

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В
БИОТЕХНОЛОГИИ

Методические указания по выполнению самостоятельной и контрольной
работ

Новосибирск 2022

УДК 619:614.31

ББК 48

С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

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

Рецензент: Тянь Е.А., к.б.н., доц. кафедры экологии НГАУ

Молекулярно-генетические методы в биотехнологии: метод. указания по выполнению самост. и контр. работ / сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2022. – 53 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов-магистров студентов Биолого-технологического факультета по направлению подготовки 19.04.01 – Биотехнология».

Изложены основные вопросы курса «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии», для самостоятельного изучения и вопросы для контрольной работы. Приведены глоссарий, библиографический список, тесты и вопросы к сдаче зачета.

©Новосибирский государственный аграрный университет, 2022

Введение

Биотехнология — это использование организма, компонента организма, биологической системы или продуктов их жизнедеятельности для производства других продуктов или новых процессов.

Молекулярно-генетические исследования играют огромную роль при изучении организма. Они позволяют выявить нарушения в генах, другими словами – мутацию. Важнейшим достоинством метода диагностики является минимальная степень медицинского вмешательства, поскольку исследование проводят *in vitro*. Метод успешно применяют даже для диагностики заболеваний у эмбрионов, а также у ослабленных и тяжелобольных пациентов.

Дисциплина включает современные данные о направлениях, принципах и подходах современных молекулярно-генетических исследованиях в областях биотехнологии, а также их применениях. В курсе предусматриваются самостоятельные занятия, закрепляющие теоретические знания в процессе научно-исследовательской работы, а также тесты и вопросы к сдаче зачета. Дисциплина ориентирована на более глубокое понимание и изучение общебиологических закономерностей.

Целью методических указаний по изучению курса «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» является обеспечение эффективности самостоятельной работы студентов-магистров на основе усвоения материала курса лекций, подготовки к семинарским занятиям, написания контрольных работ и работы с литературой.

Задачи методических указаний по изучению дисциплины:

- активизацию самостоятельной работы студентов-магистров;
- выработку умений и навыков рациональной работы с литературой;
- обеспечение контроля за ходом самостоятельной работы студентов-магистров и ее результатами;
- управление познавательной деятельностью студентов-магистров.

Задача курса учебной дисциплины «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» – дать знания по данной дисциплине и обеспечить формирование у студентов-магистров представлений о современных молекулярно-генетических методах исследований, применяемых биотехнологии.

В результате изучения дисциплины студенты-магистры приобретают знания и умения в данной области и могут применять их на практике.

Структура и трудоемкость дисциплины

«Молекулярно-генетические методы в биотехнологии»

Курс «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» изучается в течение одного семестра на втором курсе магистратуры. Объем дисциплины и виды учебной работы по курсу приведены в таблице.

Вид занятий	Объем занятий [зачетных ед./часов]			Семестр
	очная	заочная	очно- заочная	
Общая трудоемкость по учебному плану	3/ 108			2
В том числе,				
Контактная работа	70			
Занятия лекционного типа	20			
Занятия семинарского типа	50			
Самостоятельная работа, всего	38			
В том числе:				
Контрольная работа	К.р.			2
Форма контроля	зачет			2

Учебной программой дисциплины «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» предусмотрено 75,93 % объема времени отводить на самостоятельную работу студентов. Данный вид работы является обязательным.

При самостоятельном выполнении различных видов заданий студентами магистры учатся самостоятельно принимать решения, разбирать и изучать новый материал, работать с периодической научной литературой.

Самостоятельная работа по курсу «Молекулярно-генетические методы в биотехнологии» включает:

- самостоятельное изучение теоретического материала с использованием рекомендуемой литературы;
- подготовку к практическим занятиям;
- написание и защиту контрольной работы;
- самотестирование;
- подготовку к зачету.

По каждому виду работы магистрант должен выполнить задания, приведенные в настоящих методических указаниях и согласованные с преподавателем. Выполненные задания оформляются в соответствии с требованиями оформления студенческих текстовых документов и сдаются преподавателю в соответствии с графиком самостоятельной работы.

Для аттестации студентов по дисциплине используется традиционная система контроля и оценки успеваемости обучающихся.

Раздел 1. Молекулярно – генетические методы диагностики

Для применения в диагностических лабораториях разработаны несколько методов молекулярно(генетического анализа: классический цитогенетический анализ (кариотипирование), ПЦР(диагностика (метод полимеразной цепной реакции), цитогенетический анализ с использованием флуоресцентных красителей (FISH), микроконтроль. Первые два метода – классический цитогенетический анализ и ПЦР(диагностика – уже нашли применение в некоторых российских диагностических лабораториях. Кариотипирование позволяет успешно проводить анализ анеуплоидии и трисомии, крупных транслокаций, инверсий и делеций хромосом. Метод ПЦР более востребован при анализе моногенных наследственных заболеваний, обусловленных точечными мутациями и делециями. Настоящий обзор посвящен описанию менее известным молекулярно(генетическим методам.

Диагностика с использованием метода Fluorescence in situ Hybridization (FISH).

Еще в 1969 г. Gall and Pardue [1] показали возможность изучения строения отдельных участков хромосом с помощью ДНК проб при гибридизации in situ. Сложности детекции проб на основе радиоактивной метки не позволяли вплоть до 1990 года использовать эту методику в цитогенетической практике. Разработка флуоресцентных меток для клонированных проб ДНК явилась основой молекулярно-цитогенетического метода, названного FISH-метод – Fluorescence in situ hybridization [2–4]. Метод позволяет объективно выявлять индивидуальные хромосомы и их отдельные участки на цитологических препаратах в метафазных или интерфазных ядрах на основе особенностей их молекулярно(генетического строения. Подобно классическим методам в гистологии, цитологии и цитогенетике, FISH может проводиться на тканевых, клеточных и хромосомных препаратах. Однако объектом исследования в данном случае являются не морфологические особенности ткани, клеток или хромосом, а особенности нуклеотидного состава конкретной хромосомы или ее отдельного участка. Соответственно, выявляемые изменения являются генетическими (этиологическими), а не морфологическими (фенотипическими), и относятся к более тонкому уровню организации наследственного материала клетки. FISH позволяет оценить генетический статус каждой отдельной клетки и выявить, к примеру, несколько этиопатогенетически значимых аномальных клеток среди тысяч клеток с нормальным генотипом, что не под силу ни одному методу (даже такому как ПЦР, при котором ДНК всех клеток смешивается и результат усредняется).

Метод FISH-анализа из исследовательского метода постепенно стал превращаться в необходимую аналитическую процедуру и востребован сегодня в пренатальной диагностике, в мониторинге зигот (бластомеров) при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО), в

гематологической и онкологической практике, а также при мониторинге внешне средовых воздействий на наследственный материал человека. Классический метод FISH (анализа основан на гибридизации известной по нуклеотидному составу ДНК-пробы с участком тестируемой хромосомы и последующим выявлением результата гибридизации по метке – флуоресцентному сигналу в ожидаемом участке. В качестве ДНК(пробы (ДНК- зонда) могут служить относительно небольшие фрагменты ДНК, комплементарные анализируемой последовательности хромосомной ДНК (мишени) больного. Размер проб может варьировать от 90–100 тысяч до нескольких миллионов пар нуклеотидов, так что мишенью могут служить не только отдельные гены или хромосомные участки, но и целая хромосома. Наиболее часто применяемые меченые ДНК-пробы сегодня коммерчески доступны. В тех же случаях, когда в лаборатории имеется собственная коллекция хромосомо- или сайтспецифичных плазмидных, космидных или PAC- клонов, перед FISH необходимо приготовление нужной ДНК-пробы – мечение пробы путем ДНК(полимеразной реакции замещения (ник-трансляции). FISH анализ осуществляется в несколько этапов:

- получение препаратов и их предподготовка;
- мечение ДНК-пробы;
- гибридизация с ДНК-пробой, то есть собственно технология FISH:
 - денатурация препаратов;
 - денатурация ДНК(проб;
 - процедура гибридизации;
 - окраска препаратов;
- детекция ДНК-зонда при микроскопическом анализе.

По своей диагностической характеристике ДНК-пробы (зонды) подразделяются на несколько групп:

- CEP – Chromosome Enumerator Probe, хромосомные нумераторы или центромерные зонды;
- SubTel – Subtelomere specific, субтеломерные зонды;
- WCP – Whole(Chromosome(Painting, целно(хромосо(мные зонды;
- mBand – High Resolution Multicolor Banding, зонды для определения внутрехромосомных перестроек;
- LSI – Locus Specific Identifier, локус специфические зонды.

Центромерные пробы, и в меньшей степени, теломерные, широко используются в диагностике численных хромосомных нарушений (моносомии и трисомии). Наибольшее распространение эти пробы получили в пренатальной цитогенетической диагностике, особенно в исследованиях хориальной ткани, в ходе которых не всегда возможно получение качественных хромосомных препаратов или требуется быстрое цитогенетическое заключение при риске наличия распространенных хромосомных болезней, обусловленных нерасхождением хромосом. Остальные группы зондов востребованы для

экспрессдиагностики с целью уточнения степени мозаицизма неделящихся клетках ворсин хориона и амниотической жидкости. По данным отечественных исследователей, чувствительность FISH-анализа (вероятность того, что плод с анеупloidией по хромосомам 13, 18, 21, X и Y будет позитивным по FISH-тесту) в среднем составляет 99,6%, а специфичность (вероятность того, что плод с нормальным набором хромосом 13, 18, 21, X и Y будет иметь нормальный FISH-тест) – 99,98%. При обследовании супружеских пар, страдающих бесплодием, показана эффективность центромерных зондов по X и Y хромосомам для выявления скрытого мозаицизма. В последние годы центромерные зонды стали применяться для медикогенетических обследований родителей и будущего ребенка при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), при обязательном мониторинге развития зиготы в результате ЭКО, контроле качества спермы доноров, а также экспрессдиагностике причин ранних выкидышей и неразвивающихся беременностей. Метод FISH – чувствительный метод и для обнаружения цитогенетических отклонений уже на ранней стадии опухолевого преобразования клеток. Все большее распространение FISH зонды получают в диагностике и мониторинге лечения онкологических и онкогематологических заболеваний. Достоинства метода:

- Метод допускает неинвазивный забор материала. Это существенно при анализе кариотипа плода: возможен забор лишь одной клетки бластомера перед имплантацией, или анализ редких фетальных клеток, циркулирующих в крови матери.

