

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания к лабораторным занятиям

\

Новосибирск 2022

УДК 577.21+ 612.6.05 + 575.1
ББК 58
С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Составитель: Себежко О.И., к.б.н., доц.

Рецензент: Дементьев В. Н. д.с.-х., проф.кафедры разведения, кормления и частной зоотехнии НГАУ

Прикладная биотехнология: метод. указания к лабораторным занятиям / сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос.аграр. ун-т. Биолого-технолог. Ин-т.– Новосибирск, 2022. –77 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов-магистров Биолого-технологического института, обучающихся по специальности 06.04.01 «Биология», профиль «Биологические ресурсы и экология».

Изложены основные разделы курса «Прикладная биотехнология», которые студенты должны изучать на лабораторных занятиях. Приведены глоссарий, библиографический список, вопросы для контроля.

Методические указания утверждены и рекомендованы к изданию на учебно-методическом совете БТФ (протокол № 7 от 29.09. 2022 г.).

©Новосибирский государственный аграрный университет, 2022

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология наряду с информатизацией стала одним из главных научно-практических направлений XXI века, определяющих уровень мировой цивилизации.

Продукция, получаемая с помощью методов промышленной биотехнологии, имеет выход практически во все отрасли народного хозяйства: медицину (антибиотики, гормоны, вакцины, ферменты, диагностические системы), сельское хозяйство (кормовой белок, аминокислоты, средства защиты растений и животных), пищевую промышленность (дрожжи, спирт, глюкозные сиропы), химическое производство (полисахариды, биodeградируемые полимеры, биокатализ), энергетику (биоэтанол, биогаз, биодизель), экологию (биоремедиация, сохранение биоразнообразия).

Помимо решения существующих и краткосрочных задач биотехнология имеет значение как средство решения долгосрочных проблем, а именно: переход от использования невозобновляемых ресурсов к возобновляемому сырью. В связи с истощением минеральных природных запасов, изменением климата планеты и ростом народонаселения это является глобальной геополитической задачей.

Цель методических указаний к лабораторно-практическим занятиям, сопровождающих лекционный курс "Прикладная биотехнология" - обучить приёмам и методам по ключевым направлениям современной биотехнологии: геномике и протеомике, технике молекулярно-генетических исследований, новейшим аналитическим приёмам, ключевым задачам биоинженерии.

Цикл занятий включает 30 часов лабораторных работ.

Лабораторные занятия направлены на формирование у студентов представлений о возможностях и уровне современной биотехнологии и её методологии; включают следующие разделы:

- Промышленная биотехнология;
- Экологическая биотехнология;
- Современные достижения биотехнологии в сельском хозяйстве;
- Биотехнологические методы консолидации и размножения генотипов выдающихся животных;
- Пищевая биотехнология;
- Медицинская биотехнология;
- Иммобилизованные биообъекты в биотехнологиях;
- Санитарная и профилактическая биотехнология.

Цели и задачи дисциплины "Прикладная биотехнология"

Дисциплина "Прикладная биотехнология" (Б.1.В.ОД.4) относится к вариативной части, обязательная дисциплина.

Дисциплина "Прикладная биотехнология" предназначена дать студенту целостное представление о современном состоянии биотехнологии как новом направлении научной и практической деятельности человека, имеющем в своей основе использование биологических объектов (клетки микроорганизмов, клетки тканей, животных, растительных клеток и т.д.) или молекул (нуклеиновые кислоты, белки-ферменты, углеводы и т.п.) для целей сельского хозяйства, здравоохранения, экологической защиты.

В соответствии с назначением основной целью дисциплины является формирование у студента профессионального уровня знаний и понимания прикладного значения биотехнологии в современном обществе, связи биотехнологии с практикой и ее народно-хозяйственное значение.

Исходя из цели, в процессе изучения дисциплины решаются следующие задачи:

- рассмотреть современное состояние и перспективы развития биотехнологии;
- усвоить технологические приемы и особенности культивирования микроорганизмов;
- изучить микробиологическое производство различных веществ;
- освоить использование различных методов биотехнологии в промышленной, экологической, сельскохозяйственной, пищевой, медицинской отраслях;
- ознакомиться с биологическими методами охраны и восстановления окружающей среды;
- обобщить значимость биотехнологии для экологического воспитания и формирования естественнонаучного мировоззрения;
- освоить методы биотехнологии в воспроизводстве животных;
- изучить перспективы генетической инженерии в животноводстве;
- овладеть инновационными методами биотехнологии в селекции животных.

ЛАБАРАТОРНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Раздел 1. Предмет прикладной биотехнологии.

Тема 1. Основн. направления и методы биотехнологии. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии.

Лабораторно-практические занятия не предусмотрены.

Раздел 2. Современные проблемы и методы биотехнологии.

Тема 2.1 Генетическая и клеточная инженерия.

Лабораторная работа № 1 "Выделение и анализ ДНК" (2ч)

Цель работы: знакомство с методами выделения ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи:

знакомство с лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии;
основные правила работы в лаборатории, техника безопасности;
выделение ДНК из цельной крови крупного рогатого скота.

Внимание!

Инструктаж по технике безопасности работы в лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии. Студенты без халатов не допускаются до лабораторных занятий!

Работы с генетическим материалом и при постановке ПЦР требуют специальных условий:

1. Все работы проводятся в перчатках, спецодежде (лабораторные халаты).
2. В лаборатории нельзя есть, пить, курить, разговаривать над открытыми пробирками.
3. До и после проведения работ необходимо тщательно вымыть руки.
4. Обо всех нестандартных ситуациях необходимо немедленно уведомить преподавателя.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
6. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
7. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
8. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
9. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
10. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
11. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
12. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
13. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
14. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
15. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
16. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
17. Ножницы медицинские;
18. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;
19. Ступки фарфоровые с пестиком.
20. Набор для выделения ДНК из цельной крови, x100 фирмы "Медиген";

Правила работы с тест-системами и оборудованием

1. Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.
2. Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.
3. При работе с наборами следует использовать только новые наконечники и пробирки.
4. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы

реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

6. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

7. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

8. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится выделение, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ.

Ход работы:

1.Выделяем ДНК из цельной крови строго следуя инструкции прилагаемой к набору фирмы "Медиген".

2. Маркируем пробирки.

3.Хранение в морозильной камере до следующей лабораторной работы.

Вопросы

1. Каковы основные цели и задачи генной инженерии?

2.В чём отличия между селекцией растений и генной инженерией растений при одинаковой конечной цели - получение новых сортов?

3.Основные положения, лежащие в основе молекулярно-генетических методов?

4. Каковы принцип выделения ДНК и РНК?

5.Основные методы выделения нуклеиновых кислот?

Лабораторная работа № 2" Анализ полученных препаратов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле" (2 ч)

Цель работы: знакомство с методами рестрикционного анализа ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи: оценка качества полученного препарата с помощью электрофореза в геле агарозы.

Для оценки количества и качества ДНК, а также размеров молекул ДНК используют электрофорез в гелях агарозы (горизонтальный) или полиакриламидных гелях (вертикальный электрофорез). Молекулы ДНК визуализируются интеркалирующими флуоресцентными красителями, например, бромистым этидием. Двухцепочечная ДНК эффективно связывает бромистый этидий и начинает ярко флуоресцировать при облучении ультрафиолетом (УФ). Результаты электрофореза документируют в проходящем УФ-свете с помощью цифровой фотокамеры или специальной системы для документирования гелей.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
6. Источник постоянного тока;
7. Камера с заливочным столиком;
8. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
11. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
12. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;
18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
19. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
20. Ножницы медицинские;
21. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;

22. Ступки фарфоровые с пестиком.

23. Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: TBE-буфер, агароза.

Ход работы:

1. Приготовить буфер TAE (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0) для электрофореза разведением стокового раствора TAEх50.
2. Приготовить 1 % гель агарозы на TAE-буфере путем расплавления навески агарозы в микроволновой печи. После остывания до умеренно горячего состояния добавить бромистый этидий до 0,25 мкг/мл и залить гель в форму.
3. Нанести 1 и 2 мкл полученного препарата рядом с 1 мкл маркерной ДНК в лунки приготовленного 1 % геля агарозы. Образцы перед нанесением смешивают с 1 мкл буфера для нанесения и электрофорезным буфером так, чтобы наносимый объем составил 10–15 мкл, для равномерного распределения ДНК по толщине геля.
4. Провести электрофорез в течение 30 мин при напряжении 100 В.
5. С помощью системы видеодокументации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм.
6. Идентифицировать полосы ДНК в препарате. Оценить суммарное количество ДНК во внесенной в гель пробе путем сопоставления интенсивности свечения полос полученного препарата с интенсивностью свечения стандартной ДНК. После этого пересчитать количество полученной ДНК на общий объем препарата.
7. Записать вывод о качестве и количестве полученного препарата ДНК.

Вопросы

1. На чем основано разделение макромолекул ДНК при агарозном гель-электрофорезе?
2. Как можно определить размер молекул ДНК?
3. С какой целью используют маркерную ДНК?
4. Виды электрофореза?
5. Ошибки при проведении электрофореза.

Лабораторная работа № 3 "Рестрикционный анализ полученного препарата ДНК" (2 ч)

Цель работы: знакомство с методами рестрикционного анализа ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи: рестрикционный анализ выделенной ранее ДНК, определение размеров рестрикционных фрагментов ДНК.

Рестриктазы, или, более корректно, рестрикционные эндонуклеазы, являются важнейшими инструментами создания рекомбинантных ДНК и физического картирования ДНК-молекул. Рестриктазы расщепляют двухцепочечную ДНК внутри молекулы. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов (сайт узнавания) и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его (сайт расщепления).

Наиболее широкое применение в генной инженерии нашли высокоспецифичные рестриктазы, узнающие палиндромные последовательности ДНК и расщепляющие ДНК-молекулу внутри сайта узнавания. При этом могут образовываться концы цепей трех структурных типов. Если разрыв происходит посередине сайта рестрикции, то образуются фрагменты с полностью спаренными ("тупыми") концами. Когда расщепление ДНК происходит в стороне от середины сайта, образуются выступающие одонитевые концы, получившие название "липких", т. е. способных "слипаться" с комплементарным концом, образующимся в противоположной цепи в результате ее разрыва. Число нуклеотидов в одонитевом концевом участке может варьировать от одного до пяти.

Молекулы ДНК из разных источников, обработанные одной и той же высокоспецифичной рестриктазой, расщепляющей палиндромные последовательности, будут иметь одинаковые гибридизующиеся между собой липкие концы. Наличие таких липких концов у фрагментов ДНК существенно облегчает их ковалентное сшивание специальным ферментом ДНК-лигазой (лигирование) в рекомбинантную молекулу.

Поскольку рестриктазы узнают специфические последовательности в молекуле ДНК, становится возможным физически определить месторасположение таких последовательностей, обрабатывая ДНК соответствующими рестриктазами. Физическую карту молекулы ДНК по рестрикционным сайтам можно составить, анализируя длины фрагментов ДНК после расщепления различными рестриктазами.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
- 5.Рборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
- 6.Источник постоянного тока;
- 7.Камера с заливочным столиком;
- 8.Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- 11.Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- 12.Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл
14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл
15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл
16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;
17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)оС. ГОСТ 26678;
18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;
19. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;
20. Ножницы медицинские;
21. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;
22. Ступки фарфоровые с пестиком.
23. Рестриктазы ("Медиген")
- 24.Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: ТВЕ-буфер, агароза.

Ход работы:

1. Выбрать рестриктазы для проведения расщепления полученного препарата ДНК в двух вариантах реакции гидролиза двумя рестриктазами одновременно.
2. Для каждого из вариантов из каталога фирмы-поставщика (Сибэнзим, Медиген) выбрать состав реакционной смеси, в которой одновременно активны обе из используемых рестриктаз.
3. По данным определения содержания ДНК в полученном препарате

выбрать объемы пробы для рестрикционного анализа. Определить необходимое количество единиц активности рестриктазы для полного гидролиза полученного препарата за 30 мин и в соответствии с этим добавляемый объем фермента. Записать состав реакционной смеси.

4. Собрать реакции в двух вариантах и инкубировать 30 мин при оптимальной температуре расщепления для конкретных ферментов. В качестве отрицательного контроля ставится проба ДНК без добавления ферментов – всего 3 микропробирки.

5. Провести электрофорез гидролизованных образцов в 1 % геле агарозы вместе с маркерными ДНК.

6. Оценить полноту расщепления пробы и размер полученных рестрикционных фрагментов. Сопоставить полученный размер с ожидаемым. Записать выводы.

Вопросы

1. Каково происхождение рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз)?
2. Каково значение открытия рестриктаз для развития методов клонирования и физического картирования ДНК?
3. Почему рестриктазы I и III типа практически не используются в генной инженерии?
4. Физическое картирование.
5. Сколько всего известно рестриктаз и сколько используется в генной инженерии?

Раздел 3. Промышленная и экологическая биотехнология

Практическое занятие № 1. (2ч)

Тема: Биотехнологический процесс — стартовый этап для получения исходного сырья (на примере технологий получения дифтерийного анатоксина)

Интерактивный метод "развивающей кооперации."

При этом методе ставится задача, которую трудно выполнить в индивидуальном порядке и для которой нужна кооперация, объединение учащихся с распределением внутренних ролей в группе. Для решения проблемы, создаются группы учащихся из 3-4 человек. Группа формируется так, чтобы в ней был «лидер - генератор идей», «оппонент» и

«исследователь». После того, как каждая группа предложит свой вариант решения, начинается дискуссия, в ходе которой группы через своих представителей должны доказать истинность своего варианта решения.

Цель занятия: приобретение студентами знаний об общих закономерностях биотехнологического процесса.

Алгоритм занятия:

- 1) задача для студентов: разработка принципиальной схемы производства дифтерийного анатоксина.
- 2) магистрантов разбиваем минимум на 2 группы в зависимости от количества студентов.
- 3) распределяем задания в группе
 - актуальность использования анатоксинов
 - особенности биологического действия дифтерийного анатоксина
 - промышленное производство анатоксинов
 - есть ли альтернатива дифтерийному анатоксину
 - осложнения при применении анатоксинов
- 4) направленная дискуссия с акцентом на промышленное производство анатоксинов
- 5) вывод о ценности и необходимости использования дифтерийного анатоксина на современном этапе.

Принимая во внимание исключительную прикладную ценность биотехнологии, представляется крайне важным проанализировать и систематизировать основные объекты и этапы биотехнологического процесса, комплексно рассмотреть базовые методы и подходы, имеющих место в промышленной биотехнологии, описать технологическое оборудование, схемы ведения работ и, соответственно, продукты, получаемые в результате биотехнологического производства.

Промышленная биотехнология, находящая применение в таких ключевых направлениях, как медицина и сельское хозяйство, производство химических веществ и пищевых продуктов, биоэнергетика и биоэлектроника, восстановление и защита окружающей среды, материаловедение, биогеотехнология и других, является универсальным инструментарием по борьбе со стихийным развитием цивилизации и обеспечению её управляемого устойчивого непрерывного прогрессирования.

На начальной, *подготовительной стадии* осуществляется приготовление необходимого сырья с заданными свойствами, подразумевающее, в зависимости от целевой продукции, такие методы, как: заготовка

специальной среды с нужными компонентами, стерилизация газов путём очистки от излишних веществ, подготовка посевного материала либо биокатализатора.

На основной, *биотехнологической стадии*, с помощью тех или иных перечисленных выше биообъектов, происходит преобразование исходного сырья в желаемый продукт. Данный этап включает в себя синтез новых органических соединений, а также процессы: биотрансформация, ферментация, биокатализ, биоокисление, метановое брожение, биокомпостирование, бактериальное выщелачивание, биосорбция, биodeградация.

На последней, *заключительной стадии* технологического процесса биотехнологического производства получается запроектированная готовая продукция. Однако, целевой продукт на текущем этапе изначально находится в биомассе либо жидкости. Для их разделения можно воспользоваться следующими методами: отстаивание, фильтрация (в том числе микро- и ультрафильтрация), сепарация / центрифугирование и др.

Отдельные виды болезнетворных микроорганизмов образуют экзотоксины. Они представляют собою высокополимерные термолабильные белки — продукты матричного синтеза, секретирующиеся в окружающую среду.

Обработка экзотоксинов формалином сопровождается их полным обезвреживанием при сохранении антигенных свойств. Обезвреженные токсины называют анатоксинами, или токсоидами. Их используют для получения антитоксических сывороток (глобулинов). В практике здравоохранения находят применение следующие анатоксины: ботулинический, гангренозный, дифтерийный, стафилококковый, столбнячный.

Технология получения экзотоксинов включает следующие стадии: культивирование соответствующего штамма патогенного микроба-продуцента на определенной питательной среде и при оптимальных режимах (рН, температура, аэрация или анаэробизм, продолжительность выращивания), обезвреживание формалином при 37—40°C, сепарирование клеток (отход) от культуральной жидкости, содержащей анатоксин; очистка, концентрирование, добавление адсорбента, фасовка, упаковка. В качестве адсорбентов обычно используют неорганические вещества — алюминия гидроксид, алюминия фосфат, кальция фосфат и т. п. (в России применяют гидроксид алюминия), которые создают депо в организме при введении анатоксинов. Таким образом, удается повысить эффективность иммунизации.

