последовательностей, что маловероятно при выполнении перечисленных выше требований по лимитированию размера вносимого генетического материала.

Приложение N 2

К Методическим Указаниям

Этапы стандартной проверки безопасности микроорганизмов, предназначенных для использования в биотехнологической

промышленности

Проверяется безопасность штамма в 2 этапа по следующим критериям, которые определяются для каждого штамма на лабораторных животных:

1 этап. Острое (однократное) воздействие штамма в больших дозах (внутрибрюшинное введение, животные - мыши, уровни воздействия 107-1010 КОЕ/жив.)

Показатели: - вирулентность (DV50)

- токсичность характеризующая воздействие экзотоксинов
- токсигенность, характеризующая воздействие эндотоксинов
- "пороговая доза", характеризующая скорость проникновения в кровяное

русло

- диссеминация штамма в динамике во внутренние органы и кровь

Результат: - штамм является патогенным и не рекомендуется его использовать в промышленной биотехнологии

- штамм не является патогенным и может использоваться в промышленной биотехнологии

(критерии оценки полученных результатов в "Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза". Пивоваров Ю.П., Мясина Л.И., Королик В.В. // Методические рекомендации. - М., 1992. - 20 с.)

2 этап. Подострое (субхроническое) воздействие штамма (интраназальное, ингаляционное, внутрижелудочное в зависимости от того, какой норматив будет разрабатываться, длительность в течение 1мес. - 5 дней в неделю, животные - крысы, мыши и кролики, уровни воздействия 103-105 КОЕ/м³ или 104-106 КОЕ/л)

Показатели: - общетоксические

- раздражающего действия на слизистые глаз и кожу
- сенсибилизирующего действия (ГЗТ и ГНТ)
- иммуноксического действия
- антимикробного действия на микрофлору кишечника (дисбактериоз)

Результат: - установление порога вредного действия (Limsch) штамма

- обоснование величины ПДК для рабочей зоны и атмосферного воздуха в соответствии с "Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды". N 5789/1-91 от 11 июня 1991 г. М.: МЗ СССР. - 1991. - 22 с.

- установление класса опасности штамма в соответствии с "Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда". Р 2.2.2006-05. М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. - 2005. - 142 с.

- рекомендация мер защиты работающих и населения на основе установления класса опасности штамма с целью профилактики возможных неблагоприятных эффектов (аллергические, дисбактериоз).

После внедрения исследуемого штамма в биотехнологическое производство необходима:

Клинико-гигиеническая апробация установленного гигиенического норматива (на основе сравнения гигиенических условий на биотехнологическом производстве и оценки состояния здоровья работающих)

Результат: - гигиенический норматив установлен правильно

- гигиенический норматив требует коррекции

Приложение N 3

К Методическим Указаниям

Описание процедуры экспертизы и регистрации

Экспертиза (осуществляется БРЦ)

1) Заявитель предоставляет в БРЦ информацию в соответствии с Приложением N4 к настоящей методике, в том числе:

- о регистрируемом штамме (с указанием сведений о происхождении и таксономической идентификации);

- о внесенном генетическом материале;

- о результатах стандартных проверок, предусмотренных для промышленных штаммов-продуцентов

2) В соответствии с настоящими методическими указаниями делается заключение, относится ли регистрируемый штамм к ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации.

3) На основании анализа предоставляемой информации делается заключение о соблюдении требований, предъявляемых к вносимому генетическому материалу.

4) БРЦ осуществляет депонирование регистрируемого штамма ГММ и подготавливает его паспорт.

5) БРЦ анализирует предоставленные Заявителем сведения о регистрируемом штамме ГММ и условиях его предполагаемого использования, в том числе:

- об используемом штамме-реципиенте;

- о соответствии предполагаемых условий по обеспечению биобезопасности при промышленном использовании ГММ требованиям соответствующего уровня физической защиты (описание уровней физической защиты приведено в Приложении N6 к методическим указаниям). При отклонении от требований соответствующего уровня физической защиты Заявитель должен предоставить подробное описание этих отличий. В этом случае, при проведении экспертизы устанавливается, достаточны ли меры физической защиты, предложенные Заявителем для обеспечения биобезопасности промышленного использования ГММ.

6) В течение установленного срока БРЦ готовит экспертное заключение о возможности промышленного использования ГММ.

В случае отрицательного решения аргументирует свое заключение и возвращает документы Заявителю. При положительном заключении БРЦ может наложить некоторые ограничения при использовании ГММ (например, введя

дополнительные меры физической защиты или ограничения на объемы производства).

На основе паспорта штамма, результатов экспертизы (молекулярно-генетических исследований и оценки биологической безопасности) и данных о регистрируемом штамме БРЦ формирует Досье на штамм ГММ, которое передается Заявителю. Данное Досье является основанием для регистрации штамма ГММ в Россельхознадзоре и источником информации при экспертизе продукции.

Регистрация (осуществляется федеральным органом исполнительной власти)

7) Проверка сведений о Заявителе (разработчике, предполагаемом производителе)

8) Регистрация штамма ГММ для возможности промышленного использования в заявленных условиях или мотивированный отказ.

9) Выдача свидетельства о государственной регистрации и внесение в сводный реестр ГМО.

10) Передача на хранение в архив Досье на зарегистрированный штамм ГММ.

Приложение N 4

К Методическим Указаниям

Требования к информации, предоставляемой Заявителем.

Документы, предоставляемые Заявителем, должны содержать следующие сведения:

1. наименование модифицированного организма с указанием его таксономического статуса;

2. описание внесенного генетического материала, подтверждающее выполнение требований, приведенных в приложении N 4 к методике;

3. валидированную методику определения регистрируемого штамма ГММ (с указанием нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров и режимов проведения ПЦР);

4. сведения о штамме-реципиенте;

5. информацию о стандартных проверках, предусмотренных для штаммов (не ГММ), предназначенных для использования в промышленности в соответствии с приложением N 2 к методике;

6. оценку риска использования штамма ГММ и рекомендации по уменьшению допустимого риска;

7. регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГММ, на основе которого создан регистрируемый штамм ГММ (в случае, если штамм ГММ создан на основе иного штамма ГММ);

8. сведения о регистрации штамма ГММ за рубежом (при наличии);

9. условия планируемого использования штамма ГММ, включая подробное описание технологического процесса и мер физической защиты.

10. экономическая значимость использования штамма ГММ;

11. план мероприятий по предупреждению аварийных ситуаций и ликвидации их последствий;

12. сведения о заявителе.

Приложение N 5

К Методическим Указаниям

Группы штаммов-реципиентов

Все штаммы-реципиенты разделены на три группы:

1. Штамм реципиент входит в список рекомендованных реципиентов **.

2. Штамм реципиент не входит в список рекомендованных реципиентов, но является хорошо изученным и имеет длительную историю безопасного применения в промышленности.

3. Штамм реципиент не входит в список рекомендованных реципиентов, данные о биобезопасности промышленного применения отсутствуют.

Заявитель должен предоставить данные о таксономической идентификации штамма-реципиента, достоверность которых оценивается БРЦ при проведении экспертизы.

Требования к штаммам-реципиентам

Для внесения в список рекомендованных реципиентов штамм-кандидат должен отвечать следующим критериям:

Первый критерий требует четкой идентификации и классификации микроорганизма. Должна быть доступна полная информация о генотипических и фенотипических характеристиках микроорганизма.

Второй критерий требует наличия информации о взаимоотношениях исследуемого микроорганизма с близкородственными микроорганизмами, которые обладают потенциальным негативным эффектом на здоровье человека и окружающую среду.

Третий критерий предполагает наличие длительной истории безопасного коммерческого использования микроорганизма

Четвертый критерий требует отсутствия отрицательных результатов исследований по выявлению потенциально опасного воздействия микроорганизма на здоровье человека и окружающую среду.

Пятый критерий предполагает низкую выживаемость микроорганизма в окружающей среде.

Шестой критерий предполагает наличие опыта использования микроорганизма для создания биобезопасных ГММ на его основе

Только одновременное выполнение всех критериев делает возможным сделать заключение о безопасности микроорганизма и внесение в список рекомендованных реципиентов. Внесение микроорганизмов в перечень рекомендуемых реципиентов осуществляется уполномоченной государственной экспертной организацией после тщательных исследований, с учетом зарубежного опыта.