- Анализ занимает непродолжительное время – обычно 1–3 суток.

- Квалификация обслуживающего персонала может быть не столь высокой, как в случае с классическими методами, поскольку детекция аберраций упрощена.

- Меньшее количество ошибок по вине персонала из-за уменьшения объема рутинной работы.

- Возможен анализ кариотипа единственной клетки.

- Требования к чистоте исследуемого образца не столь высоки, как для метода ПЦР.

Проблемы внедрения метода:

- Монополия одной крупной фирмы производителя на российском рынке не позволяет достаточно быстро и широко внедрять технологию FISH.

- Недостаточно полно представлена линейка коммерчески доступных наборов.

- Малое число специалистов, подготовленных для работы с FISH.

- Еще не сложился единый стандарт в интерпретации полученных данных.

- Большую часть времени в FISH-диагностике занимает утомительный ручной процесс пробоподготовки. Две последних

проблемы из перечисленных вполне могут быть устранены внедрением автоматических систем FISH-диагностики, которые практически не представлены сейчас ни на российском, ни на мировом рынке.

Автоматические системы FISH-диагностики.

В методике FISH есть два принципиально различных этапа, которые могут быть автоматизированы: 1) этап получения изображения (пробоподготовка, мечение, гибридизация, окраска) («front(end)» системы; 2) этап анализа полученного изображения -«back(end)» системы. Этап пробоподготовки в российских лабораториях проводится, как правило, вручную. При увеличении потока FISH-анализов при ручной и полуавтоматической системе обработки данных пропорционально возрастает и количество ошибок по вине персонала. Это относится как к этапу подготовки проб, так и к этапу анализа изображения. Автоматическая система лишена таких недостатков. Кроме того, автоматизированный способ интерпретации результатов всегда одинаков и не варьирует в зависимости от оператора. Полуавтоматические системы анализа изображения FISH применяются в российских лабораториях почти повсеместно. Что же касается полностью автоматизированных систем, то сегодня на российском рынке представлена всего одна автоматическая «front-end» система для FISH и нет ни одной автоматической «back-end» системы.

Автоматизация диагностики FISH требуется там, где имеется постоянный поток однотипных анализов и есть определенные объемы работ, с которыми трудно справиться вручную. По данным специалистов ГНЦ РАМН, в нашей стране около 5 тысяч больных только хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Это соматическое заболевание, для лечения и мониторингирования которого нужно три плановых обследования каждого больного в год. В итоге получаем 15 тысяч анализов кариотипа только для лечения и мониторингирования ХМЛ. В нашей стране такие цитогенетические исследования централизованы в нескольких крупных медицинских центрах. Таким образом, в этих клиниках набирается до 50–70 образцов для FISH-диагностики в день, что уже вполне достаточно для загрузки автоматических систем.

Диагностика с использованием биологических микрочипов.

Биологические микрочипы – это набор молекул ДНК (реже – белков), упорядоченно размещенных на специ(альном носителе, так называемой «платформе». Платформой может служить пластинка из стекла, пластика, кремния, или полимерная мембрана. Размер диагностической поверхности микрочипа может варьировать от нескольких квадратных миллиметров до 50 квадратных сантиметров. На каждом микрочипе может располагаться от 30–50 до нескольких десятков и даже сотен тысяч упорядоченно нанесенных микротестов или проб. ДНК-пробы длиной от 25–30 до 200–1000 нуклеотидов могут быть нанесены на кремниевую, стеклянную, нитроцеллюлозную подложку,

выращены на кварцевой подложке методом импульсионной фотолитографии или внесены в гель (в случае гелевых чипов). Принцип действия микрочипов основан на способности комплементарных оснований нуклеиновых кислот образовывать химические связи. Одна из комплементарных цепей ДНК (ДНК-проба), с известной последовательностью нуклеотидов, зафиксирована на «платформе» (подложке или пластине), а другая одноцепочечная ДНК-мишень (зонд), меченная флуоресцентной меткой, вносится в ДНК-чип. Наличие того или иного вещества или гена в образце определяют по люминесцентному свечению на прореагировавшем чипе. Анализ прореагировавших чипов производится автоматически с помощью специальной регистрирующей системы – анализатора (чип-детектора), который представляет собой либо флуоресцентный широкопольный микроскоп, либо специальное считывающее лазерное устройство, соединенные с видеокамерой и компьютером.

Аналитическая ячейка микрочипа – это:

микроскопическое количество молекул зонда, прикрепленное к поверхности носителя или помещенное внутрь него (как в случае с гелевыми чипами),

+ флуоресцентно меченая ДНК зонда,

+ набор реактивов для мечения, гибридизации и детекции сигнала.

Собственно микрочиповый анализ включает в себя следующие этапы:

- Пробоподготовка анализируемого материала:

• выделение и очистка анализируемой ДНК (или РНК) зонда;

• амплификация ДНК (или РНК) зонда с одновременным мечением флуоресцентным красителем.

- Гибридизация амплифицированного, флуоресцентно меченого зонда с ДНК(пробами, содержащимися на микрочипе.

- Детекция сигнала.

- Обсчет полученных данных.

Технология микрочипов может быть использована в клинической диагностике для определения вирусов и микроорганизмов, гормонов, аллергенов, наркотиков, любых биоактивных веществ в любых малых концентрациях; в биологических и медикобиологических исследованиях; в криминалистике; для исследований в области экологии и биобезопасности. Микрочипы можно классифицировать:

-По типу используемой платформы (стеклянная пластинка; пластиковая пластинка; кремниевая пластинка; нитроцеллюлозная мембрана; гелевая пластинка; кремниевые шарики).

-По количеству проб на одном чипе: от десятков и сотен проб – гелевые чипы и чипы на нитроцеллюлозных и нейлоновых мембранах, – до тысяч, десятков и сотен тысяч проб – чипы, «выращенные» на стекле и кремнии.

-По способу прикрепления зондов: нанесение на подложку уже готового зонда; выращивание молекул зонда на носителе (фотолитография); размещение молекул зонда внутри геля.

-По характеру наносимых на чип зондов: молекулы ДНК; белковые молекулы; молекулы ферментов.

- По способу детекции сигнала: детекция люминесценции с помощью микроскопа или лазерной сканирующей системы; измерение электропроводности гибридных молекул ДНК; измерение кривых плавления гибридных молекул ДНК. Существуют два основных типа микрочипов – ДНК-чипы и белковые. Белковые чипы появились сравнительно недавно, с их помощью анализируют различные белковые молекулы – антитела, антигены, гормоны, аллергены. Сейчас основная доля производимых микрочипов – ДНК-чипы. Они способны анализировать так называемые линейные молекулы – ДНК и РНК – к примеру, находить мутации в генах, сравнивая «больные» и «здоровые» ДНК, или выявлять ДНК вирусов и бактерий. Собственно микрочиповый анализ включает в себя следующие этапы:

-Пробоподготовка анализируемого материала:

- выделение и очистка анализируемой ДНК (или РНК);
- амплификация ДНК (или РНК) с одновременным мечением флуоресцентным красителем.

- Гибридизация амплифицированного материала с пробами, содержащимися на микрочипе.

- Детекция сигнала.

Применение микрочиповой технологии в диагностике патологий человека началось относительно недавно, сразу же после завершения проекта полного секвенирования генома человека. Первые микрочипы выращивались, подобно электронным чипам, на кремниевой подложке и включали в себя десятки тысяч олигонуклеотидных проб, покрывающих разнообразие чуть ли не всего генома. Применялись они исключительно в научно-исследовательских работах для выявления генов-мишеней, то есть групп генов, экспрессия которых изменялась при исследуемой патологии. Когда же, по мере накопления научных данных, такие группы генов обрели устойчивые очертания, компании-производители начали выпускать более специализированные продукты: наносить на микрочипы пробы только тех генов, которые, в большей или меньшей степени, вовлечены в специфический патологический процесс. Количество проб сократилось до тысяч, а затем и до сотен генов. Хотя тенденция заметно улучшилась, применение микрочипового анализа в клинике еще весьма ограничено. На Западе, как правило, его применяют в крупных медицинских центрах кардиологического и онкологического профилей. В России же микрочипы как диагностический тест практически не представлены. Достоинства метода:

-В одном образце может быть проанализирована экспрессия сразу большого количества диагностически значимых генов.

- Высокая воспроизводимость результатов.

-Метод сводит ошибки по вине персонала к минимуму: все этапы про(водятся на стандартных наборах; этапы детекции сигнала и обсчета результатов автоматизированы.)

- Анализ занимает непродолжительное время – от 4–6 часов до суток.

- Метод теоретически допускает неинвазивный забор материала и анализ кариотипа единичной клетки.

- Полученный на стадии амплификации материал может использоваться, теоретически, для ДНК-диагностики на протяжении всей жизни пациента. Проблемы внедрения метода:

- Недостаточно полно представлена линейка коммерчески доступных наборов.

- Практически не представлена линейка диагностических микрочипов, сертифицированных для клинических исследований.

- Метод практически не известен среди российских специалистов.

- Малое число специалистов, подготовленных для работы с микрочипами.

- В отличие от FISH, метод микрочипов требует обязательной амплификации анализируемого материала. Какие выводы можно сделать из всего вышеизложенного о перспективах развития спектра методов молекуляр(но)генетической диагностики?

Очевидно, что будущее за:

- увеличением разнообразия диагностических наборов;

- упрощением и автоматизацией процессов пробоподготовки;

- автоматизацией обсчета и анализа полученных данных. По нашим прогнозам, описанные в данном обзоре методы начнут соответствовать этим требованиям не позже, чем через 3–5 лет.