Очищенные адсорбированные анатоксины — это жидкие препараты-суспензии, расслаивающиеся на белый, светло-коричневый или желтоватый осадок и прозрачную надосадочную жидкость.

Возбудители дифтерии, типовой вид *Corynebacterium diphtheriae*, относятся к роду *Corynebacterium* и входят в группу 20 (Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы) по определителю Берджи.

C. diphtheriae - палочки средней величины с булабовидными утолщениями на концах. Спор, капсул не образуют, неподвижны. Грамположительны. Факультативные анаэробы. Требовательны к питательным средам. По культуральным и биохимическим свойствам выделяют три биовара *C. diphtheriae*: *gravis*, *mitis*, *intermedius*.

Возбудители имеют видовой (О) и вариант-специфический (К) антигены. К факторам вирулентности относятся фимбрии, обеспечивающие адгезию; ферменты агрессии и защиты (гиалуронидаза, нейраминидаза, протеаза), отвечающие за инвазивность возбудителя. Основной фактор вирулентности дифтерийных бактерий - образование экзотоксина, обладающего гистотоксическим, гемолитическим и дермoneкротическим действием. В патогенезе дифтерии ведущую роль играет гистотоксический компонент экзотоксина, который блокирует синтез белка в клетках макроорганизма, что приводит к их гибели и некрозу пораженной ткани.

Дифтерия - антропонозная инфекция, передаваемая воздушно-капельным и контактно-бытовым путями. Клинически - это системное бактериально-токсическое заболевание. Возбудитель остается на месте входных ворот, а все проявления дифтерии связаны с действием токсина. Дифтерия характеризуется локальным фибринозным воспалением с образованием специфической плотной, спаянной с подлежащей тканью пленки, развитием отека и некроза ткани в месте внедрения возбудителя. Наблюдается общая интоксикация с поражением сердечно-сосудистой системы, почек и надпочечников, дыхательной мускулатуры, нервной системы. Чаще встречается дифтерия зева, гортани, носа, реже - половых органов, кожи, ран.

После перенесенного заболевания развивается достаточно напряженный антитоксический иммунитет. Антибактериальный компонент менее выражен. Уровень антитоксического иммунитета можно установить в РПГА. Микробиологическая диагностика дифтерии основана на бактериологическом исследовании, материал для которого берется из очага поражения. Возможно обнаружение экзотоксина в крови больного с помощью методов иммуноиндикации.

Для лечения дифтерии обязательно применение противодифтерийной антитоксической сыворотки. Антибиотики назначаются по показаниям. Специфическая профилактика дифтерии проводится дифтерийным анатоксином. Он может использоваться в виде отдельного препарата, а также в комбинации со столбнячным анатоксином (АДС-анатоксин), или в форме АКДС-вакцины (ассоциированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина).

Дифтерийный анатоксин.

Профилактика дифтерии осуществляется путем создания антитоксического иммунитета, что достигается путем введения дифтерийного анатоксина. Ранее для этих целей использовался так называемый нативный анатоксин. В настоящее время дифтерийный анатоксин представляет собой очищенный концентрированный препарат, адсорбированный на гидрате окиси алюминия и содержащий в 1 мл 60 антигенных (флоккулирующих) единиц дифтерийного анатоксина и не более 2 мг гидрата окиси алюминия. Сырьем для получения этого препарата служит нативный анатоксин. Для его получения в производственных лабораториях используются следующие штаммы дифтерийной палочки: Парк-Вильямс, Дессау, Вейсензее, Массачусетс. Готовый препарат разливается в ампулы по 1,0 мл. Он годен в течение трех лет со времени контроля биологических свойств. Хранить его следует в сухом месте при 4-10 °С. Очищенный концентрированный анатоксин должен быть гомогенным при встряхивании. Замораживание, даже однократное, делает препарат непригодным, так как в нем образуются неразбивающиеся хлопья. Дифтерийный анатоксин применяется либо как таковой, либо в комплексе с коклюшной вакциной (КД) и столбнячным анатоксином (ДС), или с обоими этими препаратами (КДС). В настоящее время он используется в качестве компонента АКДС.

При этом методе ставится задача, которую трудно выполнить в индивидуальном порядке и для которой нужна кооперация, объединение учащихся с распределением внутренних ролей в группе. Для решения проблемы, создаются группы учащихся из 3-4 человек. Группа формируется так, чтобы в ней был «лидер - генератор идей», «оппонент» и «исследователь». После того, как каждая группа предложит свой вариант решения, начинается дискуссия, в ходе которой группы через своих представителей должны доказать истинность своего варианта решения.

Вопросы

1. Перечислите основные стадии биотехнологического процесса.
2. Укажите основные проблемы промышленной биотехнологии на современном этапе.
3. Назовите некоторые перспективные направления промышленной биотехнологии в XXI веке.
4. Прикладное значение дифтерийного анатоксина.
5. Какие анатоксины кроме дифтерийного нашли своё применение.

Практическое занятие № 2. (2ч)

Тема: Использование биотехнологического процесса на одном из этапов получения лекарственного средства (биотрансформация — на примере технологии получения витамина С).

Метод "Интерактивная форма проведения занятия", на котором студенту предлагается решить задачу актуальности промышленного производства аскорбиновой кислоты, с привлечением лабораторно-технических средств, справочно-методических пособий и ресурсов Интернет.

Цель занятия: на конкретном примере познакомиться с промежуточными этапами биотехнологического производства.

Алгоритм занятия:

- 1) Студенты изучают предложенные материалы методического пособия
- 2) Знакомятся с интернет-ресурсами, посвящёнными промышленному производству аскорбиновой кислоты
- 3) Изучают методику определения витамина С в сыворотке крови.

Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие напротив усваивают в готовом виде из окружающей среды. Культура, способная синтезировать какой-либо витамин, называется автотрофной по отношению к нему, если культура не способна синтезировать данный витамин, она является автогетеротрофной.

Витамины синтезируют в основном химическим путем или получают из естественных источников. Однако эргостерин, рибофлавин (B_2), витамин B_{12} и аскорбиновую кислоту (микроорганизмы используются как селективные окислители сорбита в сорбозу при производстве витамина С) получают

микробиологическим путем. Для синтеза витаминов В₁, В₂, В₆, В₁₂ и аскорбиновой кислоты также используют кефирные грибки, а бифидобактерии – группы В, РР (никотиновая кислота) и Н, однако пока эти микроорганизмы не используются как продуценты витаминов в промышленных масштабах.

Изменяя условия среды, содержание отдельных витаминов можно увеличить. Так, количество рибофлавина зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде. Количество витаминов в клетках, а также их выделение из последних можно изменить при помощи микроэлементов. Существует производство рибофлавина на основе использования дрожжеподобных грибов *Emmenthycium ashbyii* и *Ashbia gossypii*. Рибофлавин продуцируется также видами *Clostridium* и *Ascomycetes*. Микроводоросль *Dunaliella viridis* культивируется с целью получения β-каротина.

Аскорбиновая кислота впервые выделена в чистом виде Сцент-Гиорги в 1928 г. под названием гексуриновая кислота. В 1933 г. рядом исследователей установлена ее структура. Синтез ее осуществлен впервые Рейхштейном в Швейцарии, Гевортом в Англии, Хеуорзом и Хирстом с сотр. также в Англии.

Значение витамина С.

Аскорбиновая кислота принимает активное участие в окислительно-восстановительных процессах в организме и входит в состав ряда сложных ферментов, обуславливающих процессы клеточного дыхания. Витамин С участвует в процессах углеводного и белкового обмена, повышает сопротивляемость организма к инфекционным заболеваниям, регулирует холестериновый обмен, участвует в нормальном функционировании желудка, кишечника и поджелудочной железы; совместно с витамином Р обеспечивает нормальную эластичность стенок кровеносных капилляров, обезвреживает действие ряда лекарственных веществ и ядов. Аскорбиновая кислота применяется при лечении цинги, инфекционных заболеваний, ревматизма, туберкулеза, язвенной болезни, при гепатитах, шоковом состоянии и др.

При недостаточности аскорбиновой кислоты развивается гиповитаминоз, в тяжелых случаях -- авитаминоз (цинга, скорбут). При цинге наблюдается утомляемость, сухость кожи, расшатываются и выпадают зубы, наблюдаются боли в конечностях, снижается сопротивляемость к инфекциям. В конечном итоге, цинга приводит к летальному исходу.

В терапевтических дозах аскорбиновая кислота хорошо переносится и побочных эффектов не вызывает. При введении в больших дозах и в течение

длительного времени она может повреждать островковый аппарат поджелудочной железы и опосредованно почки.

Аскорбиновая кислота содержится в значительных количествах в овощах, плодах, ягодах, хвое, шиповнике, в листьях черной смородины.

Под влиянием высоких температур, кислорода, особенно в присутствии тяжелых металлов, витамин С легко разрушается. В организме человека и большинства животных аскорбиновая кислота не синтезируется.

Примерная суточная доза составляет 50--100 мг. В то же время, в некоторых случаях (тяжелые физические нагрузки, простудные заболевания) показаны увеличенные (ударные) дозы аскорбиновой кислоты (до 0,5-1,0 г и более на прием). Активным пропагандистом этих воззрений является известный американский химик, лауреат Нобелевской премии Л. Полинг.

Строение и физико-химические свойства аскорбиновой кислоты

Аскорбиновая кислота является производным моносахарида L-ряда. Аскорбиновая кислота представляет собой белое кристаллическое вещество с $T_{пл} 192^{\circ}$, очень чувствительна к нагреванию, хорошо растворима в воде, плохо в спиртах (за исключением метанола), практически нерастворима в неполярных растворителях. Она очень чувствительна к тяжелым металлам, медь и железо разрушающе, действуют на аскорбиновую кислоту.

Аскорбиновая кислота может быть получена из моносахаридов D- или L-ряда.

Известно несколько методов ее синтеза.

1. Бензоиновый метод. В основе лежит конденсация-- трезозы и этилглиокид в присутствии KCN. Метод неперспективен из-за дефицитности сырья, низкого выхода.
2. Циангидриновый метод. Аскорбиновую кислоту получают, исходя из L-лихозы или L-ксилозы. Практического применения не имеет из-за отсутствия сырья, синтез которого из D-глюкозы очень сложен.
3. Получение аскорбиновой кислоты из свекловичного «жом» (отходы производства сахара из свеклы). Метод предложен американцами в 1904 г. Метод нуждается в значительном усовершенствовании: из 100 кг жом получают всего 2,5 кг аскорбиновой кислоты.
4. Частично микробиологический метод получения аскорбиновой кислоты из D-глюкозы. Включает 5 стадий, в т. ч. 3 химических. В основе метода лежит окисление D-глюкозы уксуснокислыми бактериями до кальциевой соли 5-кетоглюконовой кислоты, которую превращают в L-аскорбиновую кислоту. Метод привлекает внимание ограниченным применением

химических реагентов. Однако выход продукта низок, а процессы микробиологического синтеза трудно управляемы.

5. Метод Рейхштейна. Синтез L-аскорбиновой кислоты из 2-кетоглюконовой кислоты. Основное сырье (D-глюкоза) и вспомогательные реагенты, применяемые для синтеза, используются в пищевой и химической промышленности. Метод нашел применение во многих странах, в т. ч. СССР. Усовершенствован во ВНИХФИ, в настоящее время отдельные стадии его совершенствуются в НПО «Витамины».

Метод Рейхштейна состоит из 6 стадий, включая 1 стадию микробного синтеза:

1 стадия. Получение D-сорбита из D-глюкозы методом каталитического восстановления водородом.

2 стадия. Получение L-сорбозы из D-сорбита путем его глубинного аэробного окисления уксуснокислыми бактериями.

3 стадия. Получение диацетон-L-сорбозы из L-сорбозы путем ее ацетонирования.

4 стадия. Получение гидрата диацетон-2-кетоглюконовой кислоты путем окисления диацетон-L-сорбозы.

5 стадия. Получение L-аскорбиновой кислоты из гидрата диацетон-2-кетоглюконовой кислоты (деацетонирование --> этерификация --> «енолизация» --> «лактонизация»).

6 стадия. Получение медицинской аскорбиновой кислоты. Перекристаллизация технической аскорбиновой кислоты.

Выход продукта в пересчете на глюкозу составляет в целом до 54%.

Стадия 2. Производство L-сорбозы из D-сорбита

Возможны два метода получения L-сорбозы из сорбита:

химический и микробиологический. Химический метод включает до 6 стадий, выход L-сорбозы составляет всего 0,75% от теоретически возможного, поэтому промышленного применения он не нашел.

Микробиологическое аэробное окисление можно представить следующей схемой:

Процесс окисления D-сорбита в L-сорбозу осуществляется биохимическим методом и является результатом жизнедеятельности аэробных кетогенных уксуснокислых бактерий, культивируемых на питательной среде, состоящей из D-сорбита и дрожжевого автолизата или экстракта.

Изучено окислительное действие различных микроорганизмов: *Ac. xylinum*, *Ac. xylinoides*, *Ac. suboxydans*. Наиболее эффективно использование иммобилизованных клеток *Gluconobacter Oxydans*.

Окисление осуществляется в присутствии биостимуляторов--аминокислот, витаминов группы В, ускоряющих процесс на 40%. Биостимулятор должен отвечать определенным требованиям: обеспечивать высокую скорость процесса, применяться в возможно меньших количествах, быть недорогим и простым в приготовлении, содержать мало балластных веществ, которые затрудняют выделение L-сорбозы и ухудшают ее качество. Биостимуляторы приготавливают, как правило, из дрожжей, подвергая их различным видам обработки. В настоящее время разработан способ приготовления ферментативного гидролизата дрожжей -- нового биостимулятора для получения L-сорбозы. Испытания его показали, что окисление сорбита в этих случаях происходит с более высокой скоростью, чем на используемом в производстве кислотном гидролизате дрожжей с кукурузным экстрактом.

Основные факторы, влияющие на процесс окисления:

- а) Состав и качество питательной среды. Качество зависит от степени очистки раствора D-сорбита. Так, при наличии в сорбите примесей могут протекать побочные процессы: образование D-глюконовой к-ты, б-кетп-О-глюконовой к-ты, D-фруктозы из манинита, а в кислой среде--5-оксиметилфурфу-рола. Сама L-сорбоза способна гидролизаться, легко превращаясь в муравьиную и левулиновую кислоты.
- б) Количество и качество воздуха. Процесс окисления является аэробным, поэтому интенсивность его зависит от количества и качества воздуха, подаваемого для аэрации питательной среды.
- в) Герметичность и высокая стерильность аппаратуры, недопустимость заражения среды посторонней микрофлорой.

Технологический процесс окисления D-сорбита в L-сорбозу состоит из следующих вспомогательных и основных операций:

1. Приготовление дрожжевого биостимулятора, дрожжевого автолизата и разбавленной серной кислоты.
2. Приготовление рабочей культуры.
3. Приготовление и выращивание посевного материала.
4. Проведение процесса биохимического окисления в производственном ферментаторе.
5. Выделение кристаллической L-сорбозы из окисленного раствора.
6. Выделение L-сорбозы из маточных растворов.

Биостимулятор готовят, как уже указывалось, из дрожжей, извлекая необходимые компоненты из дрожжевых клеток с помощью водной экстракции, автолиза, плазмолиза, кислотного гидролиза.

Питательной средой для рабочей культуры является очищенный раствор D-сорбита и автолизат пекарских дрожжей. В питательную среду добавляется

уксусная кислота до pH 4,8--5, осевной материал выращивают глубинным способом в специальных аппаратах--инокуляторах и посевных ферментаторах. Аппарат тщательно стерилизуют острым паром, затем в него засасывают питательную среду состава: 10%-ный раствор очищенного сорбита, биостимулятор, азотнокислый аммоний, трилон Б, небольшое количество олеиновой кислоты. В питательную среду добавляют серную кислоту до pH 5,4--6,0 и стерилизуют в течение 1 ч при температуре 120 °С. По окончании стерилизации раствор охлаждают до 35°С, вводят стерильную рабочую культуру уксуснокислых бактерий, витамины В₁ и В₃ и ведут процесс культивирования (глубинного окисления) при температуре 30--32 °С в течение 10--12 ч. После этого глубинную культуру стерильно переносят в посевные ферментаторы. Культуру из инокулятора проверяют на чистоту и степень окисления, которая не должна быть ниже 30%. В посевном ферментаторе добиваются глубины окисления не менее 40%, а в производственном--до 97,5--98% при времени окисления до 18--30 ч.

. Процесс ферментации ведут двумя способами: периодическим и непрерывным. Рассмотрим перспективный непрерывный способ.