** В Российской Федерации до настоящего времени нет подобного списка. В США список одобренных реципиентов приведен в правилах TSCA в секции

725.420 (<http://www2.epa.gov/laws-regulations/summary-toxic-substances-control-act>)

В нормативной базе ЕС, так же, как и в РФ, нет отдельного списка рекомендованных реципиентов. Однако в Руководстве EFSA (European Food Safety Authority - Европейская комиссия по безопасности продуктов питания <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2193.pdf>) содержится указание, что при оценке риска внимание экспертов должно сосредотачиваться на оценке внесенного генетического материала, если штамм-реципиент имеет статус QPS (Qualified Presumption of Safety - квалифицированный статус безопасности).

Перечень микроорганизмов, имеющих статус QPS значительно больше, чем список одобренных реципиентов правил TSCA, но имеет одно существенное отличие - к части микроорганизмов статус QPS применим только в случае использования в определенных целях, например, на *Glucanobacteroxydans* статус QPS распространяется только в случае использования при производстве витаминов.

1 группа - Список рекомендованных реципиентов

(составлен на основе списка рекомендованных реципиентов, приведенных в секции 725.420 правил TSCA)

Acetobacter aceti

Aspergillus niger

Aspergillus oryzae

Bacillus licheniformis

Bacillus subtilis

Clostridium acetobutylicum

Escherichia coli K-12

Penicillium roqueforti

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces uvarum.

*Trichoderma reesei*QM6a

Bacillus amyloliquefaciens subsp.*amyloliquefaciens*

2 группа - Список микроорганизмов, имеющих длительную историю безопасного применения

(составлен на основе списка микроорганизмов, имеющих статус QPS)

Вид

ограничения

Грамм-положительные неспорулирующие бактерии

<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium ifidum</i>	<i>Bifidobacterium umlongum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	

s

Carnobacterium divergens

Corynebacterium glutamicum

только для производства аминокислот

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	<i>Lactobacillus animalis</i>	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>
----------------------------------	----------------------------------	----------------------------	-------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

Lactobacillus amylolyticus	farciminis	Lactobacillus fermentum	Lactobacillus paracasei	
Lactobacillus amylovorus	gallinarum	Lactobacillus gasserii	Lactobacillus paraplanarum	
Lactobacillus alimentarius	helveticus	Lactobacillus hilgardii	Lactobacillus pentosus	
Lactobacillus aviaries	johnsonii	Lactobacillus brevis	Lactobacillus kefirianofaciens	
Lactobacillus buchneri	kefirianofaciens	Lactobacillus kefirii	Lactobacillus pontis	
Lactobacillus casei	Lactobacillus mucosae	Lactobacillus reuteri	Lactobacillus cellobiosus	
Lactobacillus coryniformis		Lactobacillus sakei	Lactobacillus coryniformis	
Lactobacillus crispatus		Lactobacillus salivarius	Lactobacillus curvatus	
Lactobacillus curvatus		Lactobacillus sanfranciscensis		
Lactococcus lactis				
Leuconostoc citreum	Leuconostoc lactis	Leuconostoc mesenteroides		
Leuconostoc pseudomesenteroides				
Microbacterium imperiale				только для производства ферментов.
Oenococcus oeni				
Pasteuria nishizawae				только для производства пестицидов для борьбы с цистами нематод
Pediococcus acidilactici				
Pediococcus dextrinicus				
Propionibacterium freudenreichii	Propionibacterium acidipropionici			
Streptococcus thermophilus				
Бациллы				
Bacillus atrophaeus	Bacillus fusiformis	Bacillus lentus	Bacillus pumilus	
Bacillus clausii	Bacillus megaterium	Bacillus smithii	Bacillus vallismortis	
Bacillus coagulans	Bacillus mojavensis			
Bacillus flexus				
Geobacillus stearothermophilus				
Грамм-отрицательные бактерии				
Gluconobacter oxydans				только для производства витаминов.
Xanthomonas campestris				только для производства камеди.
Yeasts				

Species	Qualifications
Candidacylindracea	только для производства ферментов.
Debaryomyces hansenii	
Hanseniaspora uvarum	
Kluyveromyces lactis	Kluyveromyces marxianus
Komagataella pastoris Lindnera jadinii Ogataea angusta	только для производства ферментов.
Saccharomyces bayanus	*
Saccharomyces pastorianus	
Schizosaccharomyces pombe	
Wickerhamomyces anomalus	*
Xanthophyllomyces dendrorhous (imperfect form Phaffiarhodozyma)	

* - Отсутствие резистентности к противогрибковым средствам, используемым для лечения дрожжевых инфекций в случаях, когда жизнеспособные клетки добавляют в корм или кормовую цепь.

Приложение N
К Методическим Указаниям 6

Уровни физической защиты.

В главе III рекомендаций OECD*, посвященной применению ГММ в промышленности - GILSP (Good Industrial Large Scale Practice - надлежащая практика для крупномасштабной промышленности), сформулированы основополагающие принципы производственной безопасности и гигиены:

1. Свести воздействие любого физического, химического или биологического агента на рабочее место и окружающую среду до минимально возможного уровня;
2. Обеспечить технологические меры контроля объекта и, в случае необходимости, дополнить их соответствующей защитной одеждой и оборудованием;
3. Осуществлять меры технического контроля оборудования;
4. Иметь возможность проверки, при необходимости, наличия жизнеспособных организмов за пределами закрытой системы;
5. Обеспечить подготовку и обучение персонала;
6. Создать комиссию по биологической безопасности
7. Разработать правила и инструкции для обеспечения безопасности персонала.

* Положения о безопасном использовании рекомбинантной ДНК (Recombinant DNA Safety Considerations)

http://dbtbiosafety.nic.in/guideline/OACD/Recombinant_DNA_safety_considerations.pdf

Уровни обеспечения биобезопасности в крупномасштабной промышленности, в соответствии с GILSP.

(Приложение G - стр. 57 рекомендаций OECD)

Уровень 1.

1. Работы с жизнеспособными организмами должны проводиться в системе, которая физически отделена от окружающей среды (в замкнутой системе);

2. Любые газы, выводящиеся из замкнутой системы, должны быть обработаны, чтобы минимизировать высвобождение жизнеспособных организмов;

3. Отбор проб, добавление материалов к системе и передаче жизнеспособных организмов в другую систему должно осуществляться таким способом, который минимизирует их выпуск из закрытой системы;

4. Крупные партии культуральной жидкости не должны быть удалены из системы, если только жизнеспособные организмы не были инактивированы утвержденными средствами;

5. Закрытые системы должны быть расположены в пределах контролируемой зоны, которой управляют согласно следующим требованиям:

- персонал должен носить защитную одежду (халат)

- в распоряжении персонала должны быть места для обеззараживания и мытья;

6. Сточные воды от производственного объекта должны быть инактивированы утвержденными средствами перед заключительным выбросом.

Уровень 2.

1. Работы с жизнеспособными организмами должны проводиться в системе, которая физически отделена от окружающей среды (в замкнутой системе);

2. Любые газы, выводящиеся из замкнутой системы, должны быть обработаны, чтобы предотвратить выпуск жизнеспособных организмов;

3. Отбор проб, добавление материалов к системе и передаче жизнеспособных организмов в другую систему должно осуществляться таким способом, который предотвращает их выпуск из закрытой системы;

4. Крупные партии культуральной жидкости не должны быть удалены из системы, если только жизнеспособные организмы не были инактивированы утвержденными химическими или физическими средствами;

5. Уплотнения должны быть разработаны таким образом, чтобы предотвратить утечку или должны быть полностью закрытыми в хорошо проветриваемом помещении

6. Закрытые системы должны быть расположены в пределах контролируемой зоны, которой управляют согласно следующим требованиям:

- контролируемая зона должна быть обозначена знаками "Биологическая опасность"

- доступ должен быть разрешен только авторизованным сотрудникам

- персонал должен носить защитную одежду (халат, шапочка, бахилы, перчатки)

- в распоряжении персонала должны быть места для обеззараживания и мытья;

7. Сточные воды от производственного объекта должны быть инактивированы утвержденными химическими или физическими средствами перед заключительным выбросом.