Раздел 2. Видовая идентификация

В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Методы исследования белков включают в себя иммунологические, электрофоретические и хроматографические. Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью их структуры по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей. В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Методы исследования белков включают в себя иммунологические, электрофоретические и хроматографические. Анализ молекул ДНК

применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью их структуры по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей. В результате исследований в качестве основного метода выбран метод ПЦР в реальном времени (real time PCR), обладающий надежностью, высокой чувствительностью, достаточной экспрессностью, с возможностью его использования для молочных многокомпонентных продуктов со сложной структурной матрицей, а также для продуктов, прошедших глубокую технологическую обработку.

В последнее время маркировка продукции имеет решающее значение для осведомленности потребителя о составе пищевой продукции. Неверно указанная информация о составе продукта или его свойствах, а также заведомо ложная информация о наименовании товара и его компонентах может привести к негативным последствиям в отношении здоровья потребителей. Это может быть связано, например, с наличием пищевой аллергии на определенные компоненты животного и растительного происхождения, входящие в состав продукции. Данные обстоятельства подтверждают необходимость проведения исследований состава продукта с применением молекулярно-генетических методов анализа на предмет идентификации и отсутствия незаявленных компонентов, таких как аллергены, ГМО и прочие возможные составляющие пищевой продукции.

В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Применяемые методы исследования белков включают в себя иммунологические (Haza et al., 1999), электрофоретические и хроматографические методы (Ferreira et al., 2003). Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью структуры молекул ДНК по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей, что делает анализ молекул ДНК для идентификации компонентов в продуктах питания хорошей альтернативой анализу состава белков (Gachet et al., 1999). Методы, основанные на анализе ДНК, в большинстве своем состоят из специфических амплификаций одного или нескольких фрагментов ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применение полимеразной цепной реакции имеет широкий потенциал в связи с высокой чувствительностью, быстротой и простотой проведения анализа.

В качестве дополнительных методов подтверждения и анализа фрагментов ДНК могут быть использованы следующие методы анализа:

- полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) – способ исследования геномной ДНК путем фрагментирования ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров

образующихся фрагментов с использованием метода гель-электрофореза (Lockey et al., 2000);

- одностранный конформационный полиморфизм (PCR-SSCP) – после денатурации одноцепочечная ДНК претерпевает трехмерное свертывание и может принимать уникальное конформационное состояние на основе своей последовательности ДНК. Различие в форме между двумя одноцепочечными цепями ДНК с разными последовательностями вызывает их различную миграцию на агарозном геле, даже если количество нуклеотидов одинаково;

- случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (PCR-RAPD) – используется как одиночный праймер, так и несколько RAPD-праймеров. Продукт RAPD образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированной инвертированной последовательностью используемого праймера. Метод универсален для исследований разных видов, при использовании одних и тех же праймеров. Как правило, праймер, выявляющий высокий полиморфизм для одного вида, будет эффективен и для других видов (Lockey et al., 2000);

- повторы последовательностей (PCR-SSR) – являются очень эффективным молекулярным маркером в популяционной генетике, картировании генома, таксономических исследованиях и других крупномасштабных исследованиях. Данный способ ПЦР с фланкирующими праймерами к короткому мини- или микросателлитному повтору позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу (Lockey et al., 2000);

- мультиплексная полимеразная цепная реакция (Multiplex PCR) относится к использованию полимеразной цепной реакции для амплификации нескольких различных последовательностей ДНК одновременно.

Приведенные выше молекулярно-генетические методы можно разделить на две крупные составляющие: количественный конкурентный ПЦР и ПЦР в реальном времени (real time PCR) с возможностью использования специальных зондов или меченых праймеров (Zimmermann et al., 1996). ПЦР в реальном времени позволяет проводить одновременное обнаружение и подтверждение выделенных фрагментов, что повышает надежность применения методики измерений для анализа пищевых продуктов. Необходимость в идентификации видового состава молочной продукции явилась отправной точкой к применению методов молекулярно-генетического анализа с последующей разработкой методик измерений, базирующихся на принципах ПЦР диагностики, но с учетом всех достоинств и недостатков метода. В настоящее время методы ПЦР диагностики уже успешно применяются для определения видового состава мясной и рыбной продукции, а также пивоваренной продукции.

В связи с высокой чувствительностью методы ПЦР все больше используются для обнаружения ДНК продуктов как растительного, так и животного происхождения, и распространяются на все более широкий круг потенциальных аллергенов. Первые методики использования метода ПЦР для анализа ГМО были разработаны на основе количественной конкурентной ПЦР (QC-PCR) и применялись для анализа генно-модифицированной кукурузы и сои (Hübner et al., 1999). В настоящее время ПЦР в реальном времени является наиболее часто используемой техникой для количественного определения ГМО. Это связано с некоторыми преимуществами метода, в частности сокращение продолжительности анализа и устранение мешающих артефактов за счет отсутствия анализа путем электрофореза в агарозном геле, а также повышенная специфичность за счет возможности использования зондов. Применение комплекса аналитических методов, основанных на полимеразной цепной реакции, делает возможным проводить аутентификацию мясной продукции по видовому составу с учетом различных вариантов технологической обработки (Meyer et al., 1994; 1995), что позволяет комплексно подойти к решению вопроса идентификации состава. Интересен подход к идентификации и при исследовании рыбной продукции. Определение видового состава рыбной продукции обычно ведется классическими методами по морфологическим признакам. Но при анализе рыбной продукции с искаженными морфологическими признаками вследствие влияния технологической обработки дать однозначный ответ на видовое происхождение примененных компонентов нельзя. В этом случае для определения состава рыбной продукции используются методы ПЦР

Изучение применяемых методов ПЦР анализа рыбной продукции показало, что большинство основанных на анализе ДНК методов идентификации рыбной продукции построено на усилении митохондриальной ДНК. Для видовой идентификации чаще других используется цитохром Б (Asensio et al., 2001; Calo-Mata et al., 2003; Hold et al., 2001), что позволяет расширять возможности применения методик измерений. Активно используется метод ПЦР диагностики для оценки технологических свойств молока. По данным авторов (Ахметов и др., 2009; Бигаева и др., 2019а; 2019б; Tyulkin et al., 2019), в настоящее время фальсификацию молочной продукции можно свести к несоответствию заявленных составных частей продукта или не заявленных видов молокасырья при производстве той или иной молочной продукции. Анализ видовой составляющей молочного сыра необходим при производстве "чистых" продуктов, таких, например, как овечьи или козьи сыры, где достаточно часто встречается использование коровьего молока. Посредством метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) возможно выявление примесей добавленного молока от 0,1 %, что позволяет с высокой точностью определять видовую специфичность даже в условиях

"осложненной" различными технологическими факторами матрицы продукта

Разработки в области аутентификации молочной продукции позволили проводить идентификацию четырех видов сельскохозяйственных животных (корова, овца, коза, буйвол), представляющих наибольший интерес в молочной промышленности (Plath et al., 1997). Возможен анализ видовой составляющей молочных продуктов, прошедших технологическую обработку, в том числе и термическую.

Раздел 3. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ

Генетический контроль за пищевой продукцией из ГМИ. Широкое использование продуктов или компонентов пищи, полученных из ГМИ, требует оценки их качества и безопасности. Своевременный контроль позволит избежать нежелательных эффектов выражения генов: изменения пищевой ценности и технологических параметров, непредсказуемых отдаленных последствий (эмбриотоксическое, гонадотоксическое и тератогенное действия), аллергических реакций, мутагенности и токсичности.

В настоящее время беспокойство по поводу влияния новых продуктов на здоровье населения в одних странах носит более выраженный характер, чем в других, что обусловлено спецификой внутренней политики разных государств. В США для широкого использования разрешена целая группа продуктов. В странах ЕС существует разрешение на ввоз и продажу только некоторых генетически модифицированных продуктов — соевых бобов, томатов, картофеля и маиса. На настоящий момент в мире не известно ни одного факта отрицательного воздействия генетически модифицированной пищи на здоровье человека.

Для проведения оценки качества и безопасности продуктов, полученных из ГМИ, в Институте питания РАМН разработаны соответствующие методические подходы и медико-биологические критерии оценки их качества и безопасности. Ключевой момент — детальное изучение химического состава новой пищевой продукции (как показателей пищевой ценности, так и санитарно-химических показателей безопасности).

Поскольку продукты, полученные из новых нетрадиционных источников или с использованием новых технологий, могут содержать неизвестные компоненты, проводят токсикологические исследования на лабораторных животных, в рацион которых новый продукт включают в максимально возможном количестве. Изучению подвергают интегральные показатели состояния животных, биохимические показатели крови, мочи и внутренних органов, гематологические

показатели периферической крови, проводят морфологические исследования органов, а также изучают иммунный статус организма.

При необходимости проводят специальные исследования ГМИ, направленные на изучение его аллергенных свойств, выявление возможных мутагенных и канцерогенных эффектов и оценку возможных отдаленных последствий для развития будущих поколений (эмбриотоксическое, гонадотоксическое и тератогенное действия). Завершающий этап — испытания новой продукции на добровольцах.

На основании результатов всех проведенных исследований рассматривается вопрос о государственной регистрации и разрешении широкого применения нового продукта или компонента пищи.

Во всех странах регистрация ГМИ преследует одну цель — достоверно оценить безопасность и полноценность новых аналогов традиционных продуктов. Начиная с 1991 г., ученые приступили к разработке специальных рекомендаций для всесторонней и надежной оценки новой пищи. На первом этапе проводится анализ композиционной эквивалентности, то есть сравниваются молекулярные и фенотипические характеристики ГМИ и их традиционных аналогов, определяется содержание ключевых нутриентов, антиалиментарных, токсических веществ и аллергенов (характерных для данного вида продовольствия или определяемых свойствами переносимых генов).

Если при изучении композиционной эквивалентности не обнаруживают отличий ГМИ от традиционных продуктов, то ГМИ причисляют к первому классу безопасности, то есть считают его полностью безвредным для здоровья потребителей. При обнаружении каких-либо отличий (второй класс безопасности) или полного несоответствия (третий класс) сравниваемых продуктов (компонентов) переходят к следующим этапам оценки, предусматривающим изучение пищевых и токсикологических характеристик ГМИ.

В настоящее время большинство ГМИ пищи относят ко второму классу безопасности, учитывая присутствие в их составе 1-2 белков, отвечающих за проявление желаемого признака, что отличает трансгенный продукт от традиционного.