Непрерывный способ ферментации включает 2 стадии:

- 1) непрерывное культивирование уксуснокислых бактерий при биохимическом окислении D-сорбита в проточных средах;
- 2) непрерывное выделение кристаллической L-сорбозы из окисленного раствора.

Способ определения аскорбиновой кислоты

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать трехвалентное железо в двухвалентное, образующее с 2,2'-дипиридилем комплексное соединение розового цвета.

Ход определения. К 2мл плазмы крови добавляли 0,3мл охлажденного 40%-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивали стеклянной палочкой и оставляли в течение 10 минут на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков. Центрифугировали образцы 20 минут при 2000 об/мин. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляли 0,5мл бидистиллированной воды, 0,1мл 85%-го раствора фосфорной кислоты (орто), 0,8мл 1%-го раствора 2,2'-дипиридила и 0,1мл 3%-го раствора хлорного железа. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивали и выдерживали 30 минут при комнатной температуре для проявления окраски.

После выдержки пробы центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин и колориметрировали на фотоэлектроколориметре при длине волны

525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5мм против контрольной пробы: вместо надосадочной жидкости брали дистиллированную воду, а затем поступали так, как с опытной пробой.

Расчет содержания витамина С производили при помощи калибровочного графика. Для его построения брали 33,3мг аскорбиновой кислоты и растворяли в 100мл 5%-го раствора ТХУ. 10мл этого раствора вносили в мерную колбу на 100мл и доливали до метки 5%-ым раствором ТХУ. В 6 мерных колб на 100мл вносили последовательно 4, 6, 8, 10, 20, 30 мл стандартного раствора и доводили до метки дистиллированной водой. По 1,5мл раствора из каждой колбы вносили в центрифужные пробирки, прибавляли по 0,1 85%-ой фосфорной кислоты (орто), 0,8мл 1%-го раствора α, α' -дипиридила и 0,1мл 3%-го раствора хлорного железа, после чего все тщательно перемешивали и оставляли на 30 минут для проявления окраски.

Перед колориметрированием все пробы центрифугировали в течение 5 минут при 2000 об/мин. Полученные результаты изображали графически на миллиметровой бумаге.

Вопросы

1. Биологическая роль аскорбиновой кислоты.
2. Перечислите основные методы синтеза витамина С.
3. Назовите основные стадии при промышленном производстве аскорбиновой кислоты.
4. Суточная потребность человека в витамине С.
5. Какие лекарственные формы аскорбиновой кислоты Вы знаете?

Практическое занятие № 3. (2ч)

Тема: Биотехнологические процессы очистки воздуха и воды.

Цель занятия: Познакомить студентов с основными биотехнологическими методами очистки воздуха и воды.

Применение микроорганизмов для очистки сточных вод

Каждый городской житель ежедневно «продуцирует» 150–200 дм³ сточных вод. При производстве 1 т бумаги объем сточных вод примерно такой же, как объем бытовых сточных вод от 1000 человек, и нередко сток одного химического предприятия соответствует по объему стокам города с миллионным населением.

Для городов с высоким уровнем экологической опасности характерно

наличие десятков различных высоко токсичных элементов в воде, атмосфере и почве. Например, в Санкт-Петербургской области наибольший ущерб когда-то чистой Неве наносят местные отрасли промышленности. Индустриальная база региона состоит в основном из предприятий, потребляющих огромное количество воды, энергии и ресурсов. Сотни промышленных предприятий сливают неочищенные отходы в открытую водную систему или в канализацию. Другие проблемы загрязнения связаны с огромным количеством воды, потребляемой частными домовладельцами.

Наблюдения Росгидромета свидетельствуют о тенденции повышения загрязненности водных ресурсов. Такая тенденция связана, прежде всего, с малоэффективной очисткой сточных вод. Практически без очистки сбрасываются в поверхностные водотоки и водоемы шахтные воды. По данным Московского НИИ гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, наиболее часто выше регламентируемых величин в питьевой воде обнаруживается железо (до 80%), цветность (47%), мутность (40%), суммарное органическое загрязнение по величине перманганатной окисляемости (49%), фенолы (32%), марганец (29%), нефтепродукты (8–11%), формальдегид, капролактамы, циклогексанол.

Постоянное применение минеральных удобрений на сельхозугодьях является причиной появления соединений азота и фосфора в водных объектах. Серьезна проблема загрязнения поверхностных вод пестицидами, применяемыми главным образом в сельском хозяйстве. Вынос хлорорганических пестицидов на 80–95% обусловлен весенним стоком. Часто ПДК пестицидов были превышены более чем на 20% в бассейнах рек Печора, Обь, Пясина и Урал. До 19 в. гидрологического цикла было достаточно, чтобы поддерживать запас воды на Земле свежим и безопасным для жизни. Но с приходом индустриальной революции все изменилось. Хотя современная промышленность и технология значительно улучшили качество нашей жизни, мы платим за это серьезную цену. В наших водоемах накапливаются промышленные отходы. Ядовитые отходы приводят к отравлению поверхностных и подземных вод. Природный гидрологический цикл нарушен, и во многих местах он уже не в состоянии очистить воду от загрязняющих частиц.

Естественной самоочищающей способности водоемов, обусловленной деятельностью микроорганизмов, теперь также не хватает, поэтому сточные воды приходится разлагать с помощью микроорганизмов в гигантских очистных сооружениях с тем, чтобы стоки можно было вновь спускать в реки и озера без ущерба для природной среды.

При очистке сточных вод прежде всего из них удаляются макрозагрязнения:

бумага, куски дерева, обрывки ткани. Механическую очистку осуществляют на решетках, в отстойниках, центрифугах, флотаторах и на фильтрах. Тяжелые частицы песка осаждаются в пескоуловителе.

Лишь после этого более легкие взвешенные частицы концентрируются на дне отстойника в илоуловителе. Далее сточные воды поступают в аэротенк (аэрируемый резервуар), где поддерживаются идеальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов. В аэротенке бактерии, дрожжи и грибы образуют с веществами сточных вод большие хлопья («активный ил»), которые не распадаются благодаря слизи, выделяемой бактериями. Основная проблема этого биопроцесса связана со снабжением микроорганизмов кислородом. На расщепление 1 г сахара микроорганизмы расходуют более 1 г кислорода, а растворимость кислорода в воде при нормальной температуре составляет всего лишь 9 мг/дм³. Поэтому очень скоро после начала микробиологического процесса весь содержащийся кислород будет полностью израсходован микроорганизмами. Поэтому сточные воды в аэротенке должны постоянно перемешиваться и обогащаться кислородом.

Для обеспечения аэрации сточных вод аэротенк снабжен вращающимися щетками, лопастями, а также трубой, через которую в воду нагнетается воздух. Воздух постоянно «завихряет» хлопья активного ила, благодаря чему они не достигают слишком больших размеров, остаются взвешенными и хорошо обеспечиваются кислородом. Микроорганизмы хлопьев поглощают вещества сточных вод, разлагают их в процессе дыхания и при этом размножаются.

Часть микробных хлопьев затем осаждается во вторичных отстойниках в виде ила. Меньшую часть возвращают в аэротенк для того, чтобы иметь достаточное количество микроорганизмов для окисления вновь поступающих сточных вод. Весь осадок, собранный из первичного и вторичного отстойников, разлагается в септиках или метантенках (сооружения для сбраживания с помощью микроорганизмов осадка сточных вод) метанбактериями до образования биогаза (метана). Этот газ может быть очень рационально использован путем сжигания для получения тепла. Остаточный «переброженный» ил высушивают и нередко применяют в качестве удобрения.

Резервуары очистных сооружений занимают большую площадь – это условие трудно выполнить в промышленных районах. Поэтому для очистки сточных вод были разработаны «малогабаритные» башенные биореакторы высотой около 15–20 м.

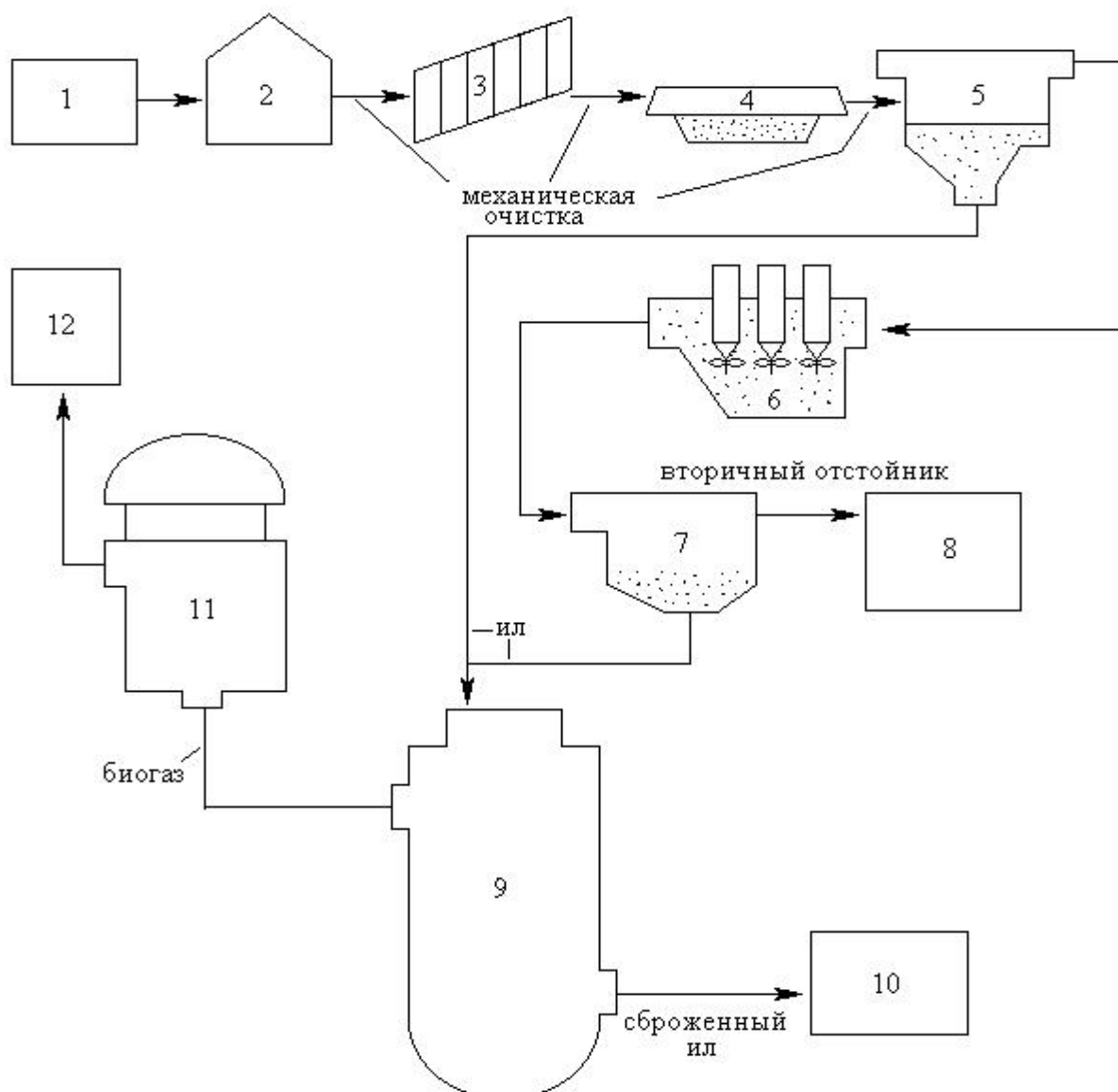
При очистке сточных вод микроорганизмы проделывают особенно трудную работу. Потребляя кислород в процессе дыхания, они с его

помощью разлагают содержащиеся в сточных водах сахара, жиры, белки до углекислого газа и воды и на этой основе растут и строят свои новые клетки. Очистные установки предоставляют микроорганизмам наилучшие условия для развития, размножения и для деструктивной деятельности. Это гигантские «биофабрики», и их «биопродуктом» является чистая вода.

Сточные воды промышленных предприятий нередко содержат трудноразлагаемые вещества и яды, например синильную кислоту и соединения ртути. Эти вещества не разлагаются обычными микроорганизмами, они даже губительно воздействуют на многие виды микроорганизмов.

Рис. Схема сооружения для очистки сточных вод:

- 1 – сточные воды; 2 – насосная станция; 3 – решетка; 4 – отстойник песка;
5 – первичный отстойник; 6 – аэротенк; 7 – бассейн для доочистки;
8 – очищенные сточные воды; 9 – биогазовый реактор; 10 – удобрения;
11 – газометр; 12 – потребитель биогаза



Поэтому постоянно идут поиски новых высокопродуктивных штаммов микроорганизмов, которые могли бы утилизировать такие вещества. Индийский биотехнолог Чакрабартти выделил бактерии, способные расщеплять высокотоксичное средство – трихлорофеноксиксусную кислоту, которое США применяли во время войны во Вьетнаме, чтобы вызвать «листопад» в больших массивах джунглей. Чакрабартти выделил также бактерии, быстро разлагающие ядовитые нефтяные остатки. Они применяются для быстрого разложения нефти в случае катастроф с танкерами. Впоследствии микроорганизмы, размножившиеся в огромных количествах, поедаются морскими животными и благодаря этому быстро исчезают. В Институте биотехнологии в Лейпциге были выделены штаммы бактерий, поглощающие и откладывающие в своих клетках ртуть. Клетки водорослей также обладают способностью накапливать ртуть, свинец и серебро.

Применение микроорганизмов для очистки воздуха от неприятно пахнущих веществ

Неприятно пахнущие вещества (НПВ) – специфический вид загрязнения окружающей среды. Образуются они в большинстве технологических процессов переработки животного сырья.

При производстве сухих животных кормов (кормовой муки, технического жира) образуются различные вещества: аммиак NH_3 , сероводород H_2S , альдегиды, меркаптаны, вызывающие неприятный запах.

Применению установок для очистки вентиляционных выбросов должны предшествовать мероприятия по снижению выхода НПВ в процессе производства технологических продуктов. Сырье, используемое для их выработки, необходимо перерабатывать в наиболее короткие сроки. Биологический метод очистки используют в земляных фильтрах, представляющих собой траншею в природном грунте. На дно ее в слой гравия заложены газоподводящие каналы, засыпанные сверху фильтрующим материалом. Для защиты от атмосферных осадков фильтры имеют легкий навес, под которым смонтирована система орошения для увлажнения фильтрующей массы, в которой содержатся микроорганизмы. Очистка воздуха от НПВ происходит в результате адсорбции, абсорбции и химических реакций окисления под действием микроорганизмов.

Продуктами окисления являются углекислый газ, вода, сульфаты, нитраты, азот. Более эффективны фильтры из компоста, так как они содержат

большее количество микроорганизмов. Компост для фильтров готовят из травы и листы, собирая их в кучи, увлажняя и несколько раз в год перекладывая. Высота слоя фильтра может достигать от 60 см до 1 м. Также используются биохимические фильтры – вещество с определенными группами бактерий, которые размножаются, абсорбируют и разрушают НВП. Срок использования такой массы достигает нескольких лет.

Вопросы

1. Охарактеризуйте влияние развития народного хозяйства на окружающую среду.
2. Охарактеризуйте взаимосвязь биотехнологии и экологии.
3. Охарактеризуйте биотехнологические методы защиты окружающей среды.
4. Охарактеризуйте принцип действия водоочистительной установки на основе микроорганизмов.
5. Что такое активный ил?
6. Охарактеризуйте принцип действия фильтров для очистки воздуха от неприятно пахнущих веществ.

Раздел 4. Современные достижения биотехнологии в сельском хозяйстве.

Практическое занятие № 4 (2ч)

Тема: Препараты на основе живых культур микроорганизмов. Применение в животноводстве.

Цель занятия: Познакомить студентов с препаратами на основе живых культур-симбионтов (Нормофлоры и пробиотики)

Наряду с достижениями цивилизации, в частности, с развитием и активным применением природных и полусинтетических антибиотиков, с использованием ядохимикатов в сельском хозяйстве для повышения его рентабельности и других продуктов химического синтеза, имеет место значительное расширение распространения таких негативных явлений как дисбактериозы. Эта неблагоприятная ситуация в нашей жизни связана с подавлением молочнокислых бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте человека и животных, что в свою очередь создает условия для усиленного размножения условно патогенных и гнилостных микроорганизмов.

Одновременно оказывает влияние на возникновение дисбактериоза изменение характера нашего питания, экологические факторы внешней

среды, различные стрессовые ситуации. Мы знаем, что сожительство двух различных организмов называется симбиозом, в рассматриваемом случае этот симбиоз имеет 4 варианта развития в зависимости от их взаимоотношений - это: -мутуализм (симбиоз взаимовыгодный)-паразитизм (симбиоз не взаимовыгодный, т.е. один живет за счет другого) -нейтрализм (симбиоз без влияния друг на друга) - комменсализм (симбиоз с выгодой для одного без вреда для другого).