Уровень 3.

1. Работы с жизнеспособными организмами должны проводиться в системе, которая физически отделена от окружающей среды (в замкнутой системе);

2. Любые газы, выводящиеся из замкнутой системы, должны быть обработаны, чтобы предотвратить выпуск жизнеспособных организмов;

3. Отбор проб, добавление материалов к системе и передаче жизнеспособных организмов в другую систему должно осуществляться таким способом, который предотвращает их выпуск из закрытой системы;

4. Крупные партии культуральной жидкости не должны быть удалены из системы, если только жизнеспособные организмы не были инактивированы утвержденными химическими или физическими средствами;

5. Уплотнения должны быть разработаны таким образом, чтобы предотвратить утечку или должны быть полностью закрытыми в хорошо проветриваемом помещении

6. Производственные системы должны быть расположены в пределах специально сконструированной контролируемой зоны, которой управляют согласно следующим требованиям:

- контролируемая зона должна быть обозначена знаками "Биологическая опасность"

- доступ в контролируемую зону должен осуществляться через шлюз и должен быть разрешен только авторизованным сотрудникам

- персонал должен носить защитную одежду (полный комплект сменной одежды)

- в распоряжении персонала должны быть места для обеззараживания и мытья;

- персонал должен принять душ, прежде чем покинуть контролируемую зону

- стоки из раковин и душевых должны быть собраны и инактивированы перед сбросом в канализацию

- контролируемая зона должна надлежащим образом вентилироваться, чтобы свести к минимуму загрязнение воздуха

- в контролируемой зоне должно поддерживаться давление воздуха ниже атмосферного

- входящий и выходящий воздух в контролируемой зоне должен подвергаться фильтрации через HEPA-фильтры

- контролируемая зона должна быть соответствующим образом изолирована, чтобы давать возможность проводить дезинфекцию

7. Сточные воды от производственного объекта должны быть инактивированы утвержденными химическими или физическими средствами перед заключительным выбросом.

Сравнение уровней обеспечения биобезопасности при крупномасштабном промышленном производстве

Критерий	1	2	3
1. Работы с жизнеспособными организмами должны проводиться в системе, которая физически отделена от окружающей среды (в замкнутой системе)	да	да	да
2. Уровень обеззараживания газов, выводящихся из замкнутой системы	минимальный	гарантированно предотвращающий выброс	гарантированно предотвращающий выброс
3. очистка сточных вод перед заключительным выбросом	утвержденной методике	по утвержденной методике физическим способом	по утвержденной методике или физическим способом
4. Уровень защиты при отборе образцов, добавлении материалов или перемещения жизнеспособных организмов между закрытыми системами	минимальный	гарантированно предотвращающий выброс	гарантированно предотвращающий выброс
5. При удалении из замкнутой системы больших объемов культуральной жидкости должна быть проведена инактивация	утвержденной методике	по утвержденной методике или физической инактивации	по утвержденной методике химической или физической инактивации
6. Требования, предъявляемые к уплотнениям (в местах контакта)	минимальный уровень	уровень, гарантированно предотвращающий выброс	уровень, гарантированно предотвращающий выброс
7. Закрытые системы должны быть расположены в пределах контролируемой зоны:	не обязательно	не обязательно	да
а) должны быть размещены знаки Biohazard	не обязательно	да	да
б) доступ должен быть разрешен авторизованным сотрудникам	не обязательно	да	да (через шлюз)
в) персонал должен носить защитную одежду	да (халат)	да	полная смена одежды
г) в распоряжении персонала должны быть места для обеззараживания и мытья	да	да	да
д) персонал должен принять душ, прежде чем покинуть контролируемую зону	нет	не обязательно	да
е) стоки из раковин и душевых должны быть собраны и инактивированны перед сбросом в канализацию	нет	не обязательно	да

ж) контролируемая зона не обязательно должна надлежащим образом вентилироваться, чтобы свести к минимуму загрязнение воздуха	не обязательно	да
з) в контролируемой зоне нет должно поддерживаться давление воздуха ниже атмосферного	не обязательно	да
и) входящий и выходящий воздух в контролируемой зоне должен подвергаться фильтрации через НЕРА-фильтры	не обязательно	да
к) контролируемая зона должна быть спроектирована таким образом, чтобы вместить выброс всего содержимого замкнутой системы	не обязательно	да
л) контролируемая зона должна соответствующим образом изолирована, чтобы давать возможность проводить дезинфекцию	не обязательно	да

Раздел 2.

Методические указания для проведения экспертизы генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду

2-I. Область применения

1. Настоящие методические указания определяют порядок проведения экспертизы (включая молекулярно-генетические исследования и оценку экологической и токсикологической безопасности) генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (далее - ГММ), предназначенных для выпуска в окружающую среду, осуществляемых в целях их государственной регистрации.

2. К ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации, относят микроорганизмы, генетический материал которых изменен с использованием методологии генетической инженерии, за исключением случаев, перечисленных в п. I-2.

2-II. Общие положения

3. Экспертиза основана на анализе сведений о генно-инженерно-модифицированных микроорганизмах (далее - ГММ), предоставляемых лицом (физическим или юридическим, независимо от формы собственности), уполномоченным собственником ГММ подавать заявку и осуществлять от его лица все действия по государственной регистрации ГММ (далее - Заявитель).

4. Ответственность заявителя за предоставляемую информацию о ГММ, о предполагаемом целевом использовании и условиях планируемого выпуска в окружающую среду определяется в соответствии с законодательством Российской Федерации.

5. Экспертиза не предполагает проведение обязательных экспериментальных проверок данных, предоставленных Заявителем. При этом обеспечивается возможность проверки сведений, предоставляемых Заявителем путем депонирования стандартного образца штамма ГММ в уполномоченной коллекции на территории РФ.

6. При проведении экспертизы определяются:

- правильность отнесения штамма к ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации;

- выполнение обязательных требований, предъявляемых к внесенному генетическому материалу (в соответствии с приложением N 2-1 к методическим указаниям);

- соответствие действующим нормативам результатов стандартных проверок, предусмотренных для штаммов (не ГММ), предназначенных для выпуска в окружающую среду (перечень стандартных проверок приведен в приложении N 2-2 к методическим указаниям).

- необходимые меры обеспечения токсикологической безопасности при выпуске в окружающую среду регистрируемого штамма ГММ и их соответствие мерам экологической защиты, предлагаемых заявителем.

7. Организация, осуществляющая экспертизу, несет ответственность за качество проведенной экспертизы (включая учет всех возможных факторов риска) и за обоснованность требований к токсикологической и экологической безопасности, в частности, в тех случаях, когда необоснованно завышенные требования к обеспечению биобезопасности понижают конкурентоспособность биотехнологий, основанных на использовании ГММ.

8. Экспертиза проводится профессиональными экспертами из уполномоченных государственных организаций. При анализе представленных сведений, эксперт делает вывод об их достоверности и полноте, в случае возникновения сомнений, вправе предъявить обоснованные претензии. При этом эксперт может потребовать проведение экспериментальной проверки представленных сведений в аккредитованной испытательной лаборатории.

9. Проведение экспертизы ГММ осуществляют БРЦ, имеющие в своем штате высококвалифицированных специалистов в области обеспечения токсикологической и экологической безопасности при выпуске ГММ в окружающую среду в промышленных масштабах.

10. Функции БРЦ.

БРЦ осуществляют экспертизу (подробное описание этапов процедуры экспертизы и регистрации приведено в Приложении N 2-3 к методическим указаниям), состоящую из следующих этапов:

- приёмка документов от Заявителя, которые должны содержать сведения, приведенные в Приложении N2-5 к методическим указаниям;

-депонирование штамма ГММ;

-подготовка паспорта штамма ГММ, в котором должна содержаться информация об отнесении к ГММ подлежащим регистрации и о выполнении обязательных требований при конструировании ГММ (перечень обязательных требований к внесенному генетическому материалу, который планируется выпустить в окружающую среду, приведен Приложении N 2-1 к методическим указаниям);

- проверка валидированной методики определения регистрируемого штамма ГММ;

-подготовка экспертного заключения о возможности выпуска штамма ГММ в окружающую среду;

- подготовка Досье на штамм ГММ на основе паспорта штамма, результатов экспертизы (молекулярно-генетических исследований и оценки экологической и токсикологической безопасности) и данных о регистрируемом штамме ГММ;

- подготовка дополнительных рекомендаций для разработчиков ГММ на основании анализа опыта использования различных ГММ;

- подготовка рекомендаций о необходимом объеме проведения экспертизы по экологической и токсикологической безопасности введения ГММ в окружающую среду;

- подготовка рекомендаций по проведению мониторинга и анализу результатов использования ГММ в окружающей среде.