Некоторые исследователи считают, что методика сравнения композиционной эквивалентности и анализируемые характеристики не гарантируют надежности данных безопасности ГМИ, так как сложно (или даже невозможно) выявить незаданное действие рекомбинантных генов или кодируемых ими белков лишь аналитическими методами, без специальных лабораторных исследований. Для оценки безопасности любого нового ГМИ необходимо проведение полного комплекса исследований, знание которых подтверждено теоретически и экспериментально.

В последние годы особое внимание исследователей привлекает проблема идентификации ГМИ среди новых продуктов, полученных с использованием методов генной биотехнологии.

Что же должен содержать пищевой продукт или компонент, чтобы было основание причислить его к ГМИ и подвергнуть соответствующим испытаниям на безопасность? Ряд экспертов предлагают ориентироваться на содержание в новом продукте рекомбинантной ДНК и (или) детерминированного ею белка. При отсутствии ДНК или протеина в силу особенностей композиционного состава либо разрушения этих веществ в технологическом процессе, а также при малых их количествах в конечном продукте, сравнимых с погрешностью используемых методик, предлагается не подвергать ГМИ оценке на безопасность. К таким (не содержащим ДНК и белок) продуктам относят пищевые и ароматические добавки, рафинированные масла, модифицированные крахмалы, мальтодекстрины, сиропы глюкозы, декстрозы, изоглюкозы и др. Очевидно, что для оценки качества именно этих продуктов может быть рекомендована методика композиционной эквивалентности.

Аналитические и экспериментальные исследования указывают на возможные нежелательные последствия генно-инженерной биотехнологии: аллергенные, токсические и антиалиментарные проявления, а также влияние на технологические и внешние потребительские свойства готового продукта на основе ГМИ. Первопричина таких последствий — рекомбинантная ДНК и возможность на ее основе экспрессии новых, не присущих данному виду растениеводческой продукции белков. Именно новые белки могут самостоятельно проявлять или индуцировать аллергенные свойства и токсичность ГМИ. Однако подавляющее большинство новых ГМИ не обладают аллергенностью и токсичностью.

Нежелательным эффектом ГМИ является возможность трансформации переносимого генетического материала. При этом могут отмечаться проявления нескольких генетических элементов: генов-промоторов, сигнальных пептидных генов, структурных генов и терминаторов, которые комплексно используются в генно-инженерной практике.

Нет единого мнения о целесообразности и безопасности применения так называемых маркерных генов. По замыслу биотехнологов, они необходимы для точной идентификации переносимого структурного гена и представляют собой бактериальные гены резистентности к известным антибиотикам (канамицин, стрептомицин).

Большинство авторов едины в оценке безопасности маркерных генов для человека и считают, что их количества, высвобождаемые в желудочно-кишечном тракте, ничтожно малы (0,33-1 пг) по сравнению с общей массой разнообразных эукариотических ДНК (200-500 мг) в

кишечнике и в силу этого они не способны отрицательно повлиять на здоровье человека. Установлено, что маркерные гены не обладают прямой токсичностью, не участвуют в горизонтальном переносе генетического материала, не оказывают многочисленных побочных эффектов, а кодируемый ими белок не проявляет аллергенных и токсических свойств и не влияет на клеточные обменные процессы.

С 1 июля 1999 г. на территории Российской Федерации введен в действие особый комплексный порядок оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из ГМИ, предусматривающий обязательную государственную регистрацию пищевых продуктов и продовольственного сырья, а также компонентов для их производства, полученных из ГМИ. Отдельные направления экспертизы ГМИ пищи распределяются между ведущими научными учреждениями страны.

Медико-биологическое направление закреплено за Институтом питания РАМН. Проводимые здесь клинические испытания пищевой продукции, полученной из ГМИ, оценивают:

- ее химический состав, показатели качества и безопасности;
- биологическую ценность и усвояемость (в экспериментах на лабораторных животных);
- токсикологические характеристики (в экспериментах на лабораторных животных — срок не менее 5-6 мес.);
- аллергенные свойства;
- мутагенное действие;
- иммуномоделирующие свойства.

Медико-генетическая экспертиза проводится Центром «Биоинженерия» РАН. На данном этапе комплексной оценки трансгенной пищевой продукции дается характеристика вносимой последовательности генов, регуляторных последовательностей генов, оцениваются эффекты выражения других генов, стабильность ГМИ, влияние ГМИ на окружающую среду.

Задача технологической экспертизы (проводится Московским государственным университетом прикладной биотехнологии) — оценить потребительские свойства (в том числе органолептические), а также функционально-технологические параметры продукции из ГМИ.

Предлагаемая методика комплексной оценки безопасности ГМИ испытана на генетически модифицированной сое линии 40-3-2 («Monsanto Co», США).

Объем и программа экспериментов по оценке безопасности ГМИ определяются результатами экспертизы сопроводительных документов, включающих разрешение на торговый оборот и использование в питании населения в стране-производителе, официальные данные об отсутствии отрицательного воздействия на здоровье человека и окружающую среду, результаты исследований химического состава.

Метод композиционной эквивалентности необходимо использовать в качестве первого этапа оценки безопасности ГМИ независимо от полученных результатов сравнения. Разработана технология оценки безопасности ГМИ, которая включает в качестве важнейшего анализируемого компонента неспецифические характеристики основных обменных и защитно-адаптационных клеточных механизмов, а также устанавливает сроки экспериментального наблюдения за животными не менее 5-6 мес.

В число основных метаболических показателей, требующих обязательного изучения в рамках гигиенической экспертизы, необходимо включать: активность ряда ферментов, позволяющих оценить общее органоспецифическое действие ГМИ; общую и неседиментируемую активность ферментов лизосом, отражающую состояние структур мембран клетки; активность ферментов микросомального окисления и других ферментов метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной ферментной системы, определяющих функциональное состояние основных клеточных защитно-адаптационных механизмов.

При оценке ГМИ важны параметры, отражающие характер адаптации организма к внешним условиям. Важность обусловлена высокой неспецифической чувствительностью анализируемых систем к любому ксенобиотическому воздействию. При этом индукция ферментов может служить критерием воздействия на организм фактора (его роль в данном случае играет ГМИ). Отсутствие достоверной динамики изученных систем может рассматриваться как косвенное подтверждение полной эквивалентности генетически модифицированной пищи ее традиционному аналогу.

В России вся пищевая продукция, полученная из ГМИ, проходит обязательную регистрацию и санитарно-эпидемиологическую экспертизу согласно МУК 2.3.2.970-00 «Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников»; для идентификации ГМИ используется метод ПЦР, позволяющий определить количество ГМИ в пищевом продукте, даже если его содержание не превышает 0,9 % (рис. 2.3-2.4).

Метод полимеразной цепной реакции, за разработку которого в 1993 г. была вручена Нобелевская премия, предложен в 1983 г. Кэри Мюллісом (фирма «Cetus», США). В настоящее время ПЦР-технологии широко используются как в научных исследованиях, так и при проведении лабораторной диагностики в здравоохранении, системах санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора (генотипирование, диагностика инфекционных заболеваний, определение генетически модифицированных организмов, идентификация видовой принадлежности мяса и ингредиентов мясных продуктов и т. д.).

В основе метода ПЦР как инструмента лабораторной диагностики лежит обнаружение небольшого фрагмента ДНК, специфичного для определяемого организма, с использованием полимеразной цепной реакции для накопления искомого фрагмента.

Такой подход соответствует современным рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). В 2003 г. метод ПЦР утвержден и введен в действие национальными стандартами России: ГОСТ Р 52173-2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения»; ГОСТ Р 52174-2003 «Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа». Методы, приведенные в указанных ГОСТах, позволяют проводить качественный анализ, то есть выявлять присутствие или отсутствие в анализируемых продуктах компонентов из ГМИ.

Третьим нормативным документом, включающим описание методов контроля за содержанием в продуктах компонентов из ГМИ, являются Методические указания МУК 4.2.1913-04 «Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в продуктах питания». Методы, описанные в МУК 4.2.1913-04, позволяют не только проводить качественное определение ГМИ, но и при получении положительного результата определять количество конкретного ГМИ (в процентах), который был использован при производстве исследуемого продукта.

В настоящее время в мире уже создано и разрешено для реализации более 100 сортов генетически модифицированных сельскохозяйственных культур. Производимые с их использованием пищевые продукты широко представлены на мировом продовольственном рынке, и эта положительная тенденция продолжает увеличиваться, основываясь на фундаментальных и прикладных научных исследованиях в области биотехнологии и гигиены питания. По результатам комплексной экспертизы допущены к использованию в качестве продовольственного сырья следующие генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры:

- соя линии 40-3-2, устойчивая к гербициду «глифосат» (торговое название «Roundup»), производства фирмы «Monsanto Co» (США);
- картофель сортов «Рассет Бурбанк Ньюлив» и «Супериор Ньюлив», устойчивые к колорадскому жуку, производства фирмы «Monsanto Co»;
- кукуруза линии GA 21, устойчивая к гербициду «глифосат», производства фирмы «Monsanto Co», линии MON 810, устойчивая к стеблевому мотыльку, производства фирмы «Monsanto Co» и др.

В России и странах ЕС введена обязательная маркировка пищевой продукции, содержащей более 0,9 % компонентов из ГМИ, включая произведенную из ГМИ, но не содержащую ДНК и белок. Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» для пищевых продуктов из ГМИ обязательна следующая информация: «генетически модифицированная продукция», или «продукция, полученная из генетически модифицированных источников», или «продукция содержит компоненты из генетически модифицированных источников» (для пищевых продуктов, содержащих более 0,9 % компонентов ГМИ), — а также информация о государственной регистрации.

Пищевые продукты, полученные из ГМИ и не содержащие ДНК и белок, в дополнительном этикетировании не нуждаются в случае полной эквивалентности пищевой ценности продукта традиционному аналогу. Перечень трансгенных продуктов, подлежащих этикетированию на территории РФ, приведен в приложении 1.

Наряду с медицинскими проблемами, производство ГМИ пищи сопровождается и другими проблемами, в том числе этическими, которые успешно решаются в рамках политики здорового питания.