Микрофлору можно различать еще и как пристеночную и полостную. Нормальная или резидентская микрофлора желудочно-кишечного тракта представлена следующими видами ее:

- бифидобактерии (наиболее распространены)
- лактобациллы и энтерококки
- грамотрицательные бактерии (рода *Bacteroides*)
- грамположительные бактерии (рода *Clostridium*)
- энтеробактерии (*E.coli*)
- стафилококки
- пентострептококки
- дифтероиды.
- дрожжеподобные грибы (рода *Candida*) в небольших количествах, плесневые грибки)

Чем полезна нормальная микрофлора? Ее необходимость обусловлена тем, что:

1. она обеспечивает синтез витаминов, аминокислот, органических кислот и других биологически активных соединений,
2. она увеличивает неспецифическую резистентность организма хозяина к инфекционным заболеваниям, препятствуя развитию патогенных микроорганизмов (явление колонизационной резистентности).

В резидентской микрофлоре доминируют молочно-кислые бактерии. Они подавляют развитие патогенных и гнилостных микроорганизмов (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Proteus*) за счет колонизации (адгезии) эпителия кишечника. Механизм этого подавления до конца не ясен, однако известно, что противопатогенные свойства молочно-кислых бактерий определяются:

- образованием молочной кислоты и понижением pH
- образованием пероксида водорода (перекиси водорода) (бактерицидное действие)
- образованием антибиотических веществ (ацидофилин, ацидолин, низин и др.)
- образованием биопленки на эпителии кишечника (адгезия)
- антиэнтеротоксической активностью против *E.coli*.

- изменением окислительно-восстановительного потенциала, как неблагоприятной среды для аэробных микроорганизмов.

Кроме того, молочнокислые бактерии способны расщеплять лактозу и метаболизировать холестерин (против атеросклероза). Они же обнаруживают и противоопухолевую активность, обезвреживая канцерогены, когда он тем или иным способом попадают в организм, или какие либо токсические вещества, выделяемые внутри организма. Например, лактобациллы потребляют нитриты продуктов, предотвращая тем самым образование канцерогенных нитрозаминов в организме человека. Они угнетают клостридии, пептострептококки и стафилококки, снижая выработку этими организмами ферментов (азотредуктазы, нитроредуктазы и других), вызывающих образование канцерогенов. Наконец, молочнокислые бактерии и компоненты их клеточных стенок прямо подавляют опухолевые клетки, а также стимулируют иммунные реакции организма. Такие результаты наблюдений, конечно, требуют дальнейших исследований. Поэтому в последние годы получила развитие гнотобиология - как раздел экспериментальной биологии, занимающийся выращиванием стерильных животных (гнотобионтов), а также животных, микрофлора которых представлена одним или несколькими видами микроорганизмов.

Особое значение имеют данные по иммунобиологии, полученные на гнотобиотических животных, то есть микроорганизмы эти несут защитный характер от множества инфекций (усиливают иммунитет). Таким образом, становится актуальной задача внедренных в практику препаратов на основе живых культур симбионтов. Важнейшим компонентом этих препаратов являются молочнокислые бактерии:

- лактобациллы
- энтерококки
- бифидумбактерии.

Получение препаратов требует совершенствования технологии культивирования микроорганизмов.

Технология культивирования.

Выделяются штаммы из здорового организма человека, проводят идентификацию до вида. Проверяют безвредность штамма для клеток кишечника. Отбирают штаммы антагонистически активные. Культивируют на искусственных питательных средах. Штаммы должны выдерживать замораживание и высушивание. Лиофильный штамм поступает в

лабораторию, на производство, где его проверяют на соответствие паспорту. Затем культивируют, высевая на питательную среду (это может быть молоко, агар и другие). Защищают клетки от замораживания с помощью криопротекторов.

Сегодня наиболее широко известны следующие продукты нормофлоры:

- колибактерин
- бифидумбактерин
- лактобактерин
- бификол (смесь коли и бифидумбактерина)
- примадофилус бифилус
- ацилакт
- бифидорм
- энтнрол
- различные модификации витама.

Применение нормофлоры в ветеринарии при

- острых кишечных инфекциях,
- длительных кишечных дисфункциях
- энтероколитах, с дефицитом бифидофлоры
- при дисбактериозе кишечника.

Методы микробиологического и биохимического контроля в производстве препаратов пробиотиков.

1. Приготовление сред для учета молочнокислых бактерий, бифидумбактерий и энтерококков

2. Микроскопическое исследование с применением окрашивания метиленовой синью под микроскопом при иммерсионном увеличении:

-лактобациллы выглядят как хорошо окрашенные крупные палочки, соединенные в цепочки,

-культура энтерококка представлена кокками, расположенными попарно или в виде цепочек, хорошо окрашенных метиленовой синью, -культура бифидобактерий представлена либо в виде ветвящихся клеток, либо в виде булабовидных и веретенообразных форм.

3. Определение концентрации жизнеспособных клеток. На плотных питательных средах учета молочнокислые бактерии, вырастая, образуют следующие типы колоний:

-лактобациллы - в виде комочков ваты, гладкие формы образуются редко - энтерококки образуют круглые поверхностные или лодочковидные колонии в толще агара,

-бифидобактерий образуют гладкие колонии или колони в виде чечевичек в толще агара.

4. Определение активной и титруемой кислотности (потенциометрически).

В конце ферментации pH культуральной жидкости варьирует от 3,9 до 4,5 в зависимости от вида молочнокислых бактерий. Титуемая кислотность определяется путем титрования 10 мл культуральной жидкости, разбавленной 1:1 дистиллированной водой, в присутствии 2-3 капель раствора фенолфталеина 0,1 Н раствором щелочи NaOH. Обычно она составляет в градусах специальной шкалы по Тернеру для суточных культур:

-ацидофильные палочки - 180-200

-бифидобактерий -140

-энтерококки -100

Вопросы

1. Микроэкология человека и животных. Экологические ниши
2. Причины дисбактериозов в современном мире
3. Симбиоз организма и микрофлоры и его классификация
4. Нормальная (резидентская) микрофлора желудочно-кишечного тракта и ее значение для здоровья организмов (противопатогенная функция, влияние на усвоение лактозы, влияние на холестерин, антитоксическое действие, влияние на иммунитет).
5. Гнотобиология. Гнотобионты.
6. Технология культивирования клеток микроорганизмов при получении препаратов нормофлоры. Применение нормофлоры.
7. Методы микробиологического и биохимического контроля в производстве препаратов пробиотиков.

Раздел 5. Биотехнологические методы консолидации и размножения генотипов выдающихся животных.

Практическое занятие № 5 . (2ч)

Тема: Молекулярно-генетические маркеры. MAS-селекция.

Интерактивное занятие. Метод "Игровой имитационный метод: мозговой штурм".

Цель занятия: познакомить студентов с современными биотехнологическими методами в селекции животных.

Применяется свободная форма дискуссии, позволяющая быстро включить в работу всех членов учебной группы. Используется там, где требуется генерация разнообразных идей, их отбор и критическая оценка. Этапы продуцирования идей и их анализа намеренно разделены: во время выдвижения идей запрещается их критика. Внешне одобряются и принимаются все высказанные идеи. Больше ценится количество выдвинутых идей, чем их качество. Идеи могут высказываться без обоснования.

Рассматриваемые вопросы:

1. Молекулярно-генетические маркёры.
2. ДНК-маркёры. Преимущества использования.
3. Роль PCR в выявлении ДНК-маркёров, создании насыщенных генетических карт, маркировании QTL.
4. Молекулярно-генетические маркёры в селекции.
5. Использование маркёров в племенной работе.
6. Маркёры и селекционируемые признаки.
7. Маркёры на основе полиморфизма белков крови.
8. Маркёры на основе белков яиц.
9. Маркёры на основе белков молока.
10. Позиционное клонирование.
11. Функциональное клонирование.
12. Биочипы в идентификации маркёров.
13. Виды биочипов.
14. Классификации биочипов. Области применения.
15. Значение биочипов в генотипировании животных.
16. Геномная селекция в животноводстве (GS Genomic Selection).
17. Мониторинг генома животных.

Основные принципы маркерной селекции – метод сигналей – впервые были сформулированы и детально разработаны А.С. Серебровским и его школой в 20-40-е гг. (Серебровский А.С., 1970). Теоретической предпосылкой для разработки А.С. Серебровским метода сигналей явилась хромосомная теория наследственности. Под термином сигнал (английский синоним маркёр вошёл в научный обиход гораздо позднее) Серебровский понимал аллеломорф менделирующего гена (дискретный признак), сцепленный с группой аллелей, определяющих проявление интересующего признака, как правило, полигенного, и тем самым выступающий в качестве

своеобразной метки, позволяющей проследить наследование данной группы аллелей. В более высоком смысле маркёр – эта любая наследуемая модификация структурных генов (аллели), анонимных нуклеотидных последовательностей или их материальных носителей – хромосом, с которыми сцеплена группа «аллелей интереса».

А.С. Серебровским было показано, что сигнал должен метить группы аллелей, генетическое расстояние между которыми менее 50 морган. Таким образом, минимальное число маркёров должно соответствовать диплоидному числу хромосом. Вопрос о максимальном их числе остаётся дискуссионным. Очевидно только одно: чем больше маркёров локализовано на хромосоме, тем эффективнее их использование.

Если известны конкретные мутации того или иного гена, значительно влияющие на тот или иной признак, аллели этого гена могут быть использованы в качестве маркёров для улучшения данного признака. Однако подобная ситуация достаточно редка, поэтому поиск генов, пригодных для использования в селекции на улучшение интересующего признака, базируются изначально на выборе в качестве кандидатов генов, контролирующих биохимические процессы, связанные с формированием признака. Затем исследуется полиморфизм этих генов и продуктивные особенности животных, несущих в своём генотипе разные аллели этого гена. Следовательно, гены-кандидаты – это гены, кодирующие ключевые белки, принимающие участие в формировании признака. Но у этих генов изначально неизвестно наличие аллельных вариантов и их влияние на величину признака.

Принято различать позиционные и функциональные гены-кандидаты. О позиционных генах-кандидатах говорят в том случае, если данные гены расположены в области, прилегающей к точке локализации локусов количественных признаков (QTL). Функциональные гены-кандидаты – это гены, продукты которых играют ключевую роль в формировании данного признака.

В последнее время в качестве генетических маркёров нашли применение различные сателлитные ДНК. В настоящее время число их у различных видов достигает 100. Интерес к использованию сателлитной ДНК для маркирования хромосом связан с тем, что её выделение и идентификация более просты в сравнении с выделением и идентификацией ДНК структурных генов, при этом для отдельных классов сателлитов, характерны как их хромосомная специфичность, так и специфичность локализации на хромосоме. Для сателлитов характерен высокий полиморфизм. Если маркёры образуют тесную группу сцепления с неизвестным главным геном, возникает

эффект условной плейотропии (Серебровский А.С., 1970), лежащий в основе маркерной селекции (MAS).

QTL - это генетический локус, вариабельность которого на базе различных аллелей ведёт к статистически значимым изменениям фенотипического проявления признака. QTL – в общем случае, не гены в обычном представлении, а группа тесно связанных аллелей разных генов, т.е. своеобразная генетическая система. Идентификация QTL это первый этап MAS. Второй – поиск с использованием статистических моделей таких QTL, действие которых достаточно сильное, чтобы обеспечить дискретность.

Вопросы

1. Преимущества использования маркёров QTL совместно с оценками EVB (Estimated Breeding Value).
2. Использование маркёров QTL в селекционных программах МОЕТ (Multiple Ovulation and Embryo Transfer-суперовуляция и пересадка эмбрионов).
3. Новейшие биотехнологии в консолидации и размножении генотипов редких и выдающихся животных.
4. Комбинирование геномной селекции с новыми репродуктивными (клеточными) технологиями.
5. Биотехнология VELO-генетической (быстрой) схемы MAS - сокращение генерационного интервала с помощью.
6. Биотехнология WHIZZO-генетическая (скоростная) схема.
7. Преимущества GS перед MAS.
8. GS – молекулярная революция в разведении животных.

Практическое занятие № 6. (2ч)

Тема: Трансгенные животные в сельском хозяйстве.

Интерактивное занятие: Метод «Метод Jigsaw».

Цель занятия: познакомить с технологиями создания трансгенных животных.

Алгоритм занятия:

1) Студенты организуются в мини группы для работы над заданием, которое разбито на фрагменты (логические или смысловые блоки). Каждый член группы находит материал по своей части.

Темы для мини групп:

- способы введения клонированных генов
- биологические пределы трансгенной инженерии
- направления трансгеноза
- использование трансгенных животных
- трансгенные сельскохозяйственные животные
- продуктивность трансгенных сельскохозяйственных животных
- этические проблемы трансгеноза

2) затем студенты, изучающие один и тот же вопрос, но состоящие в разных малых группах, встречаются и обмениваются данной информацией как эксперты по данному вопросу. Это называется «встречей экспертов».

3) Далее они возвращаются в свои малые группы и обучают всему новому, что узнали сами от других членов малых групп. Те, в свою очередь докладывают о своей части задания (как зубцы одной пилы). Поскольку единственный путь усвоения материала всех фрагментов состоит в том, чтобы внимательно слушать партнёров по команде и делать записи, никаких дополнительных усилий со стороны преподавателя не требуется. Студенты заинтересованы в том, чтобы их товарища добросовестно выполняли своё задание, так как это отражается на их итоговой оценке теме каждый в отдельности и вся команда в целом.

Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген или гены. Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток, которые перенесут новые свойства потомкам. У растений и животных целесообразно изменять такие свойства, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям, способность адаптироваться к новым внешним условиям. В качестве маркеров в этом случае можно использовать полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (AFLP), анализ мини-сателлитов, анализ микросателлитной ДНК (SSR), гибридизацию и т.д.

Разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений. От работы с довольно крупными яйцами амфибий перешли к изучению яйцеклеток и эмбрионов

мышь, которая представляет наиболее изученное в генетическом отношении млекопитающее.

Микроинъекцию клонированных генов производят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. Чаще выбирают мужской пронуклеус, привнесенный сперматозоидом, так как его размеры больше. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери, или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку.

Можно вводить ген в сперматозоиды и затем проводить ими оплодотворение. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген β -глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Число молекул, вводимое за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000, а их размер - от 5 до 50 кб. Выживает обычно 10 - 30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток варьирует от нескольких до 40%. Таким образом, реальная эффективность составляет около 10%.

Интеграция чужеродных генов неспецифична по отношению к хромосомам, а число копий чужеродного гена может различаться от нескольких штук до 100 и более. Эти гены образуют группу тандемных повторов, объединенных по типу "голова к хвосту". Чужеродная ДНК после инъекции была обнаружена как в соматических, так и в половых клетках. Это означает, что интеграция проходит на самых ранних стадиях развития зиготы.

В нескольких случаях гетерологичная ДНК наследовалась в трех поколениях мышей, что свидетельствует о стабильной интеграции. Интегрировавшая в половые клетки ДНК передается как менделевский ген. Установлено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами и от степени ее метилирования, а также от дифференцировки тканей. В некоторых случаях удалось получить тканеспецифическую экспрессию. Важно отметить что специфические чужеродные гены можно встраивать в геном клетки таким образом, что они подчиняются нормальным регуляторным сигналам.

В 1981 году Константины и Лэси (Оксфорд) провели инъекцию в яйцеклетки мыши фрагменты хромосомной ДНК кролика длиной 19 килобаз. Эти фрагменты содержали ген β -глобина кролика. Яйцеклетки культивировали до стадии бластоцисты и имплантировали в матку. У 24 мышей, родившихся в результате развития имплантированных яйцеклеток, проведены частичная гепатэктомия. Анализ ДНК из клеток печени показал, что у 9 мышей встречается от 1 до 20 копий на клетку гена β -глобина. После

спаривания 4 трансформированных самцов с нормальными самками получили потомство из 18 животных. 6 из них также имели ген β -глобина. Установлено, что интеграция гена в клетки млекопитающих происходит случайным образом и не связана с конкретными областями хромосомы. Ген нестабилен, может быть утрачен или стать неактивным. Вместе с геном необходимо вводить регуляторные последовательности.

Метод введения генов в эмбриональные клетки имеет ограничения. Не всегда удастся встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы. Разработанные методические примы пока не позволяют заменить имеющийся в геноме ген, вытесняя его, не всегда удастся подчинить новый ген системе регуляции организма.

При трансгенозе могут возникать проблемы. Например, одни из первых работ по генетической трансформации животных проводились путем встраивания генов гормона роста. Перенос генов гормона роста крысы мышам увеличивал рост мышей в 2 раза. Эксперименты по трансгенозу генов быка кроликам также были успешны, но аналогичные эксперименты по модификации крупного рогатого скота привели к увеличению прироста всего на 10-20%. Это связано с тем, что у мышей сохраняется широкая норма реакции, и встраивание генов, увеличивающих количество гормона, заставляет генотип реализоваться максимально полно. У домашнего скота в результате направленной селекции организмы работают на верхнем пределе нормы реакции, отсюда ожидаемый эффект не проявился.