2-III. Проведение экспертизы

На основании данных, представленных Заявителем, БРЦ определяет:

1) относится ли регистрируемый штамм к ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации в соответствии с пунктом 2-4 настоящих методических указаний;

2) БРЦ рассматривает результаты экологической экспертизы по результатам выпуска штамма ГММ на основе штамма-реципиента (Приложение N2-5 к методическим указаниям) и определяет необходимые ограничительные меры, направленные на достижение токсикологической безопасности и экологической защиты;

3) БРЦ, в течение установленного срока готовит экспертное заключение по результатам экологической экспертизы о возможности выпуска штамма ГММ в окружающую среду;

4) в случае принятия отрицательного решения аргументируют свое заключение и возвращают документы Заявителю, а в случае положительного - выдают экспертное заключение о возможности регистрации;

5) в процессе экспертизы БРЦ запрашивает информацию о направлениях целевого использования ГММ, что существенно для определения биобезопасности использования ГММ;

6) в случае выявления при проведении экспертизы противоречий в представленных документах, а также недостаточности данных, процедура экспертизы штамма ГММ приостанавливается, о чем в течение 3 дней в

письменной форме БРЦ уведомляет Заявителя, с указанием перечня необходимых изменений для устранения недостатков в документации. Срок, на который приостанавливается процедура, не может превышать 90 дней. В случае невозможности устранения в указанный срок Заявителем выявленных несоответствий проведение экспертизы прекращается и Заявителю выдается отрицательное заключение;

7) при отрицательном решении БРЦ о возможности выпуска регистрируемого штамма ГММ в окружающую среду, Заявителю представляется аргументированный отказ с указанием его причин и путей возможного устранения недостатков;

8) в случае, если Заявителем устранена причина, в соответствии с которой БРЦ было вынесено отрицательное заключение, проведение повторной экспертизы возможно не ранее, чем через 90 дней с момента получения такого заключения.

2-IV. Мониторинг информации о последствиях выпуска штамма ГММ в окружающую среду

1. Мониторинг осуществляется федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим регистрацию ГММ, а также организациями, осуществляющими проведение экспертизы, и иными уполномоченными Правительством Российской Федерации федеральными органами исполнительной власти.

2. Мониторинг осуществляется на основании результатов проведенной государственной экологической экспертизы, находящейся в распоряжении Федеральной службы по надзору в сфере природопользования, в порядке, установленном Федеральным законом "Об организации предоставления государственных и муниципальных услуг".

Эксперты БРЦ, осуществляющие анализ результатов мониторинга, оценивают всю поступающую информацию, включая обращения граждан.

3. Любое физическое или юридическое лицо имеет право обратиться в федеральный орган исполнительной власти, осуществляющий регистрацию ГММ, или в организации, осуществляющие проведение экспертизы с заявлением о негативном воздействии ГММ на здоровье населения и окружающую среду, согласно п. I-IV-20.

4. Рассмотрение результатов мониторинга проводится БРЦ.

На основании результатов экологического мониторинга использования ГММ может осуществляться корректировка требований к обеспечению биобезопасности выпуска ГММ в окружающую среду.

5. По результатам мониторинга БРЦ может внести изменения в экспертное заключение в связи с получением дополнительной информации о биобезопасности использования ГММ в окружающей среде. При этом организации, осуществляющие проведение экспертизы, направляют соответствующее уведомление в уполномоченный орган, осуществивший регистрацию данного ГММ.

Приложение N 2-1
К Методическим Указаниям

Требования к внесенному генетическому материалу

Для государственной регистрации штамма ГММ обязательно выполнение всех требований, предъявляемых к внесенному генетическому материалу.

1. Лимитированный размер. Внесенный чужеродный генетический материал должен состоять только из следующих компонентов:

1.1. Структурного гена(ов)

1.2. Регуляторной последовательности, позволяющей экспрессировать только структурный ген(ы),

1.3. Ассоциированных нуклеотидных последовательностей, необходимых для генно-инженерных манипуляций, стабильности и экспрессии вносимого генетического материала, включая линкеры, гомополимеры, адапторы, транспозоны, сайты рестрикционных ферментов.

2. Характеристика генетического материала должна содержать следующую информацию о:

2.1. нуклеотидной последовательности внесенного генетического материала;

2.2. функции всех продуктов, синтез которых контролируется или определяется (кодируется) внесенным генетическим материалом;

2.3. функции последовательностей, которые участвуют в регуляции экспрессии внесенного генетического материала;

2.4. отсутствие ассоциированных нуклеотидных последовательностей, в том числе, относящихся к "островам патогенности", за исключением перечисленных в пункте 1.3;

2.5. места встройки генетического материала (наличие физической карты, подтвержденной данными секвенирования), для подтверждения типа, организации и мобильности данных конструкций и исключения возможности получения конструкций на основе "островов патогенности".

3. Отсутствие определенных последовательностей. Такое свойство внесенной последовательности должно означать, что в нее и, соответственно, в реципиент не должны попасть последовательности, кодирующие опасные токсины или их функционально значимые фрагменты (Список опасных токсинов см. п. 1-1.).

4. Низкая способность к мобильности. Это требование необходимо для обеспечения низкой частоты переноса генетического материала в другие микроорганизмы из окружающей среды. Такой перенос возможен за счет конъюгации, трансдукции или трансформации, при этом генетический материал может попасть в различные популяции микроорганизмов, свойства которых уже невозможно будет предсказать. Допустимая частота переноса ДНК меньше 10⁻⁸.

Использование перечисленных критериев для внесенного генетического материала позволяет минимизировать риск от попадания в реципиент не охарактеризованного генетического материала и от непрогнозируемых последствий генетической модификации.

Заявитель должен предоставить описание проведенных генно-инженерных манипуляций, полную нуклеотидную последовательность внесенного генетического материала с указанием всех элементов и их функций.

Приложение

N

2-2

К Методическим Указаниям

Этапы стандартной проверки токсикологической и экологической безопасности микроорганизмов, предназначенных для использования в биотехнологии сельского хозяйства

1) Для характеристики микроорганизмов-реципиентов следует использовать генетические и фенотипические методы, позволяющие соответственно сопоставлять последовательности генов и наличие фенотипических признаков исследуемых культур микроорганизмов с музейными штаммами национальных или международных коллекций;

2) для дифференцирования патогенных и непатогенных штаммов внутри вида информативным методом является обнаружение в составе ДНК бактериальной клетки геномных "островов патогенности". Изменение вирулентности у непатогенных видов бактерий может быть обусловлено присутствием в их геномах указанных генетических конструкций, обладающих потенциально высокой мобильностью, что связано с тем, что в их состав могут входить разные типы мобильных элементов и элементы геномов бактериофагов;

3) оценка токсикологической безопасности должна проверяться для каждого штамма в 2 этапа: на насекомых и теплокровных лабораторных животных, согласно стандартных методикам в аккредитованной для этого испытательной лаборатории;

4) экологическая экспертиза оценки вирулентности, жизнеспособности, генетической стабильности ГММ по результатам 3-х летних модельных деляночных опытов.

По полученным результатам выносится решение:

- штамм является патогенным и не рекомендуется его использовать в биотехнологии сельского хозяйства;

- штамм не является патогенным и может быть использован в биотехнологии сельского хозяйства

(в качестве критериев оценки полученных результатов могут быть использованы "Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза". Пивоваров Ю.П., Мясина Л.И., Королик В.В. // Методические рекомендации. - М., 1992. - 20 с.).

После получения заключения токсикологического контроля необходима экологическая апробация исследуемого штамма ГММ в условиях модельной открытой системы, приближенной к условиям окружающей среды.

Экологическая апробация в условиях модельных деляночных опытов позволит получить данные о вирулентности, генетической стабильности и жизнеспособности штамма ГММ в реальных условиях открытой системы.