Законодательное регулирование создания и применения ГМИ. Рассматривая проблему контроля за обеспечением качества и безопасности генетически модифицированной пищи, следует остановиться на формировании законодательных и нормативных актов.

Вопросы создания, правовой охраны и использования селекционных достижений отражены в Законе РФ «О селекционных достижениях» № 5605-1 от 06.08.1993 (закон действует до 31.12.2007). В целях государственного регулирования вопросов, связанных с охраной прав на селекционные достижения, Постановлением Правительства РФ № 390 от 23.04.1994 образована Государственная комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений. Комиссия осуществляет прием заявок на селекционные достижения, проводит по ним экспертизу и испытания, ведет Государственный реестр охраняемых селекционных достижений и Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, а также выдает патенты и авторские свидетельства.

Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» № 86-ФЗ от 05.07.1996 регулирует отношения в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности, возникающие при осуществлении генно-инженерной деятельности. Одной из основных задач государственного регулирования является определение механизма, обеспечивающего безопасность граждан и окружающей среды в процессе осуществления генно-инженерной деятельности и использования ее результатов. Закон обязывает предоставлять полную информацию о

методах получения и свойствах продукта, содержащего результаты генно-инженерной деятельности. В соответствии со ст. 11 закона «продукция (услуга), полученная с применением методов генно-инженерной деятельности, должна соответствовать требованиям экологической безопасности, санитарных норм, фармакопейных статей, обязательным требованиям государственных стандартов Российской Федерации».

В 1997 г. в России создана Межведомственная комиссия по проблемам генно-инженерной деятельности (МВКГИД), которая регулирует вопросы получения, биологических испытаний, а также полевых испытаний трансгенных растений. Полный цикл проведения испытаний новых сортов трансгенных сельскохозяйственных культур предусматривает:

- Контролируемый выпуск, в том числе испытания на безопасность. Данный этап предусматривает подачу заявки в МВКГИД, проведение экспертизы и оценку риска в комиссиях по генной инженерии предприятий, проведение испытаний на опытных участках, сертификацию участков в МВКГИД.

- Запланированный выпуск, в том числе сортоиспытания. Проводится после завершения контролируемого выпуска, государственной экологической экспертизы предполагаемых испытаний и временной регистрации трансгенной культуры в МВКГИД.

- Широкомасштабный выпуск или коммерческое выращивание трансгенных культур. Осуществляется после проведения: гигиенической экспертизы и регистрации пищевой продукции, полученной из ГМИ, в соответствии с положением, утвержденным постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 14 от 08.11.2000, и внесения ее в Государственный реестр зарегистрированной продукции, который ведется в Минздраве России; экологической экспертизы материалов запланированного выпуска Государственным комитетом по экологии России; экспертизы и положительного заключения Государственной комиссии по охране и испытаниям селекционных достижений и внесения в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ.

- Повторный (контролируемый, запланированный, широкомасштабный) выпуск — выпуск при наличии выданных ранее соответствующих разрешений и рекомендаций.

Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ «О нанесении информации на потребительскую упаковку пищевых продуктов, полученных на основе генетически модифицированных источников» № 13 от 08.11.2000 создана система проверки безопасности и установлен порядок государственной регистрации пищевой продукции из ГМИ, предусматривающий проведение комплексных исследований с медико-генетической, медико-биологической и технологической

оценкой. При ввозе из-за рубежа пищевой продукции, полученной из ГМИ, проводится проверка товарно-сопроводительной документации, включая наличие свидетельства о государственной регистрации, выданного в установленном порядке Минздравсоцразвития РФ. При отсутствии этого документа принимается решение о запрещении ввоза продукции, а при его наличии изучается санитарное состояние партии продукта и отбираются образцы для лабораторных исследований.

Постановлениями Главного государственного санитарного врача РФ «О порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников» № 14 от 08.11.2000 и «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» № 149 от 16.09.2003 введены положения о порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевых продуктов, полученных из ГМО, и санитарно-эпидемиологической, микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов. Постановлением № 14 от 08.11.2000 также предусмотрены организация и ведение Реестра Минздрава России, куда заносятся сведения о зарегистрированной пищевой продукции из ГМИ.

К настоящему времени Минздравом России подготовлена необходимая нормативно-методическая база по оценке качества и безопасности для здоровья населения новых видов продовольственного сырья и пищевых продуктов из ГМИ, а также идентификации специфических белков и ДНК. С этой целью утверждены Методические указания «Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» (МУК 2.3.2.970-00).

На основании Постановления Правительства РФ «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий» № 988 от 21.12.2000 Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека осуществляет государственную регистрацию пищевых продуктов, содержащих ГМИ.

Особое место в рассматриваемой проблеме занимает маркировка генетически модифицированной продукции. Подходы к данному вопросу Российской Федерации базируются на национальном законодательстве и учитывают нормативную базу ЕС и других стран. Вопросы маркировки и этикетирования пищевых продуктов отражены в ряде законодательных и нормативных актов России.

Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» № 86-ФЗ от 05.07.1996 среди основных принципов генно-инженерной деятельности выделяет сертификацию продукции, которая должна содержать результаты генно-инженерной

деятельности, с указанием полной информации о методах получения и свойствах продукта. Таким образом, с учетом действующего законодательства в области защиты прав потребителей, впервые введены требования об обязательности информирования потребителя о методах получения и свойствах пищевых продуктов из генетически модифицированных источников.

В соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О нанесении информации на потребительскую упаковку пищевых продуктов, полученных на основе генетически модифицированных источников» № 13 от 08.11.2000, юридическим и физическим лицам, осуществляющим закупку, поставку, производство и реализацию пищевых продуктов, полученных из ГМИ, рекомендовано обеспечить нанесение необходимой информации на потребительскую упаковку пищевых продуктов.

Данным постановлением создана система проверки безопасности и установлен порядок государственной регистрации пищевой продукции из ГМИ, предусматривающий проведение комплексных исследований с медико-генетической, медико-биологической и технологической оценкой. При ввозе из-за рубежа пищевой продукции, полученной из ГМИ, проводится проверка товарно-сопроводительной документации, включая наличие свидетельства о государственной регистрации, выданного в установленном порядке Минздравсоцразвития РФ. При отсутствии этого документа принимается решение о запрещении ввоза продукции, а при его наличии изучается санитарное состояние партии продукта и отбираются образцы для лабораторных исследований.

В приложении к СанПиН 2.3.2.1078-01 приведен перечень трансгенных продуктов, разрешенных к применению на территории РФ.

Государственный стандарт РФ «Продукты пищевые. Информация для потребителя. Общие требования» (ГОСТ Р 51074-03) устанавливает общие требования к маркировке пищевых продуктов, а также отдельных их видов.

В связи с потребностью России в тестировании генетически модифицированных продуктов необходимо дальнейшее динамическое развитие нормативного обеспечения в данной области, способного реагировать на меняющуюся ситуацию. Приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 322 от 20.09.2006 создан научно-методический Центр по изучению и идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов на базе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора.

Центр создан с целью повышения эффективности надзора за безопасностью и качеством продукции, полученной с использованием генно-инженерно-модифицированных организмов животного, растительного и микробиологического происхождения. Важнейшие

функции Центра — разработка и совершенствование нормативной и методической базы в сфере контроля за генно-инженерно-модифицированными организмами, ее гармонизация с международными и национальными нормативными документами в области оборота ГМИ; проведение заказных исследований по выявлению генно-инженерно-модифицированных организмов и оценке их влияния на организм животного и человека и т. д.

На 01.12.2006 в России прошли полный цикл всех необходимых исследований и разрешены для использования в пищевой промышленности и реализации населению: 14 видов пищевой продукции растительного происхождения, полученных с применением трансгенных технологий (3 сорта сои, 6 сортов кукурузы, 3 сорта картофеля, 1 сорт сахарной свеклы и 1 сорт риса); 5 видов генетически модифицированных микроорганизмов. Система оценки безопасности пищевых продуктов, полученных из ГМО, включает проведение пострегистрационного мониторинга за ее оборотом, для осуществления которого разработаны методы идентификации ГМО в пищевых продуктах.

В системе Роспотребнадзора в субъектах РФ имеется лабораторная база по исследованию пищевых продуктов на наличие ГМО. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ «Об усилении надзора за пищевыми продуктами, полученными из генетически модифицированных источников» № 13 от 31.12.2004 определены головные центры по количественному исследованию пищевых продуктов на наличие ГМО в каждом Федеральном округе России.

При осуществлении надзора отмечается, что более 50 % исследованных пищевых продуктов, содержащих ГМО, не имеют информации о наличии в них компонентов, полученных с применением ГМО.

Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ «Об усилении надзора за производством и оборотом пищевых продуктов» № 28 от 29.08.2006 определено, что надзор за продовольственным сырьем и пищевыми продуктами, оснащение учреждений Роспотребнадзора аналитическим оборудованием в целях использования современных методов анализа качественного и количественного состава ГМО является одним из основных направлений деятельности.

С целью усиления госсанэпиднадзора за пищевыми продуктами и в соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30.03.1999 постановлением Главного государственного санитарного врача РФ «О надзоре за пищевыми продуктами, содержащими ГМО» № 32 от 08.12.2006 определено, в частности:

«1. Юридическим лицам и индивидуальным предпринимателям, занимающимся производством и оборотом пищевых продуктов,

соблюдать требования законодательства Российской Федерации в части информирования населения о наличии в продуктах питания компонентов, полученных с применением ГМО.

2. Управления Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации и по железнодорожному транспорту:

2.1. Считать осуществление надзора за пищевыми продуктами, полученными из ГМО, приоритетным направлением деятельности на 2007 год;

2.2. Пресекать факты нарушения законодательства Российской Федерации, а также применять предусмотренные законодательством Российской Федерации меры ограничительного, предупредительного и профилактического характера, направленные на недопущение и (или) ликвидацию последствий нарушений юридическими лицами и индивидуальными предпринимателями обязательных требований по информированию населения о наличии в продуктах питания компонентов, полученных с применением ГМО;

2.3. Усилить надзор за ввозом на территорию Российской Федерации пищевых продуктов, содержащих компоненты, полученные с применением ГМО;

2.4. Проводить разъяснительную работу среди населения, в том числе через средства массовой информации, по вопросам безопасности пищевых продуктов, полученных из ГМО, и прав потребителей на получение полной и достоверной информации о технологии изготовления указанных пищевых продуктов.