Получены свиньи, несущие ген соматотропина. Они не отличались по темпам роста от нормальных животных, но изменение обмена веществ сказалось на содержании жира. У таких животных ингибировались процессы липогенеза и активировался синтез белка. К изменению обмена веществ приводило и встраивание генов инсулиноподобного фактора. Эти свиньи были созданы для изучения цепочки биохимических превращений гормона, а побочным эффектом явилось укрепление иммунной системы.

Самая мощная белоксинтезирующая система находится в клетках молочной железы. Если поставить гены чужих белков под контроль казеинового промотора, то экспрессия этих генов будет мощной и стабильной, а белок будет накапливаться в молоке (животное-ферментер). Уже получены трансгенные коровы, в молоке которых содержится человеческий белок лактоферрин. Этот белок планируют применять для профилактики гастроэнтерологических заболеваний у людей с низкой иммунорезистентностью. Это больные СПИДом, недоношенные младенцы, больные раком, прошедшие радиотерапию. Ведутся клинические испытания такого молока. Уже сейчас корпорация Genzyme Transgenics планирует

исследования с целью создания трансгенного крупного рогатого скота, содержащего в молоке человеческий альбумин. Был куплен патент на получение эмбрионов, содержащих геном клеток соединительной ткани (фибробластов), включающий ген, ответственный за синтез человеческого белка. Подобная технология позволяет увеличить эффективность создания трансгенных молочных животных, так как при обычном впрыскивании генов в оплодотворенную яйцеклетку рождается от только 5-10% трансформированных животных, из них - несколько самцов, не дающих молока.

Использование новой технологии клонирования позволяет получать животных только женского пола, дающих трансгенный протеин. Альбумин используется в терапии для поддержания осмотического давления в крови. Ежегодно в мире требуется около 440 тысяч литров плазмы крови для выделения этого белка (стоимость около 1,5 млрд. \$). Каждая молочная корова может произвести 80 кг рекомбинантного человеческого альбумина ежегодно. Genzyme Transgenics занимается разработкой аналогичных методов получения человеческого гормона роста и β -интерферона.

В Англии созданы трансгенные овцы, молоко которых содержит фактор свертывания крови.

Были попытки создать овец, продуцирующих химозин (фермент для сыроварения). Было получено 2 овцы, у одной – ген не экспрессировался, у второй содержание химозина достигало 300 мг/л. Однако потомство этой овцы давало низкие удои – порядка 50 кг за период лактации. Причина заключалась в том, что химозин вырабатывается в виде предшественника – прохимозина, который превращается в активный фермент при $pH=5$. Было запланировано получать именно прохимозин, но в каких-то участках вымени происходило снижение pH , что приводило к активации химозина непосредственно в организме. Активный химозин свертывал молоко, а оно закупоривало протоки вымени. Сейчас пытаются решить эту проблему.

Получены кролики, выделяющие γ -интерферон, эритропоэтин, но кролики не являются традиционными продуцентами молока. Эксперименты же по трансформации сельскохозяйственных животных очень дорогостоящи – одно трансгенное животное стоит десятки и сотни тысяч долларов.

Трансгенных животных получают и для целей ксенотрансплантации. Одним из излюбленных доноров органов являются свиньи, так как имеется анатомическое сходство органов и сходство иммунологических свойств. Реакции отторжения при трансплантации имеют сложный механизм. Одним из сигналов для атаки организма на чужой орган являются белки,

локализованные на внешней поверхности мембраны. У трансгенных свиней эти белки заменены на человеческие.

Еще одно направление трансгеноза – получение устойчивых к болезням животных. Животноводство держится на вакцинах, так как селекция ведется преимущественно на хозяйственно ценные признаки – шерстистость, молочность и т. д. Повышение устойчивости – дело генных инженеров. К защитным белкам относятся интерфероны, поэтому ген интерферона встраивали различным животным. Трансгенные мыши получили устойчивость, они не болели или болели мало, а вот у свиней такого эффекта не обнаружено.

Другое направление – введение генов, кодирующих антисмысловую РНК. Для животноводства острой проблемой являются лейкозы, вызываемые РНК-вирусами. Трансгенные кролики, несущие гены, отвечающие за присутствие в клетке антисмысловой РНК, были устойчивы к лейкозам.

Трансгенных животных можно использовать для изучения наследственных заболеваний мозга и нервной системы. Гены болезни Альцгеймера (отложение белка β -амилоида приводит к образованию характерных бляшек) и гены, отвечающие за развитие эпилепсии, болезней мозга вводятся в геном нормальных животных; при этом получают трансгенных животных-моделей, на которых можно испытывать различные терапевтические приемы.

Трансгенных животных стали использовать для исследования воспалительных и иммунологических заболеваний человека, например, ревматоидного артрита. Моделируются болезни, связанные с липидным обменом.

Вопросы

1. Трансгены и трансгенные организмы.
2. Трансгенные животные в сельском хозяйстве.
3. Сельскохозяйственные трансгенные организмы.
4. Эмбриональные стволовые клетки.
5. Перспективы генной инженерии.
6. Риски, генных технологий.
7. Уменьшение риска, связанного с генными технологиями.
8. Виды и методы селекции животных.
9. Биотехнология, генетическая и клеточная инженерия.
10. Пересадка эмбрионов.
11. Получение генетических мозаиков (химер).
12. Клонирование животных.

Раздел 6. Пищевая биотехнология.

Практическое занятие № 7. (2ч)

Тема: Продукция микробиологического синтеза для пищевой промышленности

Цель занятия: дать представление студентам-магистрам о биотехнологическом производстве пищевых ингредиентов.

Современная пищевая биотехнология представляет собой индустрию пищевых ингредиентов – вспомогательных технологических добавок, вводимых в пищевые продукты в процессе их изготовления для повышения их полезных свойств.

Подавляющее большинство пищевых ингредиентов в настоящее время импортируется, в связи с чем организация их производства в России является актуальной, социально востребованной задачей.

- *«Пищевой белок»*

Человек традиционно получает белки, жиры и углеводы (основные компоненты пищи) из животных и растительных источников. Уже сегодня эти источники не покрывают все увеличивающиеся потребности человечества.

Современные методы биотехнологий в сочетании с применением ультра- и нанофильтрационных систем делают экономически обоснованным извлечение пищевого белка из широкого класса сырьевых продуктов и отходов пищевой промышленности. Таким образом, комплекс мероприятий направлен на распространение технологий, превращающих малоценные отходы в белковые продукты и компоненты с высокой добавленной стоимостью.

- *«Ферментные препараты»*

Ферменты, применяемые в пищевых производствах, являются продуктами с высокой добавленной стоимостью, в России практически не производятся. Развитие данного направления позволит создать компактный по масштабам, но высокоэффективный сектор, являющийся с одной стороны базой развития всех направлений пищевой отрасли, направленных на глубокую переработку сырья, с другой стороны, производство пищевых ферментов обладает высоким экспортным потенциалом.

- *«Пребиотики, пробиотики, синбиотики»*

Развитие производства и пищевого инжиниринга продуктов данной группы является необходимым элементом для формирования в России рынка здорового питания. Задачей данного комплекса мероприятий является создание пробиотических продуктов, расширение исследований и практики внедрения в ассортимент предприятий новых продуктов и комплексных решений.

- *«Функциональные пищевые продукты, включая лечебные, профилактические и детские»*

К функционально пищевым продуктам относят пищевые продукты систематического употребления, сохраняющие и улучшающие здоровье и снижающие риск развития заболеваний благодаря наличию в их составе функциональных ингредиентов. Они не являются лекарственными средствами, но препятствуют возникновению отдельных болезней, способствуют росту и развитию детей, тормозят старение организма. В соответствии с мировой практикой продукт считается функциональным, если регламентируемое содержание микронутриентов в нем достаточно для удовлетворения (при обычном уровне потребления) 25—50% от среднесуточной потребности в этих компонентах. Развитие направления является важной социальной задачей, снижающей нагрузку на сектор медицины и социально-экономический ущерб от болезней.

- *«Пищевые ингредиенты, включая витамины и функциональные смеси»*

Пищевые ингредиенты используются для повышения питательной ценности, удлинения срока хранения, изменения консистенции и усиления вкуса и аромата продуктов. Используемые производителями пищевые ингредиенты, как правило, имеют растительное или бактериальное происхождение. Многие аминокислотные добавки, усилители вкуса и витамины, добавляемые в пищевые продукты, производятся с помощью бактериальной ферментации. В результате реализации комплекса мероприятий биотехнология должна обеспечить производителям пищевых продуктов возможность синтеза большого количества пищевых добавок, которые в настоящее время слишком дороги либо малодоступны из-за ограниченности природных источников этих соединений.

- *«Глубокая переработка пищевого сырья»*

Биотехнология предоставляет множество возможностей усовершенствования методов переработки сырья в конечные продукты: натуральные ароматизаторы и красители; новые технологические добавки, в том числе ферменты и эмульгаторы; заквасочные культуры; новые средства для утилизации отходов; экологически чистые производственные процессы;

новые средства для обеспечения сохранения безопасности продуктов в процессе изготовления.

Современные технологии глубокой переработки пищевого сырья строятся на принципах безотходного производства: продукты переработки либо возвращаются в производственный цикл, либо используются в других отраслях (прежде всего в производстве парфюмерно-косметических средств, фармацевтике, сельскохозяйственном производстве). Внедрение таких технологических схем в значительной степени обусловлено достижениями современной биотехнологии, сделавшей доступным и экономически обоснованным извлечение из пищевого сырья широкой гаммы новых продуктов. В рамках комплекса мероприятий будут созданы условия для распространения технологий глубокой переработки пищевого сырья и радикального снижения отходов пищевой промышленности. В результате реализации Программы в России будет развернуто производство широкой гаммы пищевых ингредиентов, включая витамины и функциональные смеси, достигнуты высокие показатели переработки продовольственного сырья, обеспечено импортозамещение по большинству импортируемых в настоящее время ингредиентов для производства пищевых продуктов.

Вопросы

1. Ферментно-микробиологические процессы, их значение при переработке растительного и животного сырья. Ферментативный катализ - приоритетное направление пищевой технологии (вино, пиво, спирт, хлеб и др. продукты питания).
2. Основные стадии типового биотехнологического процесса, обеспечивающего получение готового продукта (подготовка питательных сред, культивирование, концентрирование, выделение, очистка, сушка, готовые формы).
3. Особенности и преимущества использования микроорганизмов в биотехнологических процессах.
4. Типовая технологическая схема производства биопрепаратов (на примере производства ферментных препаратов при глубинном и поверхностном выращивании микроорганизмов).
5. Физико-химические факторы, влияющие на состояние биосистем (перемешивание, ионная сила, рН среды, состав питательной среды, макро- и микроэлементы, температура и др.)
6. Асептические условия в биотехнологии. Асептические средства, герметизация, стерилизация. Способы стерилизации питательных сред и

оборудования в технологии микробного синтеза.

7. Физико-химические и биологические методы выделения и очистки внеклеточных и внутриклеточных продуктов биосинтеза.
8. Процессы сушки и получения готовых форм биопрепаратов. Сублимационная и распылительная сушка биопрепаратов. Преимущества и недостатки.
9. Методы получения и особенности использования иммобилизованных ферментов и клеток в биотехнологических производствах.
10. Ферментативный биокатализ. Химическая природа и строение ферментов. Активный центр ферментов. Механизм действия и кинетика ферментативного катализа. Активаторы и ингибиторы. Влияние физико-химических факторов на активность ферментов. Номенклатура и классификация ферментных препаратов.
11. Ферменты - биокатализаторы химических превращений пищевого сырья. Роль ферментативного катализа в совершенствовании технологических процессов производства. Ферменты, используемые в пищевой промышленности, их продуценты, механизм действия, названия промышленных ферментных препаратов, их индекс.
12. Ферментативное получение нуклеозидов и нуклеотидов.
13. Пребиотики и пробиотики - объекты биотехнологии, их использование в пищевых продуктах.
14. Пищевое сырье - как многокомпонентная, полифункциональная, биологически активная система.
15. Основные виды пищевого сырья, его состав, биотехнологический и биогенный потенциал.
26. Белковые вещества. Основные компоненты пищи и натуральные композиции на их основе как факторы совершенствования технологий повышения пищевой и биологической ценности продукта питания.

Лабораторная работа № 4 "Количественное определение присутствия ГМО в продуктах питания методом ПЦР" (2 ч)

Цель занятия: знакомство с постановкой определения генетически модифицированных организмов (ГМО), процедурами выделения ДНК из пищевых продуктов, проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза.

Задача: определить присутствие генетически модифицированного растительного сырья в образцах пищевых продуктов.

Достижения современной биотехнологии позволили вывести новые сорта сельскохозяйственных культур с полезными свойствами: устойчивостью к вредителям и грибковым заражениям, повышенной пищевой ценностью, повышенной урожайностью, засухоустойчивостью и пр. с помощью генетических манипуляций, т. е. введением в геном растения генов, обеспечивающих соответствующий признак или модификацией существующий признак или модификацией существующих.

В обществе существуют как сторонники, так и противники генномодифицированных культур. Первые указывают на полезные свойства, которые позволяют интенсифицировать сельское хозяйство, избежать использования гербицидов, получать более высокие урожаи и т. п. Вторые опасаются проявлений аллергических реакций на такие продукты, снижения природного биоразнообразия, утечки трансгенов в дикую природу и других неопределенных отдаленных во времени последствий.

В настоящее время не обнаружено однозначных доказательств, что генетически модифицированные продукты способны принести вред человеку. Хотя выгода от применения ГМ-растений очевидна, существует много противников трансгенных растений, убежденных в их опасности и использующих в своих аргументах невозможность ученых дать полную гарантию безопасности подобных продуктов.

В каждой стране мира вопрос об использовании трансгенных растений решается по-разному местными законодателями. Примерно в 30 странах мира действует правило, согласно которому упаковка продуктов, при изготовлении которых использовались достижения генной инженерии, должна содержать информацию об этом, чтобы потребители самостоятельно делали свой выбор. Однако во многих случаях, например, когда соя используется при производстве мясных полуфабрикатов, производители не сообщают об этом покупателям. С 1 июня 2004 г. в Российской Федерации установлен новый допустимый порог наличия таких примесей – 0,9%, который требуется количественно точно детектировать и указывать на упаковке.

Примерно в 30 странах мира действует правило, согласно которому упаковка продуктов, при изготовлении которых использовались достижения генной инженерии, должна содержать информацию об этом, чтобы потребители самостоятельно делали свой выбор. Однако во многих случаях,

например, когда соя используется при производстве мясных полуфабрикатов, производители не сообщают об этом покупателям.

Генетически модифицированные продукты абсолютно ничем не отличаются по внешнему виду от своих природных аналогов. Установить генетическую модификацию проще всего методами генетического анализа, а именно методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Если просто наличие ГМ-примесей (принцип да-нет) можно установить обычной ПЦР, то для количественной оценки примесей требуется более сложный метод ПЦР в реальном времени (real time PCR). Последний получает все более широкое распространение, поскольку законодательство требует количественной маркировки присутствия ГМ-примесей в пищевых продуктах.

ПЦР-анализ основан на поиске последовательностей, общих для большинства генномодифицированных организмов. При этом используют специфические праймеры, которые комплементарны характерным участкам в геноме ГМО. Дело в том, что генетики используют практически одни и те же регуляторные участки (промотор и терминатор транскрипции) для контроля экспрессии вставленного гена.

Сущность метода выявления ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье растительного происхождения основана на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов амплификации после завершения реакции.

Для получения ГМ-растений используют, как правило, **35S промотор** вируса мозаики цветной капусты (CaMV), который присутствует во всех известных и выращиваемых в промышленных масштабах ГМО и ДНК **NOS терминатора** T1 плазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, который также присутствует во многих промышленно выращиваемых ГМ-растениях. В данной работе используются праймеры, комплементарные именно этим последовательностям. Размеры ДНК, которые при этом синтезируются, – 200 тыс. п.о. Чтобы проконтролировать, что экстрагированная из тестового образца ДНК содержит гены растительных белков, в работе предусмотрена контрольная ПЦР с «растительным» праймером к гену хлоропласта PSII. Размер синтезируемого при этом фрагмента – 455 тыс. п.о.

Правила работы с тест-системами и оборудованием

1. Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

2. Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.
3. При работе с наборами следует использовать только новые наконечники и пробирки.
4. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
6. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
7. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
8. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ.
9. Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

Оборудование и материалы и реактивы

1. Центрифуга со скоростью вращения ротора 14000 об/мин "Eppendorf" с ротором для микропробирок 1,5 - 2,0 мл;
2. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
3. Микроцентрифуга-вортекс фирмы "DioSan";
4. Система видеодокументирования гелей;
5. Оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза;
6. Источник постоянного тока;
7. Камера с заливочным столиком;
8. Мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки;
9. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
10. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
11. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
12. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических

пипеток объемом 1-20 мкл;

13. Штативы для микропробирок на 0.2 мл

14. Штативы для микропробирок на 0.6 мл

15. Штативы для микропробирок на 1.5 мл

16. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;

17. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;

18. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;

19. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;

20. Ножницы медицинские;

21. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;

22. Ступки фарфоровые с пестиком.

23. Буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза: TBE-буфер, агароза.

24. Амплификатор "Био-Н".

25. Набор реактивов InstaGene [Matrix TM - Bio-Rad](#);

26. Краситель Orange G.

Хранение и подготовка образцов пищевых продуктов для анализа

Отбор проб проводят в соответствии с методическими документами, устанавливающими порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-2000, 10852-86, 13979.0-86, 26313-84, 26312.1-84, 9792-73, 7631-85.

Отбор образцов продуктов

1. От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:

-от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5-10 г.) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50-100 г);

-из общей пробы отбирают среднюю пробу массой 10-20 г, помещают в полиэтиленовый пакет, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, опечатывают и отправляют на анализ.

2. От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу массой 10-50 г. в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, который, в свою

очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

3. Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

Подготовка образцов продуктов к анализу

1. Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и пестики, предварительно обработанные хромовой смесью и фламбированные инструменты - пинцеты, скальпели, ножницы.

2. Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 5-10 г и растирают пестиком до однородного состояния. Для анализа необходимо 50 – 150 мкг образца.

3. Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 5-10 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до однородного состояния. Для анализа необходимо 50 – 150 мкг образца.

4. Пробы продуктов консистенции крахмала массой 100-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 мл физиологического раствора. Для анализа необходимо 50 – 150 мкл образца.

5. Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими пипетками с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50 - 150 мкл образца.

Хранение и транспортирование проб

1. Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания.

2. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре минус 20оС) в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа).

3. Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта.

Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

Ход работы

1. Подписать две 1,5 мл микропробирки «non-ГМО» и «тест».
2. Отобрать 0,5–2,0 г «non-ГМО» образца, перенести в ступку, добавить по 5 мл дистиллированной воды на каждый грамм образца.
3. Растереть образец пестиком в течение 2 мин до получения однородной массы.
4. Добавить еще 5 объемов воды и снова растереть массу пестиком.
5. В пробирку «non-ГМО» внести 500 мкл InstaGene™ matrix и 50 мкл полученной после растирания массы, закрыть пробирку.
6. Повторить п. 2–4 для приготовления тестового образца.
7. В пробирку «тест» внести 500 мкл InstaGene™ matrix и 50 мкл полученной после растирания тестового образца массы, закрыть пробирку.
8. Тщательно перемешать пробирки на шейкере и поместить в водяную баню на 95 °С на 5 мин.
9. Поместить пробирки в центрифугу и центрифугировать в течение 5 мин на максимальной скорости. Супернатант содержит ДНК-экстракт.
10. Пронумеровать пробирки для ПЦР 1–6. Содержимое каждой пробирки указано в табл. 2.1.

Таблица 2.1

№	Смесь реагентов для ПЦР Master mix	ДНК
1	20 мкл растительной Мм (зеленая)	20 мкл, «non-ГМО» образец
2	20 мкл ГМО Мм (красная) 20 мкл	«non-ГМО» образец
3	20 мкл растительной Мм (зеленая)	20 мкл, «тест» образец
4	20 мкл ГМО Мм (красная) 20 мкл	«тест» образец
5	20 мкл растительной Мм (зеленая)	20 мкл, «+ГМО» образец
6	20 мкл ГМО Мм (красная) 20 мкл	20 мкл, «+ГМО» образец

11. Поместить все пробирки на лед.
12. В каждую пробирку поместить по 20 мкл соответствующей смеси Master mix, каждый раз используя свежий наконечник.
13. Соответственно надписи внести в пробирки образцы ДНК из п. 9 (Осторожно! Нас интересует только супернатант!) и перемешать тщательно пипетированием.
14. Включить термоциклер по заданной программе (табл. 2.2), после нагрева термоблока до температуры денатурации поставить прибор на паузу и быстро поместить в него пробирки.

Таблица 2.2

Шаг	Функция	Температура	Длительность	Число циклов
Начальная денатурация	Денатурация	94 °С	2 мин	1
Амплификация	Денатурация	94 °С	1 мин	40
	Отжиг	59 °С	1 мин	
	Синтез	72 °С	2 мин	
Завершающий синтез	Синтез (элонгация цепи)	72 °С	10 мин	
Хранение	Хранение	4 °С	неопределенное	1

Анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза

Ход работы:

1. Приготовить 1 % гель агарозы и аппарат для гель-электрофореза согласно протоколу из лабораторной работы № 2.
2. Гель приготовить без бромистого этидия.
2. Пробирки после ПЦР отцентрифугировать (пульс-режим).
3. В каждую пробирку внести по 10 мкл раствора красителя Orange G, тщательно перемешать на вортексе.
4. В лунки геля поместить по 20 мкл образцов в следующем порядке (табл. 2.3):

Таблица 2.3

Номер лунки	Образец
1	«non-ГМО» образец, растительный праймер
2	«non-ГМО» образец, ГМО праймер
3	«тест» образец, растительный праймер
4	«тест» образец, ГМО праймер
5	«+ГМО» образец, растительный праймер
6	«+ГМО» образец ГМО праймер

7	набор стандартов мол. массы 100 bp
---	------------------------------------

5. Провести электрофорез на агарозном геле в течение 30 мин при напряжении 100 В.

6. Зафиксировать результат на системе видеодокументации и проанализировать полученные результаты. Заполнить табл. 2.4.

Таблица 2.4

Номер полосы	Нанесённый образец	Наличие полос	Размер фрагментов
1	«non-ГМО» образец, растительный праймер		
2	«non-ГМО» образец, ГМО праймер		
3	«тест» образец, растительный праймер		
4	«тест» образец, ГМО праймер		
5	«+ГМО» образец, растительный праймер		
6	«+ГМО» образец ГМО праймер		
7	набор стандартов мол. массы 100 bp		

Вопросы

1. Какие из молекул, содержащихся в клетке, могут повлиять на выделение ДНК?
2. На каких принципах основан метод ПЦР?
3. Зачем нужны праймеры и как выбрать их последовательность?
4. Что такое ГМО? Как вы относитесь к проблеме их распространения?
5. Возможно ли создание единой методики ПЦР с одинаковыми праймерами для определения всех видов ГМО?
5. Какие экспериментальные условия надо соблюдать при постановке ПЦР? С чем это связано?
6. Что такое Таг-полимераза? Что должно находиться в реакционной смеси для ее эффективной работы?
7. Как происходит разделение ДНК-фрагментов во время электрофореза?

Раздел 7. Медицинская биотехнология.

Практическое занятие № 8

Тема: Получение видоспецифических для человека препаратов.

Производство генно-инженерного инсулина.

Интерактивное занятие. Метод «Ролевая игра».

Цель занятия: дать понятие студентам о применении генно-инженерных методов при производстве видоспецифичных пропаратов на примере инсулина.

Алгоритм занятия:

1) Распределение ролей производится заранее, не менее чем за неделю до игры.

2) каждый участник собирает информацию об одном виде инсулина: животный, биосинтетический, генно-инженерный, модифицированный генно-инженерный, синтетический.

3) Разыгрывается ситуация, где преподаватель выступает в роли инвестора, который оценивает возможность инвестирования денег в производства какого-либо вида инсулинлина. Студенты-участники игры представляет свои проекты, посвящённые определённому виду инсулина.

Инсулин - гормон белковой природы, вырабатываемый Р-клетками поджелудочной железы для поддержания гомеостаза глюкозы в крови. Недостаток инсулина в крови вследствие приобретенных или наследуемых факторов приводит к заболеванию сахарным диабетом (СД) Это системное заболевание, следствием которого является высокое содержание глюкозы в крови, вызывает поражение многих внутренних органов и систем организма, что неизбежно ведет к ухудшению качества жизни, а без лечения - к смерти. СД называют «болезнью цивилизации», т.к. первые его описания относятся к античным временам.

По данным Всемирной организации здравоохранения сахарный диабет охарактеризован, как неинфекционная эпидемия и занимает третье место после сердечно - сосудистых и онкологических заболеваний. При этом, необходимо отметить, что страшна не сама болезнь, а ее осложнения. У больных сахарным диабетом развивается слепота, почечная недостаточность, нарушения со стороны органов кровообращения и нервной системы, В Российской Федерации, как во всем мире, постоянно увеличивается количество больных сахарным диабетом, которые нуждаются в регулярном

потреблении инсулина. Инсулин относится к жизненно важным лекарственным средствам, которые Всемирная организация Здравоохранения рекомендует самостоятельно производить тем странам, чье население превышает 50 млн. человек.

В мире существуют следующие виды инсулинов:

- животного происхождения (свиной, крупного рогатого скота);
- биосинтетический (модифицированный свиной);
- генно - инженерный;
- модифицированный генно - инженерный;
- синтетический;

Впервые инсулин был выделен в чистом виде и применен для лечения в 1921 г., а уже в 1923 г. начато его массовое производство. В то время единственным доступным для промышленного использования источником инсулина являлись поджелудочные железы крупного рогатого скота и свиней, поступающие с боен. Этому способствовало отсутствие видовой специфичности в проявлении функций у инсулинов различного происхождения. Однако, по мере накопления данных о последствиях инсулинотерапии выяснилось, что у большого количества пациентов по мере применения животного инсулина развивается ряд серьезных осложнений: падает чувствительность к вводимому инсулину, что приводит к постоянной корректировке вводимой дозы; проявляются различные аллергические реакции, накапливаются антитела к инсулину и т.д. Данные проблемы связывали с развитием иммунной реакции, которая вызвана структурными отличиями инсулина человека от животных инсулинов. Только в конце 50-х, начале 60-х годов XX века развитие молекулярной биологии позволило определить структуру инсулинов различного происхождения. Результаты данных исследований легли в основу разработок промышленного получения инсулина, идентичного человеческому, основными способами получения которого, в настоящее время, являются полусинтетический и биотехнологический. При использовании полусинтетического метода свиной инсулин подвергается химической модификации.

С 1923 года до 80-х годов инсулин производился исключительно из животного сырья, а именно из поджелудочной железы свиней и крупного рогатого скота, и только в 1982 году впервые была создана возможность производства генно-инженерного инсулина человека методом генетического изменения микроорганизмов. Биотехнологическим путем инсулин производят используя высокопродуктивные генетически измененные микроорганизмы. Полусинтетический метод полностью зависит от сырья, поступающего с боен. Биотехнологический метод лишен этого недостатка,

так как потребляет только энергоресурсы. Также важным достоинством биотехнологического метода является простота масштабирования процесса. Поэтому, получение инсулина при помощи высокопродуктивных штаммов рекомбинантных микроорганизмов, обеспечивающих стабильный уровень экспрессии встроенного гена инсулина человека, становится актуальным. Однако в микроорганизмах инсулин синтезируется в виде неактивного биотехнологического предшественника, гибридного белка (ГБ), (инсулина, имеющего чистоту 90-96% и являющегося сырьем для стадий финишной очистки инсулина методами высокоэффективной жидкостной, гидрофобной, гель-эксклюзивной хроматографий и др.). Поэтому получение генно-инженерного инсулина человека (ГИИЧ) является сложным многостадийным процессом, основанным на нескольких этапах трансформации и препаративной очистке промежуточных продуктов и инсулина. Это отражается на выходе и стоимости генно-инженерного инсулина. В связи с этим значительно возрастает значение разработки оптимальной технологической схемы, обеспечивающей высокий выход, и чистоту конечного продукта.

В настоящее время доля генно-инженерного инсулина во всем мире неуклонно возрастает и в 2006 г. составила более 90%.

Международный опыт и практика клинической диабетологии свидетельствуют, что лучшими современными средствами являются препараты на основе рекомбинантного инсулина, получаемого генно-инженерными методами, который вытесняет из медицинской практики и с фармацевтического рынка инсулин, получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиньи. На это есть ряд серьезных причин:

во-первых, производство животного инсулина связано с очевидными экономическими и технологическими трудностями, обусловленными дороговизной, сложностями при выделении, хранении и транспортировке сырья (поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней), а также его дефицитом;

во-вторых, технически довольно трудно и дорого выделить чистый (монокомпонентный) инсулин, не содержащий примесей проинсулина. Кроме того, возможны тяжелые аллергические реакции, что исключает применение животного инсулина при лечении некоторых категорий больных и, особенно, детей.

В связи с этими причинами наблюдается вытеснение животных инсулинов с рынка ГИИЧ доля которого к 2007 г. по прогнозам достигнет 95%.

В Российской Федерации, как и во всем мире, постоянно увеличивается количество больных сахарным диабетом и в настоящее время достигает 2

млн. человек, из которых более 750.000 нуждаются в ежедневном приеме инсулина.

ОАО «Национальные биотехнологии» является единственным предприятием в России, которое выпускает высококачественный инсулин по собственной технологии полного цикла от субстанции до готовых лекарственных форм. Проектирование данного производства было начато в 1996г. на основе совместных разработок коллективов ГНЦ ПМ (п. Оболенск) и ИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. В 2003г. в п. Оболенск была запущена производственная линия, основанная на получении ГИИЧ из гибридного белка, продуцентом которого являлся штамм *E.coli* JM109/pPINS07. В 2004г. она вышла на заданную производительность генно-инженерного инсулина человека мощностью 30 кг субстанции и 1 млн. флаконов готовых лекарственных форм короткого и среднего действия (Ринсулин Р 100 МЕ/мл по 10 мл во флаконе и Ринсулин НПХ 100 МЕ/мл по 10 мл во флаконе) в год, что составляет около 8% потребности России.

Вопросы

1. Физиологическая функция инсулина в организме.
2. Биосинтез инсулина у человека и животных в норме.
3. Патогене сахарного диабете.
4. Даибет 1 и 2 типа.
5. С каким типом сахарного диабета связана метаболическая пандемия?

Практическое занятие № 9 (2ч)

Тема: ДНК-вакцины: свойства и методы получения. Перспективы.
Интерактивный метод «круглого стола».

Цель занятия: познакомиться с новыми методами производства современных вакцин на примере ДНК-вакцины

Алгоритм занятия:

- 1) Краткое вводное слово преподавателя.
- 2) Заслушивание кратких вводных сообщений участников «круглого стола» по современным вакцинам.
- 3) Постановка перед участниками «круглого стола» вопросов, по вакцинации.
- 4) Развертывание дискуссии.
- 5) Выработка согласованных позиций по производству и применению ДНК-вакцин.

Традиционные вакцины, избавившие человека от десятков инфекционных заболеваний, во многих случаях остаются неэффективными либо слишком небезопасными. Возможность преодолеть присущие им ограничения появилась с развитием генной инженерии. В качестве альтернативы обычным методам иммунизации разрабатываются ДНК-вакцины. Массовая вакцинация привела к исчезновению оспы, почти уничтожила полиомиелит и невероятным образом снизила число случаев заболевания тифом, корью, гепатитом А и В, столбняком, дифтерией... Тем не менее возможности традиционных вакцин далеко не безграничны. Не возымели успеха попытки иммунизации против таких давно и хорошо известных болезней, как туберкулез и малярия. Двадцать пять лет назад список пополнился СПИДом. Кроме того, все более опасными становятся инфекции, с которыми, казалось бы, уже научились бороться, создав эффективные методы предупреждения и лечения. Появление устойчивых штаммов возбудителей, активно мутирующих и адаптирующихся к действию даже самых новых лекарственных препаратов, вынуждает постоянно обновлять медицинскую практику.

Впервые предположение, что гены могут быть использованы для вакцинации, появилось в 50-60-е гг. Фрагменты «чужой» ДНК, имплантированные в клетки животных, способны в некотором количестве синтезировать собственные белки. Сами клетки, получившие гены другого организма, в ответ начинают вырабатывать антитела. Позднее результаты подтвердились при создании новых методов лечения наследственных болезней. Первые попытки генной терапии были не слишком удачными. Имплантируемые «терапевтические» гены провоцируют иммунную реакцию и потому долго не живут. Такое наблюдение несколько разочаровало. Однако иммунный ответ на появление чужеродных генов стали рассматривать как принцип действия вакцин нового типа.

С начала 90-х гг. вводя вакцины лабораторным грызунам и приматам, ученые зафиксировали возникновение иммунной реакции, противодействующей различным патогенам. Гены ВИЧ вносили в клетки пациентов, уже зараженных вирусом. Аналогичные операции проделали со здоровыми людьми. Помимо генов вируса иммунодефицита им пересаживали гены гриппа, герпеса и гепатита В. Было доказано, что вакцины имеют эффект при терапии рака. Хотя злокачественные опухоли не являются инфекционными заболеваниями, с ними можно бороться повышением активности иммунной системы. Результаты были

обнадеживающими: вакцины стабильно провоцировали иммунный ответ. Серьезных побочных эффектов не было.