Результат: - норматив использования штамма ГММ установлен правильно

- норматив использования штамма ГММ требует коррекции

Приложение N 2-3

К Методическим Указаниям

Описание процедуры экспертизы и регистрации

Экспертиза (осуществляется БРЦ)

1) Заявитель предоставляет в БРЦ информацию в соответствии с Приложением N4 к настоящей методике, в том числе:

- сведения о происхождении и таксономической идентификации о регистрируемого штамма;

- сведения о внесенном генетическом материале;

- сведения о результатах токсикологической проверки и экологической экспертизы, предусмотренных для штаммов, используемых для приготовления биопрепаратов;

2) В соответствии с настоящими методическими указаниями делается заключение, относится ли регистрируемый штамм к ГММ, для которых требуется проведение процедуры государственной регистрации.

3) На основании анализа предоставляемой информации делается заключение о соблюдении требований, предъявляемых к вносимому генетическому материалу.

4) БРЦ осуществляет депонирование регистрируемого штамма ГММ и подготавливает его паспорт.

5) БРЦ анализирует предоставленные Заявителем сведения о регистрируемом штамме ГММ и условиях его предполагаемого использования, в том числе:

- о используемом штамме-реципиенте;

- о соответствии предполагаемых условий выпуска ГММ в окружающую среду по обеспечению токсикологической и экологической безопасности (см. Приложение N2-6 к методическим указаниям). При отклонении от требований соответствующего уровня физической защиты, Заявитель должен предоставить подробное описание этих отличий. В этом случае, при проведении экспертизы устанавливается, достаточны ли меры физической защиты, предложенные Заявителем для обеспечения токсикологической и экологической безопасности в случае выпуска ГММ в окружающую среду.

9. В течение установленного срока БРЦ готовит экспертное заключение о возможности выпуска в окружающую среду ГММ.

В случае отрицательного решения аргументирует свое заключение и возвращает документы Заявителю. При положительном заключении БРЦ может наложить некоторые ограничения при использовании ГММ (например, введя дополнительные меры экологической защиты или ограничения территорий, предназначенных для выпуска ГММ).

На основе паспорта штамма, результатов экспертизы (молекулярно-генетических исследований и оценки токсикологической безопасности) и данных о регистрируемом штамме БРЦ формирует Досье на штамм ГММ, которое передается Заявителю. Данное Досье является основанием для регистрации

штамма ГММ в Россельхознадзоре и источником информации при экспертизе продукции.

Регистрация (осуществляется федеральным органом исполнительной власти)

10. Проверка сведений о Заявителе (разработчике, предполагаемом производителе)

11. Регистрация штамма ГММ для возможности выпуска в окружающую среду в заявленных условиях или мотивированный отказ.

12. Выдача свидетельства о государственной регистрации и внесение в сводный реестр ГМО.

13. Передача на хранение в архив Досье на зарегистрированный штамм ГММ.

Приложение N 2-4
К Методическим Указаниям

Требования к информации, предоставляемой Заявителем.

Документы, предоставляемые Заявителем, должны содержать следующие сведения:

1) данные о таксономической идентификации штамма-реципиента на основании молекулярно-генетического анализа, достоверность которых оценивается БРЦ при проведении экспертизы;

2) наименование ГММ с указанием его таксономического статуса;

1) описание внесенного генетического материала, подтверждающее выполнение требований, приведенных в приложении N 2-1 к методике;

2) валидированную методику определения регистрируемого штамма ГММ (с указанием нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров и режимов проведения ПЦР);

3) сведения о штамме-реципиенте;

4) информацию о стандартных проверках, предусмотренных для штаммов (не ГММ), предназначенных для использования в промышленности в соответствии с приложением N 2 к методике;

5) регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГММ, на основе которого создан регистрируемый штамм ГММ (в случае, если штамм ГММ создан на основе иного штамма ГММ);

6) сведения о регистрации штамма ГММ за рубежом (при наличии);

7) результаты оценки токсикологической безопасности, выполненные в аккредитованной испытательной лаборатории;

8) результаты экологической экспертизы, проводимой в порядке, установленном Федеральным законом РФ "Об экологической экспертизе" (с изменениями на 28 декабря 2017 года в редакции, действующей с 1 января 2018 года) и нормативными правовыми актами Российской Федерации. Государственная экологическая экспертиза проводится на федеральном и региональном уровнях.

9) условия планируемого целевого использования штамма ГММ, включая подробное описание технологического процесса за контролем жизнеспособности штамма в открытой среде;

10) экономическая значимость использования штамма ГММ;

11) сведения о заявителе.

Приложение N 2-5

К Методическим Указаниям

Группы штаммов-реципиентов для ГММ

Требования к штаммам-реципиентам для ГММ

Для внесения в список рекомендованных реципиентов штамм-кандидат должен отвечать следующим критериям оценки (см. также п. 1-5):

1) идентификация и классификация микроорганизма. Должна быть доступна полная информация о генотипических и фенотипических характеристиках микроорганизма;

2) информация о возможности переноса генетической информации между штаммом ГММ с микроорганизмами, которые обладают потенциальным негативным эффектом на здоровье человека и окружающую среду, на внутривидовом, межвидовом и родовом уровнях;

3) наличие длительной истории безопасного коммерческого использования микроорганизма;

4) Наличие данных об отсутствии потенциально опасной патогенности и токсигенности микроорганизма на здоровье человека и окружающую среду;

5) низкую выживаемость микроорганизма в окружающей среде;

6) наличие результатов использования микроорганизма для создания биобезопасных ГММ на его основе.

Только одновременное выполнение всех критериев делает возможным сделать заключение о безопасности микроорганизма и внесение в список рекомендованных реципиентов. Внесение микроорганизмов в перечень рекомендуемых реципиентов осуществляется уполномоченной государственной экспертной организацией после тщательных исследований, с учетом зарубежного опыта.

Список микроорганизмов, имеющих длительную историю безопасного применения для приготовления биопрепаратов под бобовые, овощные и злаковые культуры

(составлен на основе списка микроорганизмов, имеющих статус QPS; см.

Приложение 5)

Вид	назначение
Arthrobacter sp.	
Pseudomonas sp.	ассоциативные, рост-стимулирующие
Bacillus subtilis	бактерии для производства удобрений для овощных и злаковых культур
Azospirillum sp.	
Lactobacillus brevis	микробиологическая силосная добавка
Rhizobium galega bv. orientalis,	симбиотические азотфиксирующие
Rhizobium galega bv. officinalis	бактерии, для производства биоудобрений для
Rhizobium leguminosarum bv. trifolii,	бобовых культур

bv. viciae, bv. phaseoli

Sinorhizobium meliloti bv. meliloti, bv. medicae,

Agrobacterium radiobacter

Bradyrhizobium sp.

Mezorhizobium sp.

Приложение N 2-6

К Методическим Указаниям

Оценка токсикологической и экологической безопасности.

Оценка возможности выпуска ГММ в окружающую среду должна основываться на результатах оценки их токсикологической и экологической безопасности.

Основополагающие принципы токсикологической и экологической безопасности должны позволить:

1. разработать правила и инструкции для контроля за жизнеспособностью и токсикологической безопасностью ГММ в окружающей среде;
2. обеспечить подготовку и обучение персонала;
3. обеспечить меры контроля жизнеспособности микроорганизма ГММ в открытой среде;
4. создать комиссию по экологической и токсикологической безопасности.

Тема 15. СЛОВАРЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

Цель занятия: изучить биотехнологические термины

Литература: 1,2,3 4,5,6, 7

Вид занятия: практические

Материальное обеспечение: учебно-методическое пособие.

АДВЕНТИВНЫЕ ПОЧКИ (Adventives bud) – почки, возникшие из клеток и тканей в растениях, обычно их не образующие.

АЛЛЕЛИ (Alleles) – гены, занимающие одинаковые места в гомологичных молекулах ДНК и выполняющие сходные функции.

АМПЛИФИКАЦИЯ (Amplification) – образование дополнительных копий хромосомных последовательностей ДНК.

АНАЭРОБНОЕ БРОЖЕНИЕ (Anaerobic fermentation) – процесс разложения субстрата анаэробными микроорганизмами (не нуждающимися для нормальной жизнедеятельности в наличии кислорода).