3. Федеральному агентству по печати и массовым коммуникациям рекомендовать оказывать содействие органам Роспотребнадзора в информировании населения через средства массовой информации о безопасности пищевых продуктов, полученных из ГМО, и прав потребителей на получение полной и достоверной информации о технологии изготовления указанных пищевых продуктов.

4. ФГУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации:

4.1. Принять меры по дооснащению лабораторных подразделений аналитическим оборудованием по исследованию количественного состава ГМО».

Таким образом, в России в настоящее время сформирована достаточная законодательная база, на основе которой разработана и осуществляется система государственного санитарно-эпидемиологического надзора за пищевыми продуктами из ГМИ.

Раздел 4. Молекулярно-генетический мониторинг биотехнологических процессов

В настоящее время для обнаружения и идентификации микроорганизмов разработан ряд технологий и коммерческих

приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты, входящие в состав микроорганизмов. Различные методы обнаружения и идентификации микроорганизмов активно разрабатываются в течение многих лет. Эти методы можно разделить на три группы:

- классические методы идентификации микроорганизмов;
- методы ПЦР;
- высокопроизводительное секвенирование.

Среди методов идентификации биологических образцов микроорганизмов наибольшее распространение получили методы, основанные на анализе структуры ДНК. Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе ПЦР. В методе ПЦР маркером жизнеспособности бактерий служит недолго живущий ген – специфичная мРНК, с помощью которой можно выделить патогенные бактерии. Молекулярно-генетические методы метагеномного анализа состава бактериального сообщества позволяют выявлять микроорганизмы в пищевых продуктах без предварительного культивирования и без выделения видоспецифических фрагментов по суммарной ДНК и амплификации генов, кодирующих рРНК. Секвенирование следующего поколения (NGS) в совокупности описывает несколько технологий, которые обеспечивают массовое параллельное секвенирование гетерогенных фрагментов ДНК. Данный метод применим к мониторингу микробного сообщества, который заключается в амплифицировании коротких фрагментов ДНК с использованием универсальных PCR-праймеров, нацеленных на известные маркерные гены, преимущественно прокариотические 16S rRNA и грибковые ITS гены.

Традиционный метод микробиологического мониторинга сообщества микроорганизмов включает в себя выделение и культивирование микробиоты. В рамках данного направления осуществляются следующие методики: стандартный подсчёт колоний (КОЕ), микроскопический подсчёт колоний, посев на скошенный агар. Известен быстрый (15–30 мин) способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей, основанный на методах окраски с последующим микроскопированием. Способ включает следующие операции: приготовление фиксированного мазка исследуемого образца, окрашивание препарата, промывание водопроводной водой, подсушивание и микроскопирование с иммерсионной системой. О принадлежности микроорганизмов к бактериям, грибам или дрожжам судят по морфологическим особенностям окрашенного препарата. Большинство микроорганизмов существует в окружающей среде в виде микробиологических сообществ (биопленок), образуемых на биотических и абиотических поверхностях. В составе этих сообществ обнаружены и некультивируемые формы членов сообщества. То, что

бактериологическими методами не удастся выделить индикаторные или патогенные бактерии в сырье и продуктах животного происхождения может объясняться переходом их в покоящееся состояние. Выделение таких покоящихся форм без культивирования на питательных средах возможно различными методами, например, прямого подсчета жизнеспособных клеток в комбинации с добавлением специфических моноклональных антител (МА); методами люминометрии для тестирования естественно люминесцентных бактерий (*Pseudomonas fluorescens* и др.) и бактерий, получивших гены, кодирующие комплекс ферментов люцеферин-люцеферазы, генноинженерным способом; методами жидкостной флуориметрии, позволяющими определять общее число микробных клеток, в том числе погибших, живых и некультивируемых, но жизнеспособных клеток (такой метод требует оборудование, реактивов-красителей и специальных компьютерных программ).

Химические методы. Метод основан на качественном и количественном определении выделяемых метаболитами микроорганизмов в питательную среду, которые подвергаются специфическим химическим реакциям. К химическим методам в микробиологии относят определение термостабильной нуклеазы, измерение количества АТФ, радиометрию, флуорогенные и хромогенные субстраты. Присутствие *Salmonella aureus* в продуктах можно выявить, подвергнув продукт анализу на предмет присутствия термостабильной нуклеазы.

Радиометрия. Метод основан на включении в бактериальный метаболизм органики, содержащей радиоактивный углерод-14. Впервые радиометрия была применена для определения бактерий Levin и используется в клинической микробиологии, однако, в некоторых случаях она применима и для контроля качества продуктов и питьевой воды. Серотипирование является наиболее распространённым методом для определения присутствия грамотрицательных бактерий, таких как *Salmonella* и *Escherichia*.

Радиоиммунологический анализ. Метод заключается в радиоактивном мечении антигенов, которые затем взаимодействуют с антителами. В широком смысле иммунохроматографическая аналитическая система обозначает продольное или поперечное стекание культуральной жидкости по пластине-носителю, содержащей антитела, с прохождением иммунохимической реакции. Разработка иммунографических систем для обеспечения безопасности пищевой продукции и повышения контроля качества открывает новые направления исследований. Метод позволяет проводить количественный учет как микроорганизмов – контаминантов, так и необходимых для технологического процесса микроорганизмов. Все вышеперечисленные методы часто трудоемки и длительны, а идентификация за пределами

родового уровня часто затруднена. К примеру, они позволяют выявить сальмонеллы и листерии в продуктах питания в течение четырех-пяти дней, биохимическая и серологическая идентификации дополнительно занимают два-три дня.

В случае с методами, основанными на ПЦР, высокая чувствительность может быть их слабым местом вследствие возможной контаминации образца и получения ложноположительного результата из-за ингибирования работы полимеразы различными веществами, включая гуминовые кислоты и гем. Другим важным требованием к диагностическим методам является их воспроизводимость. На этот параметр может влиять целый ряд факторов, таких как стабильность реагентов и различия в условиях анализа. Таким образом, использование ПЦР имеют целый ряд очевидных преимуществ перед традиционными методами исследования идентификационных генетических маркеров:

- более высокая информативность;
- возможность проводить в едином комплексе исследование значительного числа генетических маркеров, в том числе различных по их экспертной функции, что методически удобно и обеспечивает экономное расходование экспертного материала и максимальную сопоставимость результатов исследования;
- применение праймеров, специфичных для ДНК микроорганизмов, позволяет избежать актуальной для иммунологических методов проблемы ложноположительных результатов вследствие загрязнения;
- вещества, содержащиеся в предмете-носителе, в ряде случаев могут приводить к отрицательному результату типирования за счет ингибирования ПЦР. Однако в иммунологических методах влияние предметаносителя может создавать риск получения ложноположительного результата, что более опасно;
- результаты ДНК-анализа наглядны; легко документируются, что позволяет сохранить и предоставить первичные материалы. Это обеспечивает высокую достоверность данных, а, следовательно, повышает ценность экспертного заключения;
- метод ПЦР хорошо поддается автоматизации, тем самым обеспечивается высокая пропускная способность метода, стандартность выполнения процедуры, сведение к минимуму риска ошибок за счет субъективного фактора.

Развитие современных технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК микробных сообществ. Секвенирование следующего поколения (NGS) в совокупности описывает несколько технологий, которые обеспечивают массовое параллельное секвенирование гетерогенных фрагментов ДНК. Данный метод применим к мониторингу микробного сообщества, который заключается в амплифицировании коротких фрагментов ДНК с использованием универсальных PCR-праймеров, нацеленных на известные маркерные

гены, преимущественно прокариотические 16S rRNA и грибковые ITS гены. Общий принцип методов секвенирования нового поколения, основанных на предварительной амплификации матриц, приблизительно одинаков независимо от реагентно-аппаратной базы. Он включает: стадию получения библиотек, заключающуюся в получении небольших фрагментов ДНК и введении в их состав адаптерных нуклеотидных последовательностей для закрепления на носителе и отжига специфических праймеров для секвенирования; стадию иммобилизации полученных фрагментных библиотек на микросферах или поверхности проточной ячейки с последующей амплификацией с помощью эмульсионной или мостиковой PCR соответственно; стадию гибридизации специфических праймеров с адаптерными участками и непосредственно секвенирования. Наиболее распространенным вариантом является секвенирование путем синтеза с использованием обратимо терминированных флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов. Однако в настоящий момент все больше исследователей признают перспективность нанопорового секвенирования для метагеномных исследований, секвенирования небольших геномов, идентификации вирусных и бактериальных инфекционных агентов. Современные методы секвенирования ДНК также можно условно разделить на три основных вида: классические – секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование; новые («второго» поколения – Next Generation Sequencing – NGS) – проводят одновременно секвенирование миллионов фрагментов ДНК, каждый из которых представлен кластером из многих тысяч или сотен тысяч своих клонов – это высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое лигазное и полупроводниковое секвенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых предшественников; новейшие («третьего» поколения – Next-Next Generation Sequencing – NNGS) методы секвенирования, которые считывают информацию с миллионов единичных фрагментов ДНК без их предварительного клонирования.

Современные стратегии идентификации патогенов с использованием NGS. Основными группами патогенов, представляющих наибольшую опасность для человека, являются бактерии и вирусы. Другие патогены, такие как грибы или протисты, не менее опасны, однако, обычно не требуют генетического анализа для идентификации. На сегодняшний день основным приемом, позволяющим охарактеризовать разнообразие микроорганизмов в пробе, является метагеномный анализ. Подобный анализ стал возможным благодаря разработке методов высокопроизводительного секвенирования. Существующие методы NGS идеально подходят для анализа, идентификации и расшифровки генома выделенных в чистую культуру прокариотических организмов и открывают новые возможности в

области идентификации неизвестных патогенов в смеси микроорганизмов. Использование секвенирования по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар нуклеотидов и применяется для небольших фрагментов генома/генов. Оно используется для: 1. секвенирования отдельных участков генома с целью анализа мутаций и полиморфизмов; 2. идентификации вирусов и организмов (бактерий, растений, грибов и животных); 3. валидации данных, полученных на платформах NGS; 4. микросателлитного анализа; 5. анализа делеций и инсерций (малых и протяженных). Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией Thermo Fisher Scientific: 3730xL, 3730, 3500xL, 3500, 3130xL, 3130, 310. Следует отметить, что все описанные выше типы исследований сейчас можно проводить с помощью NGS, однако, главные плюсы секвенирования по Сэнгеру – высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов – сохраняют актуальность этого типа определения последовательности нуклеиновых кислот. Появление NGS впервые позволило значительно ускорить и удешевить определение полной последовательности миллионов геномов организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком.