Созданию ДНК-вакцин ведётся преимущественно с бактериальными плазмидами. Плазмиды хороши в том, что сами по себе не провоцируют инфекцию. Их используют только в качестве вектора. Чтобы вызвать необходимую иммунную реакцию, выделенные из бактерий плазмиды модифицируют, вшивая гены, кодирующие определенные белки-антигены, вырабатываемых конкретной бактерией или вирусом. Также встраиваются гены, необходимые для обеспечения экспрессии всей конструкции. В то же время фрагменты ДНК, ответственные за воспроизводство и размножение инфекции, в плазмиды не переносятся. Вводится вакцина обычно либо путем инъекции, либо с помощью так называемой «генной пушки». Этот аппарат, выпуская струю сжатого гелия, пробивает клеточные мембраны микроскопическими металлическими частицами, покрытыми ДНК. Попав тем или иным способом внутрь клеток, плазмиды провоцируют синтез белков-антигенов. Их появление вакцинируемый организм воспринимает как полноценное инфицирование и реагирует обычным образом, в итоге вырабатывая иммунитет против соответствующей бактерии или вируса.

Сегодня Aventis, Merck, Pfizer и другие фармацевтические и биотехнологические гиганты рассматривают создание новых методов иммунизации как одно из приоритетных направлений работы. ДНК-вакцины выглядят предпочтительнее традиционных средств.

Стойкость иммунитета, который вырабатывается в ответ на введение ДНК-вакцин, определяется принципиально важным обстоятельством. Поскольку антигены синтезируются внутри самого организма, а не поступают с него извне, вызывается комплексная реакция. Активизируются все типы лейкоцитов: В-лимфоциты вырабатывают антитела, нейтрализующие антигены в жидких межклеточных тканях (гуморальный иммунный ответ), а цитотоксические Т-лимфоциты разрушают болезнетворные агенты внутри клеток (клеточный иммунный ответ). Аналогичным образом действуют вакцины, содержащие живые аттенуированные (ослабленные) вирусы или бактерии. Но их применение связано с некоторыми рисками. Хотя вводится лишь ослабленный патоген, вероятность инфицирования и развития болезни не исключена. Даже ослабленные вирусы или бактерии не являются полностью безопасными. Особенно рискуют люди с иммунной недостаточностью, такие как больные СПИДом и онкологические пациенты, проходящие курсы химиотерапии. Кроме того, ослабленные живые бактерии и вирусы в некоторых случаях могут мутировать, восстанавливая весь свой патогенный потенциал. Более

безопасны вакцины, которые содержат убитый патоген либо отдельный очищенный его компонент – белок или полисахарид. Однако такие препараты менее эффективны: они в основном вызывают только гуморальный иммунный ответ и требуют проведения повторных вакцинаций.

К недостаткам обычных вакцин относится и то, что они достаточно дороги в производстве, нуждаются в особых условиях хранения и транспортировки – прежде всего, постоянной низкой температуре.

ДНК-вакцины обладают всеми положительными свойствами традиционных вакцин, при этом не имея их недостатков. Введение фрагментов ДНК бактерий или вирусов вызывает полноценную иммунную реакцию, но исключает возможность заражения, поскольку в клетки не попадают гены, необходимые для развития инфекции. ДНК-вакцины сравнительно просто синтезировать в значительных количествах, используя уже ставшую обычной рекомбинантную технологию. Производственный процесс унифицирован – меняются только гены, включаемые в плазмиду. Вакцины способны содержать фрагменты ДНК сразу нескольких различных штаммов возбудителей, их можно использовать против нескольких инфекций одновременно, что важно, в отношении изменчивых микроорганизмов, таких как вирус гриппа. ДНК-вакцины чрезвычайно устойчивы и могут в растворе или в сухом виде храниться при обычных условиях, выдерживая высокие и низкие температуры и разный уровень влажности.

Недостатки. Поскольку вводятся гены, кодирующие белковые молекулы, вырабатывается иммунный ответ только на появление белковых компонентов вирусов и бактерий. Т.е., традиционным вакцинам, в которых используются полисахариды, пока нет альтернативы. Существовало опасение, что молекула ДНК-плазмиды может встраиваться в ДНК хромосом. Другие неприятности, подозреваемые при первых испытаниях - возникновение аутоиммунного ответа, развитие толерантности к препарату и быстрого снижения эффекта от вакцинации. Хотя эти проблемы не проявились при проведении тестов, оценка рисков ДНК-вакцин продолжается.

Функции плазмид-векторов не ограничиваются доставкой «инфекционных» генов. Иммунная реакция, вызываемая генами (точнее, соответствующими им белками), плазмидами дополнительно усиливается. Это связано с тем, что в ДНК микроорганизмов, в том числе в кольцевых плазмидах, часто встречается связка цитозина (С) и гуанина (G). Эти основания намного реже соседствуют в ДНК позвоночных. Кроме того, если у позвоночных цитозин и гуанин расположены последовательно в одной цепочке двойной спирали, к ним прикрепляется метиловая группа. Бактерии обходятся без этого дополнения. Клетки позвоночных воспринимают часто

повторяющиеся неметилованные CG-фрагменты как сигнал опасности. В ответ активизируется «первичная» часть иммунной системы, работа которой не связана с распознаванием специфичных белков-антигенов.

Сегодня пытаются создать препарат, способный на короткое время активизировать иммунную систему на вторжение любой инфекции. Он обезопасит людей, которым предстоит дальняя поездка по санитарно неблагополучным районам; пациентов, ожидающие хирургическую операцию чтобы исключить вероятность развития инфекции, очевидную при пониженной активности иммунной системы; людей, вынужденных находиться на зараженных территориях; при угрозе применения биологического оружия.

Создании универсальной вакцины, подразумевает использование не генов, кодирующих белки-антигены микробов, а бактериальных последовательностей CG в качестве активного компонента. Когда иммунная система обнаруживает часто встречающиеся CG-фрагменты ДНК, лишённые метиловой группы, немедленно вызывается общий иммунный ответ, который защищает от инфекции. Эта реакция является неспециализированной, она направлена против многих видов бактерий одновременно, в том числе штаммов, которые не поддаются воздействию обычных вакцин.

Предварительные испытания дают результаты как в плане проверки на побочные эффекты, так и в отношении развития стойкого иммунитета. Эксперименты на мышах показали, что ДНК-вакцина предотвращает развитие сибирской язвы. Продемонстрирована эффективность препарата при борьбе с лихорадкой Эбола и другими инфекциями, в том числе теми, которые могут быть использованы в качестве биологического оружия. Кроме того, вакцина способна защитить и от паразитов. Показано ее противомаларийное действие. Синтетические препараты, содержащие CG бактерий в качестве активного компонента, прежде всего ограничивают рост и размножение патогенов на ранних стадиях развития инфекции.

Многочисленные бактериальные последовательности цитозина и гуанина содержатся в любой ДНК-вакцине, в том числе в тех, которые уже были протестированы на людях. Проводились исследования, в ходе которых оценивалось действие именно CG-фрагментов в качестве средства, усиливающего действие других вакцин. Использование CG бактерий может быть эффективным способом активизации естественной иммунной системы и с целью обеспечения защиты от биологического оружия.

Вопросы

1.вакцины производимые помощью генной инженерии

2.Генные вакцины

3.Актуальность разработки новых вакцин

4.Разработка ДНК-вакцин

5.Вопросы безопасности применения ДНК - вакцин

6.Участие фармацевтических компаний в разработке ДНК-вакцин

7.Способы введения ДНК-вакцины

8.Наиболее распространенным способом введения ДНК-вакцины

9.Особенности применения ДНК-вакцины

10.Иммуногенные свойства ДНК-вакцин.

11.Преимущества.

12.Недостатки

13.Причины, препятствующие внедрению вакцин в повседневную практику медицины и ветеринарии.

Раздел 8. Имобилизованные биообъекты в биотехнологиях.

Лабораторно-практических занятий не предусмотрено

Раздел 9. Санитарная и профилактическая биотехнология.

Лабораторно-практических занятий не предусмотрено

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никульников В.С. Биотехнология в животноводстве: учеб. Пособие для студ. по спец. «Зоотехния»/В.С. Никульников, В.К. Кретин – М.: Колос, 2007. -534 с.
2. Петухов В.Л. и др. Генетика/ В.Л. Петухов, О.С. Короткевич, С.Ж. Стамбеков и др.- Новосибирск: СемГПИ, 2007. – 628 с.

Основная литература, рекомендованная примерной программой дисциплины, имеется в библиотеке, доступна для студентов

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 458 с.
2. Себежко О. И., Петухов В.Л., Короткевич О.С. Экологическая генетика: учеб. Пособие.- Новосибирск: НГАУ, 2011.- 567 с.
3. Биотехнология. В 8 кн. / Под редакцией Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. — М.: Высшая школа, 1987 г.
4. Биотехнология: принципы и применение./ Пер. с англ. под ред. И.Хиггинса, Д.Беста, Дж. Джонса. — М.: Мир, 1988.
5. Воробьева Л.И. Техническая микробиология. — Изд. МГУ, 1987.
6. Грачева И.М. Биотехнология ферментных препаратов. — М.: Пищевая промышленность, 1992.
7. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Изд-во "Элевар", 2000 — 512 с.
8. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. — М.: "Пищевая промышленность", 1980.
9. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Высшая школа, 1990.
- 10.Панфилов В.И. Методические указания по курсу "Технология микробиологических производств". - М.:МХТИ им. Д.И. Менделеева, 1984.
- 11.Промышленная микробиология. / Под ред. Н.С. Егорова). - М.: Высшая школа, 1989.
- 12.Ферментация и технология ферментов. (Уонг Д., Косней И., Демайн А. и др.). Пер. с англ. — М.: " Пищевая промышленность", 1983.
- 13.Дж. Бейли, Д.Оллис. Основы биохимической инженерии. - М.: Мир, 1989 г.
- 14.Калуныц К.А., Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты. — М.: "Пищевая промышленность", 1979.

- 15.Елинов Н.П. Основы биотехнологии. — Изд-во "Наука", Сиб. отделение, 1995.
- 16.Дж. Бейли, Д.Оллис. Основы биохимической инженерии (в 2-х томах). — М.: Мир, 1989.
- 17.Производство антибиотиков. / Под ред. С.М. Навашина. — М.: "Медицина", 1970.
- 18.Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Высшая школа, 1990.
- 19.Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. — М.: "Пищевая промышленность", 1980.
- 20.Калунянц К.А., Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты. — М.: "Пищевая промышленность", 1979.
- 21.Ферментация и технология ферментов. (Уонг Д., Косней И., Демайн А. и др.). Пер. с англ. — М.: "Пищевая промышленность", 1983.
- 22.Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных// Дубровицы, ВИЖ, 2006, - 316 с.
- 23.Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве: основы методов в биотехнологии//М.: Россельхозакадемия, 1996, – 326 с.
- 24.Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Каплинская Л.И., Брем Г., Мюллер М. Методические рекомендации по молекулярно-генетическому анализу овец с использованием микросателлитных маркеров / Е.А.Гладырь [и др.] М.; РАСХН. 2004, – 31 с.
- 25.Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение /Б. Глик, Д. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
- 26.Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хингинса,Д. Беста и Дж. Джонсона. – М. : Мир, 1998. – 480 с.
- 27.Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. – М. : Наука, 2005. – Т. 1.
28. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / под ред. В.С. Шевелухи. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
- 29.Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы / под ред.В. С. Шевелухи. – М. : Евразия+, 2000. – 264 с.
- 30.Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, С. В. Калашникова, Е. З. Кочиева [и др.]. – М. : Высш. шк., 1998. – 416 с..
- 31.Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия / С. Н. Щелкунов ; Ново-сиб. гос. ун-т. – Новосибирск, 2004. – 496 с..

32. Эрнст, Л. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / Л. Эрнст, Н. Зиновьева // Вестник РФФИ. – 2002. – № 3.
33. Эрнст, Л.К. Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных/ Л.К. Эрнст, Н.И. Сергеев. – М.: Агропромиздат, 1989. – 302 с.
34. Niemann, H. Transgenic farm animals: an update / H. Niemann, W. Kues // Reproduction, fertility and development. – 2007. – V. 19. – P. 762–770.

1. 3.2. Информационное обеспечение

1. Презентационные материалы по всему курсу.

2. Интернет-ресурсы:

1. Федеральное бюджетное учреждение науки государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" <http://www.vector.nsc.ru>
2. [СО Россельхозакадемии](http://www.sorashn.ru/) <http://www.sorashn.ru/>
3. [Россельхознадзор Российской Федерации](http://www.fsvps.ru/fsvps) <http://www.fsvps.ru/fsvps>
4. [ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора](http://www.obolensk.org/) <http://www.obolensk.org/>
5. [Сотрудничающий центр Всемирной организации здоровья животных по заболеваниям домашней птицы, Юго-Восточная исследовательская лаборатория домашней птицы](http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=8647) <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=8647>
6. [Управление сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США](http://www.ars.usda.gov/main/main.htm) <http://www.ars.usda.gov/main/main.htm>
7. ["РУП Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского", Минск](http://belniig.by/ru/branches) <http://belniig.by/ru/branches>
8. [Национальный институт биологических наук Академии наук Китая, Пекин](http://www.nibs.ac.cn/english/index.php) <http://www.nibs.ac.cn/english/index.php>
9. Этические проблемы в биотехнологических исследованиях <http://www.hhs.gov/ohrp/>
10. Кафедра прикладной биотехнологии южно-уральского государственного университета <http://www.susu.ac.ru/ru/f/fc/kafedry/prikladnaya-biotehnologiya>, <http://vk.com/id90687870>

11. Факультет пищевых биотехнологии южно-уральского государственного университета
http://eda.susu.ac.ru/obshie/uch_otdel.html
12. Московский государственный университет прикладной биотехнологии (МГУПБ) <http://msaab.n4.biz/>
13. Российская федерация. федеральный закон о племенном животноводстве (Принят Государственной Думой 12 июля 1995года)
<http://www.informika.ru/text/goscom/normdoc/r01/01271.html>
14. Сертификат на продукцию генной инженерии /
http://cmmp.ru/page.aspx?id_page=861
15. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Молекулярно-генетические аспекты в создании и использовании трансгенных сельскохозяйственных животных / http://www.rfbr.ru/default.asp?doc_id=5805
16. European communities (certification of animals and animal products) regulations, 1999 / <http://faolex.fao.org/docs/texts/ire54449.doc> — правила сертификации продукции животного происхождения Евросоюза
17. Animal Export Certification Application forms, Information and Notes for Guidance to facilitate the export of animals /
<http://www.dardni.gov.uk/index/animalhealth/animal-export-certification.htm> — сайт отдела развития сельского хозяйства и сельских регионов Великобритании
18. <http://webfermer.narod.ru/marker.htm> — сайт для фермеров
19. http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00000c80.htm — база знаний по биологии
20. <http://www.biotech.iastate.edu/publications/mendel/ModuleIIP1.pdf> — биотехнологический образовательный портал государственного университета Айовы.

ГЛОССАРИЙ

Адвентивные почки- почки на растениях, возникающие из клеток и тканей, обычно их не образующих.

Акропетальный транспорт – транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам стебля.

Аминоацил-т РНК-синтетаза – фермент, который активирует аминокислоты и присоединяет каждую активную аминокислоту к ее собственной тРНК.

Амплификация – увеличение количества ДНК, числа копий генов.

Анаэробное брожение – процесс разложения субстрата анаэробными микроорганизмами.

Антагонизм – эффект взаимного подавления действия веществ или процессов.

Анеуплоид – организм, клетки которого содержат число хромосом, не кратные типичному гаплоидному набору.

Андрогенез – развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников или микроспор

Антигены – чужеродные белки, вызывающие при попадании в организм животного образование защитных веществ (антител)

Антитела – белки сыворотки крови (иммуноглобулины), блокирующие действие чужеродных веществ (антигенов)

Апикальное доминирование – коррелятивное торможение верхушкой побега или корня развития соответственно пазушных почек или боковых корней.

Ар-эндонуклеазы - ферменты, разрезающие ДНК в пуриновых или пиримидиновых участках.

Базипетальный транспорт – транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам корня.

Бактериофаги (фаги) - вирусы, поражающие бактерии.

Белково-витаминный концентрат (БВК) - белковый концентрат из кормовых дрожжей.

Бессмысленный кодон – один из трех триплетов, UAG, UAA, UGA, вызывающих терминацию синтеза белка.

Библиотека генома – коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК.

Биобезопасность – система мероприятий (законодательных актов и др.), направленная на обеспечение эффективного использования достижений генетической инженерии и биотехнологии, не допускающая при этом

неблагоприятных экологических последствий и непосредственной угрозы здоровью людей.

Биодеградация – свойство веществ изменять свою структуру под влиянием биологических объектов.

Биогаз – газ, образуемый в результате анаэробного брожения субстрата, состоит в основном из метана (60-70%), углекислого газа (30-40%) и примеси других газов.