АНДРОГЕНЕЗ (Androgenesis) – процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна через соматический эмбриогенез, либо через образование каллуса.

АНТИГЕНЫ (Antigens) – белки, индуцирующие образование в иммунной системе антитела, способного к специфическому взаимодействию с веществом, вызывающим образование антитела.

АПИКАЛЬНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ (Apical domination) – явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

АНТИСТРЕССОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ (Antistress preparation) – препараты,

повышающие устойчивость растения в стрессовых условиях. Как правило, их действие связано с активацией синтеза организмом стрессовых белков.

АНТИСЫВОРОТКА (Antiserum) – сыворотка иммунизированного животного (человека), содержащая антитела против чужеродных агентов.

АНТИТЕЛА (Antibodies) – белки, вырабатываемые иммунной системой, блокирующие действие чужеродных патогенных агентов.

АУКСОТРОФНЫЕ МУТАНТЫ (Auxotrophic mutants) – мутантные штаммы микроорганизмов, не способные к синтезу определенных ферментов.

АУТОСОМЫ (Autosomes) – набор хромосом, не включающий половые хромосомы (обозначаются цифрами: 1, 2, 3 и т. д.).

БЕЛКОВО-ВИТАМИННАЯ ПАСТА (Protein-vitamin paste) – белковый коагулят, образующийся в процессе ферментации растительного сока.

БЕЛКОВО-ВИТАМИННЫЙ КОНЦЕНТРАТ (БВК) – белковый концентрат из кормовых дрожжей.

БЕССМЫСЛЕННЫЙ КОДОН – один из трех триплетов, UAG, UAA, UGA, вызывающих терминацию синтеза белка (UAG известен как amber-кодон, UAA – как ochre-кодон, UGA – как opal-кодон).

БИБЛИОТЕКА ГЕНОМА (Genome library) – набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ – (Biosafety) – защищенность человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

БИОГАЗ (Biogas, biofuel) – биологический газ, образующийся в результате анаэробного брожения органического субстрата, состоит в основном из метана (до 60%), углекислого газа (35-40%) и незначительного количества других газов: сероводород, водород (до 2%).

БИОГЕНЕЗ (Biogenesis) – образование органических соединений живыми организмами. **БИОКОНВЕРСИЯ (Bioconversion)** – получение биогаза (метана) из органических отходов – навоза и других методом их сбраживания.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ (Biological nutrition value of proteins) – показатель, выражающий сбалансированность по содержанию незаменимых аминокислот.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЗА ПОСЕВАМИ (Crop biological monitoring) – система мониторинга показателей биологических процессов у растений в онтогенезе, коррелирующих с ходом формирования урожая посевами в конкретных условиях выращивания.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ – показатель, выражающий сбалансированность белков по содержанию незаменимых аминокислот.

БИОМАССА (Biomass) – общая масса особей одного вида, группы видов или сообществ в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

БИОТЕХНОЛОГИЯ КЛАССИЧЕСКАЯ (Classic or traditional

biotechnology) – наука о методах и технологиях производства, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, не трансгенных растений, животных, микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в природных (естественных) и искусственных условиях.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЕЙШАЯ (Modern biotechnology) – наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов и вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

БИОФИЛЬТР (Biofilter) – сооружение для биологической очистки сточных вод. Представляет собой круглый или прямоугольный резервуар с двойным дном, наполненный фильтрующими материалами.

БИОЦЕНОЗ – совокупность растений, животных и микроорганизмов, входящих в состав организмов, их структуре, взаимодействии, распределении, превращениях и функциях, а также химических процессах, лежащих в основе жизнедеятельности организмов.

БИОЭНЕРГЕТИКА (Bioenergy) – раздел науки о закономерностях накопления и преобразования энергии в процессах жизнедеятельности организмов.

БЛАСТУЛА (Blastula) – вторая, после морулы, стадия развития эмбриона, содержащая полость (бластоцель).

БЛОТТИНГ ДНК ПО САУЗЕРНУ (Southern blotting) – процедура переноса денатурированной ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для гибридизации с комплементарными нуклеотидными последовательностями.

БЛОТТИНГ РНК (Blotting RNA, northern blotting) – перенос РНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для последующей гибридизации с комплементарной ДНК.

ВЕДУЩАЯ ЦЕПЬ (Leading chain) – цепь ДНК, синтезирующаяся в 5'-3'-направлении.

ВЕКТОР (Vector) – саморегулирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

ВЕРТИКАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ (Vertical genes transfer) – перенос генетической информации от клетки или организма к потомству при помощи обычных генетических механизмов.

ВРЕМЯ ГЕНЕРАЦИИ КЛЕТКИ – интервал между последовательными клеточными делениями.

ВРЕМЯ УДВОЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ – интервал времени, за который число клеток в популяциях увеличивается вдвое.

ВТОРИЧНЫЙ ПОСРЕДНИК (Secondary mediator) – физиологически активное регуляторное вещество, специфически стимулирующее активность

протеинкиназ – ферментов, переносящих остаток фосфорной кислоты на другие белки, что приводит к изменению их конформации и биологической активности.

ВЫСОКОЛИЗИНОВЫЕ ГЕНОТИПЫ РАСТЕНИЙ (High lysine genotypes of plants) – генотипы растений с повышенным содержанием в белках лизина.

ГАПЛОИД (Haploid) – ядро, клетка, организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ n).

ГЕН (Gene) – элементарная единица наследственного вещества и информации; локализованный участок хромосомы (локус), содержащий ДНК и обуславливающий передачу наследственной информации от клетки к клетке и ее реализацию путем синтеза информационной, матричной и рибосомальной РНК; участок хромосомы (молекулы ДНК), кодирующей структуру одной или нескольких полипептидных цепей, или молекулу РНК, или определенную регуляторную функцию (см. АЛЛЕЛИ).

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД (ГК) (Genetic code, GC) – система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот. Единицей ГК служит кодон, или триплет (тринуклеотид). ГК определяет порядок включения аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ РИСК (Genetic risk) – возможность проявления непредсказуемых, опасных для здоровья и жизни человека и для окружающей среды наследственных изменений генома и качества организмов.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ – (Gene engineering) – совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению единичных или нескольких генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ (Gene engineering) – совокупность приемов, методов и технологий, используемых для перенесения в реципиентную клетку и организм генетических структур от единичного гена до локусов ДНК, хромосом, ядер клеток и всего генома.

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ (Gene-engineering activity) – деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транспортировку и использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.

ГЕНОМ (Genome) – совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом данного организма; гаплоидный набор хромосом с локализованными в нем генами. В более широком понимании это совокупность ядерных элементов генетической конституции организма.

ГЕНОТЕРАПИЯ (Gene therapy) – лечение наследственной болезни прямым воздействием на ген.

ГЕНОТИП (Genotype) – конкретный набор генов особи.

ГЕНОФОНД (Gene pool, genofond) – совокупность генов популяции.

ГЕТЕРОЗИС (Heterosis) – повышение уровня жизнеспособности особей гибридов первого поколения в результате скрещивания исходных родительских форм, отличающихся по ряду признаков и свойств.

ГИНОГЕНЕЗ (Gynogenesis) – процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка пестика.

ГМО (GMO) – см. ТРАНСГЕННЫЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ.

ГМР (GMR) – генетически модифицированные растения.

ГОЛЬДЖИ АППАРАТ (Goldgi apparatus, Goldgi body) – высокоспециализированная мембранная структура клетки, локализованная у ее полюсов.

ГОНАДОТРОПНЫЕ ГОРМОНЫ (Gonadotropic hormones) – гормоны, регулирующие секрецию половых гормонов яичника.

ГОМОЗИГОТНОСТЬ (Homozygosity) – отсутствие различий между идентичными генами родителей.

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ (Horizontal gene transfer) – механизм передачи генов между одновременно существующими организмами.

ГОРМОНАЛЬНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ (Hormone system of plants) – регуляторный комплекс, фитогормоны, их рецепторы и вторичные посредники.

ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС (Hormone status) – соотношение между фитогормонами, главным образом стимуляторного и ингибиторного действия, присущее определенному состоянию растений.