Метод дробовика. Метод прекращения цепочки секвенирования ДНК может использоваться только для довольно коротких нитей от 100 до 1000 пар оснований. Более длинные последовательности фрагментируются на более мелкие фрагменты, которые могут быть секвенированы отдельно, а затем они повторно собираются для получения общей последовательности. Для этого используются два основных метода: праймер-опосредованная прогулка (или «прогулка по хромосоме»), при которой праймер продвигается вперед по всей цепочке «шаг за шагом». Метод дробовика заключается в том, что ДНК разбивается случайным образом на многочисленные мелкие фрагменты, которые секвенируются с использованием метода обрыва цепи. Исходную последовательность восстанавливают при помощи компьютерного анализа перекрывающихся ридов.

Метод с использованием FPP. Он был разработан итальянскими учеными на базе лаборатории пробиогеномики Пармского университета. Они разработали новый метод обнаружения возбудителей болезней пищевого происхождения, основанный на параллельном секвенировании множественных ампликонов, подход, который разительно отличается от метода микробиологического профилирования на основе 16S rRNA, поскольку последний опирается на секвенирование одного гена. Этот новый подход к обнаружению возбудителей болезней пищевого происхождения основан на комплекте праймеров под названием «панель пищевых патогенов» (FPP), которая генерирует специфические ампликоны, предназначенные для секвенирования на платформе Illumina.

Подход FPP предназначен для отслеживания возбудителей болезней пищевого происхождения в естественно загрязненных пищевых образцах.

Метод ddPCR. Метод ddPCR представляет собой биотехнологическое усовершенствование обычных методов полимеразной цепной реакции, которые могут быть использованы для непосредственного количественного определения и клонирования амплификации нитей нуклеиновых кислот, включая ДНК, кДНК или РНК. Ключевое различие между ddPCR и традиционной PCR заключается в способе измерения количества нуклеиновых кислот. ddPCR также выполняет одну реакцию в пробе, однако, образец разделяют на большое количество частей и реакцию проводят в каждой части индивидуально. На данный момент этот метод был применен для анализа генетически модифицированных организмов в кормах для животных, обнаружения и количественного определения патогенных бактерий, таких как *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* и *Listeria monocytogenes* в окружающей среде, мониторинга динамики микробных популяций в почвах с различным уровнем популяций.

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу – нормируется масса продукта, в котором не допускаются бактерии группы кишечных палочек, большинство условнопатогенных микроорганизмов, а также патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*. В других случаях норматив отражает количество колониеобразующих единиц в 1 см (г) продукта (КОЕ/см (г)). ГОСТы, нормирующие микробиологические показатели молочной и масложировой продукции: – ГОСТ 31450-2013 «Молоко питьевое. Технические условия». Настоящий стандарт распространяется на упакованную в потребительскую тару сметану, изготавливаемую из сливок коровьего молока с добавлением молочных продуктов или без их добавления, и предназначенную для непосредственного использования в пищу. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для дрожжей и плесеней – по ГОСТ 10444.12 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бактерий рода *Salmonella* – по ГОСТ 30519 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для молочнокислых микроорганизмов – по ГОСТ 10444.11 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт. – ГОСТ 31453-2013 «Творог. Технические условия».

Определение микробиологических показателей регламентируется теми же нормативными документами, что и ГОСТ 31452- 2012 и ГОСТ 31981-2013 (см. выше). – ГОСТ Р 52686-2006 «Сыры. Общие технические условия».

Темы контрольных работ

по дисциплине – Молекулярно-генетические методы в биотехнологии:

1. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для выявления и идентификации возбудителей инфекционных болезней животных вирусной этиологии, обеспечивающих устойчивое ветеринарное благополучие и получение продукции животноводства высокого санитарного качества.

2. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для выявления и идентификации возбудителей инфекционных болезней животных бактериальной этиологии, обеспечивающих устойчивое ветеринарное благополучие и получение продукции животноводства высокого санитарного качества.

3. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК в составе кормов, сырья на всех этапах его переработки, транспортировки, хранения.

4. Экспресс-метод определения сырьевого состава для ускоренной идентификации видоспецифичной ДНК полуфабрикатов, готовых продуктов питания методом полимеразной цепной реакции.

5. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для проведения идентификации и количественного определения каждого компонента.

6. Тест-системы для определения генетически модифицированных организмов (ГМО) в сырье, кормах, пищевой продукции и оценки их безопасности.

7. Тест–системы с использованием молекулярно-генетических методов для исключения фальсификации нерецептурными компонентами растительного и животного происхождения

8. Способы детекции продуктов LAMP/RT-LAMP

9. Преимущества LAMP/RT-LAMP перед ПЦР для молекулярной диагностики

10. Постгеномные технологии.

11. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК и РНК.

12. Методы конструирования продуцентов биологически активных веществ: селекция, метод рекомбинантных ДНК, гибридная технология.

13. ДНК-маркеры в изучении пород сельскохозяйственных животных.

14. ДНК-маркеры в изучении пород крупного рогатого скота.
15. ПЦР - имитация естественной репликации ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК\РНК в исследуемом образце.
16. Использование ПЦР для паспортизации животных, диагностики инфекционных, генетических заболеваний, видовой идентификации, диагностики патогенов в пище и генетически модифицированных продуктов.
17. Использование ПЦР для паспортизации животных и видовой идентификации,.
18. Использование ПЦР для диагностики инфекционных, генетических заболеваний.,
19. Использование ПЦР для диагностики патогенов в пище и генетически модифицированных продуктов.
20. Молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенов.
21. Технологии биочипов ДНК-микрочипы в биотехнологии
22. Преимущества и недостатки генетически модифицированных продуктов;
23. Оценка показателей качества и безопасности ГМ продукции.
24. Технический регламент Таможенного союза в отношении ГМ продукции
25. Методы оценки токсичности и мутагенности генетически модифицированной продукции.
26. Изучение аллелergenных и иммуногенных свойств ГМ пищевых продуктов,
27. Влияние генетически модифицированных растений и животных на окружающую среду,

Критерии оценки:

- оценка «отлично» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 90-100%;
- оценка «хорошо» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 80-90%;
- оценка «удовлетворительно» выставляется магистранту, если он раскрывает тему на 70-80%.

Оформление контрольной работы

Вариант контрольной работы соответствует номеру в списочному составе группы студентов (избирается и выполняется студентом с таким расчетом, чтобы в одной группе темы работ не совпадали).

Работа выполняется в печатном виде, оформляется титульным листом с указанием названия университета, факультета, кафедры, дисциплины и названия темы, а также фамилии и группы студента. Ответ на каждый вопрос темы начинают с новой страницы. Выполнение работы

включает в себя подробный план раскрытия темы и развернутый ответ с соответствующими выводами. В конце работы или после каждого раздела приводится список использованной литературы (8-12 источников), оформленный по ГОСТ Р 79 7.0.5-2008. Список литературы не должен содержать таких источников, как <https://ru.wikipedia.org/>, <https://allbest.ru/>, <https://www.bestreferat.ru/> и т. п. При оформлении текста контрольной работы используется стандартный формат листа А4 (297 × 210 мм) с односторонним заполнением.

Страницы нумеруются арабскими цифрами в центре или в правом нижнем углу.

Титульный лист включается в общую нумерацию, но номер на нем не прописывается.

Рекомендуется использовать текстовый редактор Microsoft Word, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пт, интервал полуторный. Абзацный отступ 4 знака (1,25 см). Поля страницы: левое – 3 см, правое – 1,5, верхнее и нижнее – 2 см.

Общий объем контрольной работы не должен превышать 20-25 страниц печатного текста.

Перед проверкой и защитой контрольная работа должна быть зарегистрирована лаборантами кафедры ветеринарной генетики и биотехнологии.

Список основной литературы

1. Карманова, Е. П. Практикум по генетике: Учебное пособие / Е. П. Карманова, А. Е. Болгов, В.И. Митютько. – Санкт-Петербург: Лань, 2018. – 202 с. - Текст : электронный. - URL: <https://e.lanbook.com/reader/book>

2. Сапронова, Ж. А. Биотехнологические процессы в промышленности и АПК : учебное пособие / Ж. А. Сапронова. — Белгород : БГТУ им. В.Г. Шухова, 2020. — 79 с. — Текст : электронный // Лань : э

л
е

Список дополнительной литературы

1. Шокина, Ю.В. Разработка инновационной продукции пищевой биотехнологии. Практикум : учебное пособие / Ю.В. Шокина. — Санкт-Петербург : Лань, 2019. — 116 с. — Текст : электронный. — URL: <https://e.lanbook.com/book>

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

1. Официальный сайт Минсельхоза России <http://www.mcx.ru/>
2. Аграрная российская информационная система <http://aris.ru/>
3. Единый сервисный портал Минсельхоза России <http://service.mcx.ru/Home/RegistersAndRegisters>

л
и
о
т
е
ч

4. Россельхознадзор Российской Федерации
<http://www.fsvps.ru/fsvps>
5. Управление по этическим проблемам в биотехнологических исследованиях <http://www.hhs.gov/ohrp/>
6. Московский государственный университет прикладной биотехнологии (МГУПБ) <http://msaab.n4.biz/>
7. Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко <http://viev.ru/>
8. Комитет государственной Думы по охране здоровья <http://www.komitet2-2.km.duma.gov.ru>
9. Федеральная служба по надзору и сфере защит прав потребителей и благополучия человека <http://rospotrebnadzor.ru>
10. Электронно-библиотечная система НГАУ
<http://nsau.edu.ru/library/ecatalogue/>
11. Электронная библиотечная система издательства «Лань»
www.e.lanbook.com
12. Научная электронная библиотека eLibrary.ru www.eLibrary.com
13. Электронно-библиотечная система издательства «Инфра-М»
www.znaniium.com

Тестовые задания для оценки сформированности компетенций
по дисциплине Молекулярно-генетические методы в биотехнологии

ОПК-1

1. К методам экспресс-диагностики относятся: а) бактериологический; б) иммунофлюоресценция; в) биологический; г) ПЦР; д) вирусологический.