Биотехнология – это наука о генноинженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования биотехнологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Биофильтр – сооружение для биологической очистки сточных вод (резервуар с двойным дном, наполненный фильтрующими материалами).

Биоэнергетика – наука о закономерностях преобразования энергии в процессах жизнедеятельности организмов

Блок Прибнова – каноническая последовательность ТАТААТГ, находящаяся на расстоянии около 10 п.н. перед стартовой точкой транскрипции бактериальных генов. Представляет собой часть промотора, отвечающую за связывание РНК-полимеразы.

Блоттинг – процедура переноса электрофоретически разделенной ДНК; ДНК-фрагментов, РНК, РНК-фрагментов или белков с геля (агарозного или полиакриламидного) на бумагу или мембрану (нитроцеллюлозу и др.).

Брешь (пробел) ДНК – отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в цепи ДНК.

Ведущая цепь – цепь ДНК, синтезирующаяся в 5'-3' направлении.

Вектор – молекула ДНК, способная к автономной репликации и включению в себя чужеродной ДНК. Является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку (перенос) генетической информации в клетку-реципиент и ее клонирование.

Гаметы – половые клетки с гаплоидным набором хромосом.

Гаметная селекция – отбор желаемых генотипов растений на уровне мужского или женского гаметофита.

Гаплоид – особь, несущая одинарный или гаплоидный набор непарных хромосом.

Ген – основная физическая и функциональная единица наследственности, специфическая последовательность нуклеотидов в ДНК (у некоторых вирусов – в РНК), детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК или рибосомальных РНК или последовательность аминокислот в белке.

Генетическая инженерия - генетическое конструирование новых форм биологически активных ДНК, генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток).

Генная инженерия – раздел генетической инженерии, включающий технологию рекомбинантных молекул: выделение, конструирование и клонирование новых рекомбинантных генов; создание банка генов и др.

Генетически модифицированные организмы (ГМО) – растения, животные или микроорганизмы, полученные в результате трансгеноза.

Геном – совокупность гаплоидного набора хромосом данного вида организмов.

Генетический код - система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот, основанная на определении чередования последовательности нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны соответствующих аминокислот белков.

Генотерапия – лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов или вживание полноценных соматических клеток в ткани биологического объекта.

Генотип – совокупность всех генов, локализованных в хромосомах организма.

Генофонд – совокупность генов группы особей, популяции, группы популяций или вида, в пределах которых они характеризуются определенной частотой встречаемости.

Гетерозис – превосходство гибридов F₁ по определенным признакам над лучшей из родительских форм.

Гиногенез – развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семян.

Гормон – химическое соединение, образующихся в малых количествах в одной части растения, обычно транспортирующееся в другую его часть и вызывающее специфический ростовой или формообразовательный эффект.

Гормональная система растений – регуляторный комплекс, состоящий из фитогормонов, их рецепторов и вторичных посредников (мессенджеров).

Гормональный статус – состояние фитогормональной системы в онтогенезе растений, уровни фитогормонов и соотношение между ними в процессах образования, передвижения, использования и инактивации в ответ на внешние воздействия.

Гормон-рецепторный комплекс – соединение гормона с белком-рецептором, действующее на активность генов и синтез белков.

Дедифференциация – переход специализированных неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.

Диплоид – организм с двумя гомологичными наборами хромосом ($2n$)

Дифференциация – возникновение функциональных и структурных отличий у различных клеток и тканей организма в процессе его развития.

ДНК – высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А,Т,С, G), аperiodическим чередованием которых кодируется генетическая информация организмов.

Затравка – короткая последовательность (часто это РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК; образует свободный 3-ОН-конец, на основе которого ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка.

Зиготная селекция – отбор желаемых генотипов растений на различных этапах развития зиготы от оплодотворения до образования семян.

Инвертированные повороты – два участка (копии) одной и той же двунитчатой ДНК, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности, но расположенные в противоположной (обратной) ориентации. Такие и.п. содержат палиндромы и сайты-мишени для различных белков, связывающихся с ДНК.

Интрон – последовательность нуклеотидов у эукариотических генов, транскрибируемых в про-иРНК, которые затем вырезаются и деградируют в ядре.

Каллус - неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных (утративших специализацию) клеток.

Клетки - мишени – клетки, в которых синтезируется белок-рецептор, способный к взаимодействию с гормоном.

Клеточная селекция – отбор естественных или индуцированных мутантов *in vitro* на клеточном уровне в селективных условиях с последующей регенерацией растений.

Клон –1. Организм или популяция клеток, полученных из одной или группы идентичных клеток при бесполом размножении. **2.** Последовательности ДНК, полученные многократно при помощи методов генетической инженерии.

Клональное микроразмножение - способ вегетативного размножения растений на основе культуры *in vitro*.

Клонирование – получение клонов (организм группа клеток, ген). Различают клонирование генов – выделение и амплификация отдельных

генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование – размножение молекул ДНК в составе вектора.

Кодон – триплет нуклеотидов в ДНК или РНК, кодирующий определенную аминокислоту либо начало и конец трансляции.

Компетентность – 1. способность клеток реагировать на определенный гормон, связанная с синтезом в клетках белка-рецептора; 2. Физиологическое состояние клеток, определяющее способность воспринимать трансформирующую ДНК.

Комплементарная ДНК – одно- или двунитчатая молекула ДНК, синтезируемая *in vitro* с помощью обратной транскриптазы или ДНК – полимеразы, копия и РНК, соответствующая определенному гену без интронов.

Криопротектор – вещество, ослабляющее повреждение клеток и тканей растений при замораживании для криосохранения.

Криосохранение – замораживание клеток и тканей растений в жидком азоте при температуре – 196° С с целью длительного хранения с последующим оттаиванием и получением регенерантов.

Ксенобиотик – синтетическое вещество, чуждое природе и могущее вызвать нарушения в функциях организмов, популяций, экосистем.

Лигирование – 1. Встраивание чужеродной ДНК между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы. 2. Процесс соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемой с участием фермента лигазы.

Липкий конец – конец двунитчатой молекулы ДНК, у которой одна нить длиннее ("торчащая "), чем другая ("заглубленная"). "Торчащий" участок нити может соединяться с другим комплементарным ему торчащим (липким) концом

Маркер – 1. М. генетический – локус хромосомы, определяющий конкретный фенотипический признак;
2. М. селективный – дополнительный ген, кодирующий устойчивость к антибиотику и введенный в вектор для отбора трансформантов;
3. М. (зонд) молекулярный – кДНК или любой другой фрагмент ДНК, используемый для выявления полиморфизма ДНК методом ПДРФ при построении генетических карт.

Мейоз – процесс деления половых клеток, приводящий к редукции (уменьшению) числа хромосом, рекомбинации генов и образованию гамет.

Меристема – конус активно делящихся клеток , расположенных на кончике побегов или корней.

Метантенк – резервуар значительной емкости для получения биогаза из навоза и других органических отходов в анаэробных условиях и их обеззараживания с помощью бактерий и других микроорганизмов.

Метод апикальных меристем – метод снижения концентрации или полной элиминации вируса в дочернем растении после его регенерации в культуре *in vitro* из апикальной меристемы.

Микориза – симбиоз мицелия гриба и корней высшего растения

Морфогенез – заложение, рост и развитие клеток, тканей и органов у растений.

Мутация - любое структурное или композиционное изменение в ДНК организма (в последовательности нуклеотидов, хромосом, генома), произошедшее спонтанно или индуцированное мутагенами.

Митоз – процесс непрямого деления эукариотических соматических клеток.

Мутаген – физический или химический агент, увеличивающий частоту мутаций по сравнению со спонтанным уровнем.

Незаменимые аминокислоты – аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека.

Нуклеиновая кислота – универсальный биополимер, хранящий и передающий генетическую информацию. Одно-или двунитчатый линейный полинуклеотид, содержащий дезоксирибонуклеотиды (ДНК) или рибонуклеотиды (РНК), связанные 3'-5' фосфодиэфирными связями.

Оперон – блок расположенных рядом прокариотических цистронов, экспрессия которых находится под контролем общего оператора, что ведет к синтезу единой полицистронной информационной РНК. Обеспечивает регуляцию генов, контролирующих родственные биохимические функции.

Онтогенез – комплекс последовательных и необратимых изменений жизнедеятельности и структуры растения от его возникновения из оплодотворенной яйцеклетки или вегетативной почки и до естественной смерти. О. является последовательной реализацией наследственной программы развития организма в конкретных условиях внешней среды.

Органогенез – образование монополярной структуры, т.е. отдельных органов из меристем (корней, стеблей, реже цветков или листьев). Органогенез может происходить непосредственно в ткани экспланта (прямой) или через стадию каллуса (непрямой).

Отрицательная суперспирализация – введение в двухцепочечную ковалентнозамкнутую ДНК супервитков, направление которых противоположно направлению витков цепей молекулы.

Партеногенез – развитие гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы (метод гаплопродюсеров).

Пассирование – перенос части каллуса на свежую питательную среду.

Плавление ДНК или РНК – диссоциация комплементарных цепочек двунитчатых ДНК или РНК и формирование одиночных нитей.

Плазмида – кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передаче в геном реципиента чужеродных генов.

Полиаденилирование – присоединение последовательности полиаденилиновой кислоты к 3' – концу эукариотической РНК после завершения ее синтеза.

Полиплоид – организм, в клетках которого содержится больше двух наборов хромосом.

Поллютант – вещество, загрязняющее окружающую среду и вызывающее нарушения в функционировании организмов, популяций, экосистем.

Привыкшая ткань – гормоннезависимая ткань, возникающая при длительном субкультивировании каллуса, способная к синтезу эндогенных ауксинов и цитокининов и теряющая способность к регенерации.

Промотор – участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения.

Протопласт – клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Разрыв в дуплексе ДНК – отсутствие фосфодиэфирной связи между двумя соседними нуклеотидами в одной из цепей двухцепочечной ДНК.

Редупликация – процесс точного самовопроизведения молекул нуклеиновых кислот.

Рекомбинантный ген – ген, состоящий из компонентов различных генов.

Рекомбинантная ДНК – новая последовательность ДНК, образованная путем лигирования двух или более негомолочных молекул ДНК.

Рекомбинация – комбинация генов у потомков (молекул, клеток, организмов), отличающаяся от комбинации их у родителей. РНК – рибонуклеиновая кислота, в состав которой входят нуклеотиды (аденин, гуанин, цитозин, урацил), рибоза и остатки фосфорной кислоты.

Селективная среда – средовые условия в культуре *in vitro*, обеспечивающие отбор клеток с желательными признаками (главным образом устойчивых к стрессам).

Синергизм – эффект взаимного усиления действия веществ или процессов

Сомаклон – регенерант растений, отобранный на основе соматоклональной изменчивости в культуре *in vitro*.

Соматоклональная изменчивость – генетическая изменчивость растений, регенерированных из соматических клеток в культуре *in vitro*.

Соматическая гибридизация – гибридизация между протопластами, выделенными из соматических клеток растений.

Соматический гибрид – растение-регенерант, полученное путем гибридизации соматических клеток.

Соматический эмбриогенез – образование биполярных зародышеподобных структур (эмбриоидов) из соматических клеток. Эмбриогенез может происходить в ткани экспланта (прямой) или через стадию каллуса (непрямой).

Стрессовые белки – белки, синтезируемые организмом в условиях стресса и снижающие его вредоносное действие.

Субкультивирование – перенос трансплантов (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Суспензионная культура – одиночные клетки и их агрегаты, растущие в жидкой аэрируемой питательной среде во взвешенном состоянии при постоянном перемешивании.

Термотерапия – лечение зараженных вирусными болезнями растений длительным воздействием на них повышенных температур.

Тотипонентность – способность растения функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки.

Трансген – ген, взятый из одного организма и перенесенный в другой организм или клетку.

Трансгеноз – процесс искусственного переноса генов от организма-донора к организму-реципиенту.

Трансгенный организм (генетически модифицированный организм) – организм, в геном которого с использованием методов генетической инженерии перенесена чужеродная информация, экспрессирующаяся в нем.

Трансляция – декодирование (считывание) информационной РНК рибосомами и транслирование этого кода в белок.

Транскрипция – синтез молекул РНК на ДНК или РНК-матрице, осуществляемый ДНК-зависимой или РНК-зависимой РНК-полимеразой.

Трансплант (инокулюм) – часть каллусной (суспензионной) культуры, используемая для переноски на свежую питательную среду.

Фенотип – совокупность признаков организма, определяемых генотипом и средовыми условиями.

Фиторегуляторы - группа природных и синтетических соединений. в малых дозах активно влияющих на обмен веществ, рост и развитие растений.

Химиотерапия - метод оздоровления посадочного материала в культуре *in vitro* путем обработки эксплантов или добавления в питательную среду химических соединений – ингибиторов вирусов.

Хромосомы - самовоспроизводящиеся элементы клеточного ядра , состоящие главным образом из ДНК и белков. В хромосомах заключена генетическая информация организма.

Цибрид (цитоплазматический гибрид) – гибрид, несущий гены ядра только одного из родителей наряду с цитоплазматическими (внеядерными) генами от обоих или только от другого родителя.

Цитоплазматическая гетерозигота - гибрид, несущий альтернативные цитоплазматические гены от обоих родителей.

Цистрон – любая последовательность ДНК, которая детерминирует нуклеотидную последовательность зрелой т РНК, и РНК или рРНК.

Экологическая биотехнология - использование методов генетической и клеточной инженерии , созданных на их основе организмов и технологий для оздоровления и защиты окружающей среды.

Экспрессия гена – реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции и трансляции и РНК. Конечный результат экспрессии гена проявляется в признаке фенотипа.

Эксплант – фрагмент ткани или органа, культивируемый на питательной среде *in vitro* самостоятельно или используемый для получения каллуса.

Электропорация – метод прямого переноса макромолекул ДНК в клетки путем пробивания клеточных мембран короткими (1 мсек) электрическими импульсами.

Эмбриокультура – выращивание изолированных зародышей на ранней стадии их развития в культуре *in vitro* и регенерация растений.

АТТ-Сайты – участки фаговой и бактериальной хромосом, рекомбинация между которыми приводит к интеграции или исключению фага.

СААТ - участок консервативной последовательности, расположенной примерно на расстоянии 75 пар оснований перед стартовой точкой в транскрипционных единицах эукариот.

In vitro – культивирование части организма "в стекле" на искусственных питательных средах в асептических условиях.

In vivo – культивирование организма в естественных условиях.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Цели и задачи дисциплины "Прикладная биотехнология"	4
ЛАБАРАТОРНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ	
Раздел 1 Предмет прикладной биотехнологии	
Тема 1.1 Основные направления и методы биотехнологии. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии	5
Раздел 2 Современные проблемы и методы биотехнологии	
Тема 2.1 Генетическая и клеточная инженерия.	5
Лабораторная работа № 1 "Выделение и анализ ДНК"	5
Лабораторная работа № 2 "Анализ полученных препаратов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле"	7
Лабораторная работа № 3 "Рестрикционный анализ полученного препарата ДНК"	9
Раздел 3 Промышленная и экологическая биотехнология	
Практическое занятие № 1 Биотехнологический процесс — стартовый этап для получения исходного сырья (на примере технологий получения дифтерийного анатоксина)	12
Практическое занятие № 2 Использование биотехнологического процесса на одном из этапов получения лекарственного средства (биотрансформация — на примере технологии получения витамина С).	17
Практическое занятие № 3 Биотехнологические процессы очистки воздуха и воды.	23
Раздел 4 Современные достижения биотехнологии в сельском хозяйстве	
Практическое занятие № 4 Препараты на основе живых культур микроорганизмов. Применение в животноводстве.	28
Раздел 5 Биотехнологические методы консолидации и размножения генотипов выдающихся животных	

Практическое занятие № 5 Молекулярно-генетические маркёры. MAS-селекция.	32
Практическое занятие № 6 Трансгенные животные в сельском хозяйстве. .	35
Раздел 6. Пищевая биотехнология.	
Практическое занятие № 7 Продукция микробиологического синтеза для пищевой промышленности	41
Лабораторная работа № 4 "Количественное определение присутствия ГМО в продуктах питания методом ПЦР"	44
Раздел 7 Медицинская биотехнология	
Практическое занятие № 8 Получение видоспецифических для человека препаратов. Производство генно-инженерного инсулина.	53
Практическое занятие № 9 ДНК-вакцины: свойства и методы получения. Перспективы.	56
Раздел 8 Иммобилизованные биообъекты в биотехнологиях.	61
Раздел 9 Санитарная и профилактическая биотехнология.	61
Список основной литературы	62
Список дополнительной литературы	62
Глоссарий	66
Содержание	75

Составитель
Себежко Ольга Игоревна

ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания к лабораторным занятиям

Формат 60x84 1/16 4,8 усл. печ. л.

В авторской редакции
Компьютерная вёрстка О.И. Себежко