ГОРМОН-РЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС (Hormon-receptor complex) – соединение гормона и белкового рецептора, первый необходимый шаг в реализации действия фитогормона.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ГЕННОИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ (State (official, governmental) regulation of gene engineering activities) – регулирование государственными органами в соответствии с законами и другими правовыми актами отношений между участниками генно-инженерной деятельности в сфере разработки и использовании трансгенных технологий, организмов и продуктов их жизнедеятельности в целях эффективного природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности.

ДЕСТРУКЦИЯ (Destruction) – разрушение вещества, сопровождаемое потерей его физиологической активности.

ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ (Dedifferentiation) – переход специализированных клеток к пролиферации и неорганизованному каллусному росту.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ РАЗВИТИЯ (Determination of development) – приобретение клеткой, тканью, органом или организмом состояния готовности к развитию по определенному пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях. В период детерминации создаются необходимые внутренние условия для последующей морфологической реализации нового направления развития.

ДИПЛОИД (Diploid) – ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленных числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

ДИПЛОИДИЗАЦИЯ (Diploidyization) превращение гаплоидного набора хромосом в дип-лоидный путем удвоения каждой хромосомы.

ДИПЛОИДНЫЙ НАБОР ХРОМОСОМ (Diploid chromosome number) – два гаплоидных набора хромосом, содержащие хромосомы только одного или обоих родителей.

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ (Differentiation) – комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

ДНК (DNA) – молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, состоящая из нуклеотидов (аденин, гуанин, цитозин, Тимин), дезоксирибозы и остатков фосфорной кислоты.

ЖЕЛТОЕ ТЕЛО (Yellow body) – железистая ткань, возникающая на месте разорвавшегося фолликула при наступлении беременности.

ЗИГОТА (Zygote) – оплодотворенная яйцеклетка.

ЗАТРАВКА (Primer) – короткая последовательность (часто это РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК; образует свободный 3-ОН-конец, используя который ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОВТОРЫ (Inverted repeats, IR) – две копии одной и той же последовательности ДНК в составе одной молекулы, находящиеся в противоположной ориентации. Прилежащие друг к другу инвертированные повторы образуют палиндром.

ИНТРОН (Intron) – транскрибируемый участок ДНК, который удаляется из состава транс-крипта при сплайсинге; в результате последовательности, находящиеся по обе стороны от ин-трона (экзоны), объединяются.

КАЛЛУС – ткань, возникшая *in vivo* или *in vitro* путем неорганизованной пролиферации клеток растений и эксплантов.

КАЛЬМОДУЛИН (Calmodulin) – вторичный посредник гормонов растений и животных. После присоединения двух ионов кальция из него выделяется активная субъединица, активирующая определенные протеинкиназы.

КАРИОТИП (Karyotype) – набор хромосом, характерных для данного вида.

КЛЕТКИ-МИШЕНИ (Cells targets) – клетки, имеющие рецепторы того или иного фитогормона и изменяющие метаболизм при изменении концентрации фитогормона.

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ (Cell selection) – метод выделения мутантных клеток и сома-клональных вариаций с помощью селективных условий

КЛОН (Clone) – культура, возникшая из одной клетки.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ (Clonally micro propagation) – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному.

КЛОНИРОВАНИЕ (Cloning) – получение генетически идентичных

популяций организмов.

КОДОН (Codon, triplet, coding triplet) – триплет нуклеотидов, соответствующий определенной аминокислоте или терминирующему сигналу.

КОМБИКОРМА – белковые концентраты, предназначенные для балансирования кормов по содержанию белков и незаменимых аминокислот.

КОМПЕТЕНЦИЯ (Competence) – способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

КОМПЛЕМЕНТАРНАЯ ЦЕПЬ (Complementary strand) – одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и комплементарная ей.

КОРМОВОЙ КОНЦЕНТРАТ ЛИЗИНА (ККЛ) (Fodder (feed) concentrate of lysine) – промышленный кормовой препарат, обогащенный лизином (до 10%).

КОРМОВОЙ КОНЦЕНТРАТ ТРИПТОФАНА (ККТ) (Fodder (feed) concentrate of tryptophane) – промышленный кормовой препарат, обогащенный триптофаном (до 3%)

КОРМОВЫЕ ВИТАМИННЫЕ ПРЕПАРАТЫ (Feed vitamin preparation) – промышленные кормовые препараты, обогащенные витаминами.

КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ (Feed teasts) – отселектированные штаммы дрожжей, используемые для промышленного получения кормовых белков.

ЛАКТОГЛОБУЛИН (Lacto globulin) – один из белков молока.

ЛИГИРОВАНИЕ (Ligation) – образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также в случае соединения тупых концов и при образовании связи в РНК.

ЛИНИЯ – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

ЛИПКИЙ КОНЕЦ (Stricky end) – свободный одноцепочечный конец двуцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩИЙ ГОРМОН (Luteinizing hormone, LH) – гормон передней доли гипофиза, вызывающий овуляцию.

МАРКЕР (ДНК) (Marker) – фрагмент ДНК известного размера, используемый для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

МАРКЕРНЫЙ ГЕН (Marker gene) – ген, идентифицированный по месту расположения и имеющий четкое фенотипическое проявление.

МАРКИРОВКА ПРОДУКТОВ ИЗ ГМО (Labeling of GMO products) – нанесение специальных меток-обозначений (символов) на упаковке товаров и продуктов, полученных с использованием ГМО и продуктов их переработки при реализации

МЕЙОЗ (Meiosis) – процесс деления, происходящий в развивающихся половых клетках и приводящий к редукции числа хромосом и к рекомбинации генов.

МЕРИСТЕМА (Meristem) – образовательные ткани с активно делящимися клетками.

МЕТАБОЛИЗМ (Metabolism) – промежуточный обмен, т.е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

МЕТАН (Methane) – болотный или рудничный газ (CH_4) – простейший насыщенный уг- леводород. Газ без цвета и запаха.

МЕТАНТЕНК (Methane tank)– резервуар для получения биогаза (метана) из навоза и других органических отходов и их обеззараживания с помощью бактерий и других микроорганизмов без доступа воздуха.

МОНОЗИГОТИЧЕСКИЕ БЛИЗНЕЦЫ (Monozygotic twins) – близнецы, развивающиеся из одной зиготы в результате ее деления на две равные или неравные части.

МОНОПЛОИД – ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

МОРУЛА (Morula) – эмбрион начальной стадии развития, образующийся в результате дробления зиготы.

МОРФОГЕНЕЗ (Morphogenesis) – процесс формирования роста и развития органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка).

МУТАЦИЯ (Mutation) – изменение в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменения структуры хромосом или полиплоидизации.

МИТОЗ (Mitosis) – деление эукариотической соматической клетки.

МУТАГЕНЫ (Mutagens) – факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций, вызывая изменения в ДНК.

НЕЗАМЕНИМЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ (Essential amino acids) – аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и животных.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ (Nucleic acids) – это наиболее высокомолекулярные природные соединения (полимеры), состоящие из остатков различных нуклеотидов. Существует два типа нуклеиновых кислот: РНК, ДНК.

ОВУЛЯЦИЯ (Ovulation) – высвобождение созревающей яйцеклетки из фолликула. **ОМОЛОЖЕНИЕ (Rejuvenation)** – усиление жизнедеятельности, связанное с интенсифика-

цией синтеза белков и нуклеиновых кислот, активацией роста и клеточных делений, возникновением и накоплением эмбриональных тканей и общим усилением физиологических функций.

ОПЕРОН (Operon) – единица генетической экспрессии, в состав которой входят один или несколько связанных между собой структурных генов, а также промоторный, операторный и другие регуляторные участки, контролирующие транскрипцию оперона.

ОРГАНОГЕНЕЗ (Organogenesis) – процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ СУПЕРСПИРАЛИЗАЦИЯ (Negative supercoiling) –

введение в двух-цепочечную ковалентно замкнутую ДНК супервитков, направление которых противоположно направлению витков цепей молекулы.

ПАРТЕНОГЕНЕЗ (Parthenogenesis) – развитие особи с участием только материнских генов.

ПЛАВЛЕНИЕ ДНК (DNA melting) – денатурация ДНК.

ПЛАЗМИДА (Plasmid) – кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

ПОЛИПЛОИД (Polyploid) – ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3X, 4X и т. д.).

ПОЛОВОЙ ПРОЦЕСС (Sexual process) – слияние мужской спермии и женской (яйцеклетка) половой клетки, в ходе которого образуется диплоидная клетка (зигота) и определяется пол будущей особи.

ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ (Sexual chromosomes) – хромосомы, определяющие пол особи (обозначаются буквами: X, Y, W, Z и т. д.).

ПРОМОТОР (Promotor) – участок гена, ответственный за начало его транскрипции. **ПРОНУКЛЕУС (Pronucleus)** – ядро (мужское, женское) оплодотворенной яйцеклетки.

ПРОТОННАЯ ПОМПА (Proton pump) – белки-переносчики протонов, переносящие их через клеточные мембраны.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ (Proliferation) – новообразование клеток и тканей путем размножения. **ПРОТОПЛАСТ (Protoplast)** – растительная клетка, лишённая клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

ПРОФАГ (Prophage) – фаговый геном, интегрированный в бактериальную хромосому.

РЕЖИМЫ СБРАЖИВАНИЯ (Fermentation regimes) – (психрофильный, мезофильный и термофильный) температурные режимы, обеспечивающие наиболее благоприятные условия для жизнедеятельности соответственно психрофильных, мезофильных и термофильных микроорганизмов.

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК (DNA replication) – самоудвоение молекулы ДНК путем образования ее копии при помощи набора ферментов (ДНК-полимераз, лигаз и др.).

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГЕН (Recombinant gene) – ген, состоящий из компонентов различных генов.

РЕКОМБИНАЦИЯ (Recombination) – изменение положения генов в хромосомах.

РЕПРЕССОР (Repressor) – вещество, образуемое геном-регулятором и способное само по себе, либо совместно с корепрессором репрессировать структурные гены соответствующего оперона

РЕТИКУЛУМ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ (ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СЕТЬ) (Endoplasmic reticulum) – система мелких трубчатых или пузыревидных плазматических образований (диаметр 70-150 мкм), окруженных непрерывной мембраной и гомогенным бесструктурным содержимым (цитоплазматическим матриксом). В большинстве клеток эти элементы составляют единую сеть, связанную с другими компонентами клеток.

САМКА-ДОНОР (Female-donor) – донор яйцеклеток или эмбрионов – самка в начальной стадии беременности, из половых путей которой извлекают яйцеклетки (эмбрионы).

САМКА-РЕЦИПИЕНТ (Female recipient) – самка, в половые пути которой вводятся яйцеклетки (эмбрионы) для дальнейшего вынашивания (синонимы: приемная мать, ложнобеременная самка).

СИНЕРГИЗМ (Synergism) – эффект взаимоусиления факторов.

СОМАКЛОНЫ (Somaclones) – растения, полученные из любых форм вегетативных культивируемых клеток.

СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ (Somatic hybridization) – процесс получения гибридных клеточных линий путем слияния изолированных протопластов.

СОМАТИЧЕСКИЙ ГИБРИД (Somatic hybrid) – растение, полученное путем гибридизации изолированных протопластов.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ (Somatic embryogenesis) – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.

СУБЪЕДИНИЦЫ (Subunits) – белковые глобулы, из которых составляются молекулы белков (четвертичная структура).

СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ (Subcultivation) – перенос транспланта (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

СУБПРОТОПЛАСТ – изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

СУПЕРОВУЛЯЦИЯ (Super ovulation) – вызываемая гормонами, множественная овуляция самок.

СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА (Suspension culture) – выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

ТЕХНОЛОГИЯ ГЛУБИННОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ (Deep fermentation technology) – выращивание микроорганизмов в жидкой питательной среде.

ТЕХНОЛОГИЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ (Solid phase fermentation technology) – выращивание микроорганизмов на твердой питательной среде.

ТОТИПОТЕНТНОСТЬ (Totipotency) – свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития при определенных условиях выращивания.

ТРАНСГЕН (Transgene) – ген, перенесенный в геном клеток и организмов в результате трансгенеза.

ТРАНСГЕНОЗ (Transgenesis) – перенос генов в клетки и организмы многоклеточных организмов.

ТРАНСГЕННЫЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ГМО)

(Transgenic, genetic modified organisms) – растения, животные, микроорганизмы и вирусы с измененной наследственностью, вызванной

включением их в геном чужеродных генов при помощи генно-инженерных методов.

ТРАНСЛЯЦИЯ (Translation) – синтез белка на рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

ТРАНСКРИПЦИЯ (Transcription) – образование РНК копии ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

ТРАНСПЛАНТ (Transplant, (Inoculum)) – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Акимова, С. А. Биотехнология [Электронный ресурс] : практикум / С. А. Акимова, Г. М. Фирсов. - 2-е изд. - Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2018. 144 с. - Режим доступа:<https://e.lanbook.com/book/112369>.<https://e.lanbook.com/book/112369>.
2. Клопов, М. И. Гормоны, регуляторы роста и их использование в селекции и технологии выращивания сельскохозяйственных растений и животных [Электронный ресурс]: учебное пособие / М. И. Клопов, А. В. Гончаров, В. И. Максимов. - 3-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2020. - 376 с. - Режим доступа:<https://e.lanbook.com/book/130490>. - ISBN 978-5-8114-1940-1 : Допущено УМО учреждений РФ по образованию в области ветеринарии и зоотехнии в качестве учебного пособия для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария» (квалификация «ветеринарный врач»), по направлению подготовки «Зоотехния» (квалификация (степень) «бакалавр») и по направлению подготовки «Зоотехния» (квалификация (степень) «магистр») <https://e.lanbook.com/book/130490>
3. Якупов, Т. Р. Молекулярная биотехнология [Электронный ресурс]: учебник для вузов / Т. Р. Якупов, Т. Х. Фаизов. - 2-е изд., стер. - Санкт-Петербург: Лань, 2020. - 160 с. - Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/145846><https://e.lanbook.com/img/cover/book/145846.jpg> (Обложка). - ISBN 978-5-8114-5820-2 : <https://e.lanbook.com/book/145846>,
4. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года / утверждено председателем правительства Российской Федерации В. Путиным 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8. – М., 2012. – 76 с.
5. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах: учебно-методическое пособие / сост.: Блинов В.А. – Саратов: 410005, Саратов, Пугачевская, 161, офис 320, 2008. – 102 с.
6. Общая и фармацевтическая биотехнология: учебное пособие. – Самара: НОУ ВПО СМИ «РЕАВИЗ», 2012. – 118 с.
7. Рабочие материалы к стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности до 2020 года / Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Союз предприятий биотехнологической отрасли. – М., 2009. – 85 с.
8. Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6 Тарантул, В.З. Толковый биотехнологический словарь русско-английский: справочное издание [Электронный ресурс] / В.З. Тарантул. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN: 978-5-95-51-0342-6
9. Цыренов, В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных. Учебно-методическое пособие / В.Ж. Цыренов. – Улан-

Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 48 с. 15. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин – М.: Высшая школа, 2003. – 469 с.

9. Журналы: «Зоотехния», «Ветеринария», «Комбикорма», «Животноводство России», «Биотехнология», «Молочное и мясное скотоводство», «Птицеводство», «Свиноводство», «Комбикормовая промышленность», «Мясные технологии», «Молочная промышленность».

9. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» – <http://www.cbio.ru>
18. <http://www.biotechnolog.ru>

10. Электронное периодическое издание: журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии» – <http://www.biorosinfo.ru/archive/journal/>

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети Интернет, необходимых для освоения дисциплины:

Электронный каталог библиотеки ИрГАУ «Ирбис»

ЭБС «Лань»<http://www.e.lanbook.com/>

Электронно-библиотечная система "AgriLib"<http://ebs.rgazu.ru/>

ЭБС «Рукопт»<http://www.rucont.ru/>

Научная электронная библиотека elibrary.ru<http://elibrary.ru/>

Единое окно доступа к образовательным ресурсам<http://window.edu.ru/>

Росметод, всероссийская информационно-образовательная система <http://www.rosmetod.ru/> Справочно-правовая система

«КонсультантПлюс»