Выберите единственную комбинацию, в которой учтены все правильные ответы:

- 1) а, б;
- 2) б, в;
- 3) в, г;
- 4) б, г;
- 5) а, д.

Правильный ответ: 4

2 Какой из перечисленных методов относится к качественным методам диагностики:

- 1) ПЦР в реальном времени
- 2) иммуноферментный анализ
- 3) ОТ-ПЦР в реальном времени
- 4) иммунохроматографический анализ

Правильный ответ: 4

3 Для установления последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах применяют метод:

Правильный ответ: секвенирование

4. По каким параметрам методы секвенирования отличаются друг от друга:

- 1) методы клонирования молекул ДНК
- 2) методы «разрезания» молекул ДНК
- 3) методы «чтения» последовательности нуклеотидов
- 4) все перечисленные

Правильный ответ: методы «чтения» последовательности нуклеотидов

5. Какие способы детекции используют в методах LAMP/ RT-LAMP

- 1) гель-электрофорез
- 2) окраска интеркалирующим красителем
- 3) визуальная детекция
- 4) измерение флуоресценции реакционной смеси
- 5) все перечисленные

Правильный ответ: 5

6. Какой вид(ы) оборудования) используются во всех методах: ПЦР, ИФА, секвенирование

- 1) вошер
- 2) электрофорез
- 3) амплификатор
- 4) капиллярный секвенатор
- 5) фотометр горизонтальный
- 6) автоматические дозаторы

Правильный ответ: 6

7 Выберите из списка компоненты ОТ-ПЦР (несколько вариантов):

- 1) праймеры
- 2) обратная транскриптаза (ревертаза)
- 3) термостабильная ДНК-полимераза
- 4) рестриктазы
- 5) буферный раствор
- 6) агароза

Правильный ответ: 1,2,3,5

8 Выберите из списка компоненты RT-LAMP (несколько вариантов):

- 1) внешние праймеры
- 2) обратная транскриптаза (ревертаза)
- 3) Bst ДНК-полимераза
- 4) внутренние праймеры
- 5) буферный раствор

6) петлевые праймеры

Правильный ответ: 1,2,3,4,5,6

9 Для работы полимеразы в реакционной среде должны присутствовать:

Правильный ответ: ионы магния

10 Прибор, в котором осуществляется ПЦР –

Правильный ответ: амплификатор

11 Укажите описание, какого этапа ПЦР приведено. Начинается в местах присоединения праймеров и протекает в направлении от 5' к 3'-концу нити ДНК, т.е. в противоположных друг другу направлениях. Реакция происходит при температуре около 72°C.

Правильный ответ: 3 этап элонгации

12 Реакция элонгации ДНК начинается:

Правильный ответ: в местах прикрепления праймеров

13 Для выявления результатов амплификации применяют (несколько вариантов):

- 1) антитела
- 2) спектрофотометрию
- 3) гель-электрофорез
- 4) зонд с флуоресцентной меткой

П

р

14 Для контроля специфичности обнаруженного продукта амплификации используют:

Правильный ответ: гибридизационные зонды

л

15 Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов в ПЦР...

- а) добавляется для функционирования ДНК-полимеразы
- б) является «строительным материалом» для ДНК
- в) катализирует реакцию полимеризации
- г) обеспечивает условия реакции

Правильный ответ: 2

т

16 Причинами ложноположительных результатов исследований при использовании МАНК являются (несколько вариантов):

- а) контаминация биологического материала на преаналитическом или аналитическом этапе
- б) контаминация помещений и оборудования лаборатории ампликонами
- в) контаминация реактивов

4) контаминация расходных материалов: наконечников, пробирок и планшетов

Правильный ответ: 1,2,3,4

17 Причинами ложноотрицательных результатов исследований при использовании МАНК являются (несколько вариантов):

- 1) неправильный выбор материала тампона зонда для отбора пробы
- 2) топически неправильный отбор пробы
- 3) неправильный выбор среды для транспортировки или хранения клинического, биологического материала
- 4) несоответствие температурного режима и времени транспортировки или хранения клинического, биологического материала
- 5) нарушение протокола выделения нуклеиновой кислоты
- 6) несоответствие температурного режима и времени транспортировки или хранения выделенной нуклеиновой кислоты
- 7) инаktivация реагентов
- 8) неправильное дозирование реагентов
- 9) неправильные режимы амплификации
- 10) мутации в геноме вируса в местах, соответствующих кДНК, комплементарным праймерам или зонду

Правильный ответ: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10

18 К методам амплификации нуклеиновых кислот относятся:

- 1) ПЦР-PV
- 2) ОТ-ПЦР
- 3) RT-LAMP
- 4) RT-SmartAmp
- 5) секвенирование

Правильный ответ: 1,2,3,4

19 В основе полимеразной цепной реакции лежит процесс:

Правильный ответ: репликации

20. Основным методом лабораторного подтверждения коронавируса является:

Правильный ответ: ПЦР респираторного образца

21 Определение нуклеотидной последовательности генома – это:

Правильный ответ: секвенирование

22 Многократное увеличение копий ДНК получают методом:

Правильный ответ: амплификации нуклеиновых кислот

23 Праймеры – это:

- 1) термостабильные ферменты
- 2) короткие искусственно синтезированные олигонуклеотиды
- 3) «строительный материал» для синтеза второй цепи ДНК
- 4) участок ДНК, который необходимо амплифицировать

Правильный ответ: 2

2

Правильный ответ: амплификация

) Критерии оценки:

Многократное увеличение количества ДНК оценивается магистранту, если он отвечает на 90-100% от общей суммы тестов;

- оценка «хорошо» выставляется аспиранту, если он отвечает на 80-90% от общей суммы тестов;

- оценка «удовлетворительно» выставляется аспиранту, если он отвечает на 70-80% от общей суммы тестов;

- оценка «неудовлетворительно» выставляется аспиранту, если он отвечает менее, чем на 70% от общей суммы тестов.

ПРОМЕЖУТОЧНАЯ АТТЕСТАЦИЯ

Кафедра _ветеринарной генетики и биотехнологии

Вопросы к сдаче зачета

по дисциплине: Молекулярно-генетические методы в биотехнологии

1. Основные методические приёмы, используемые в процессе выделения биомолекул.
2. Методы выделения нуклеиновых кислот.
3. Выделение ДНК и РНК из клеток клеточных линий.
4. Техника проведения электрофореза нуклеиновых кислот.
5. Горизонтальный и вертикальный электрофорез.
6. Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез в полиакриламидном геле.
7. Гибридизационные молекулярно-генетические методы.
8. Метод биочипов. ДНК-чипы.
9. Белковые, клеточные, тканевые чипы.
10. Чипы на основе малых молекул применение в биотехнологии.
11. Общая характеристика метода полимеразной цепной реакции.
12. Виды ДНК-полимераз. dNTP. Праймеры для ПЦР.
13. Методы секвенирования, преимущества и недостатки. Новые и новейшие методы секвенирования.
14. Классические методы секвенирования: секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование.

15. Преимущества, недостатки, ограничения метода ДНК-идентификации видового состава сырья.

16. Методы определения видового происхождения в сырье, подвергавшемся термической обработке.

17. Экспресс-детекция и идентификация фитопатогенов ПЦР в режиме реального времени.

18. Тестовые системы обнаружения фитопатогенов.

19. Актуальные аспекты идентификации микроорганизмов в пищевых субстратах.

20. Молекулярно-генетические методы диагностики особо опасных заболеваний.

21. Генетически модифицированное растительное сырье

22. Генетически модифицированное животное сырье.

23. Продовольственное (пищевое) сырьё, полученного из ГМО микробного происхождения (бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов).

24. Линии ГМО, прошедшие государственную регистрацию.

25. Продукты, содержащие живые генно-модифицированные микроорганизмы

26. Продукты, полученные с использованием генно-модифицированных микроорганизмов

27. Продукты содержащие компоненты, полученные с использованием генно-модифицированных микроорганизмов

28. Молекулярно-генетические методы диагностики. ГМ вставок

29. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ.

30. Генетический контроль за пищевой продукцией из ГМИ.

31. Российская система оценки безопасности пищевых продуктов, содержащих генно-инженерно-модифицированные организм

32. Видовая идентификация на основе анализа ДНК

33. Видоспецифические зонды для идентификации ДНК.

34. Молекулярно-генетический контроль патогенов

35. Молекулярно-генетический мониторинг производственных процессов.

Критерии оценки

Основные критерии оценки знаний по дисциплине: глубина, систематичность, конкретность, осознанность, логичность и четкость изложения, полнота и прочность знаний программного материала.

Глубина - характеризует осознание студентами связей между изучаемыми объектами при решении проблемной ситуации исследовательского характера.

Систематичность - предполагает последовательность и логическое построение всей совокупности знаний по изучаемой дисциплине.

Конкретность - связана с умением конкретизировать задачу, пользуясь обобщенными знаниями.

Осознанность - восприятие знаний в их логической взаимосвязи.

«Зачтено» выставляется обучающемуся,

твердо знающему основной программный материал; грамотно и по существу, излагающему его; владеющему необходимыми навыками и приемами их выполнения; Допускаются неточности формулировок и терминологий, незначительное нарушение последовательности в изложении программного материала.

«Не зачтено» получает обучающийся, который не знает значительной части программного материала, как теоретического, так и практического; допускает в ответе на вопросы грубые ошибки; при изложении материала отсутствуют логические взаимосвязи между понятиями; не отвечает на дополнительные вопросы преподавателя.

Зачтено выставляется если магистр:

- Способен охарактеризовать современное состояние и перспективы развития Молекулярно-генетических исследований в биотехнологии; - активно демонстрирует понимание современных представлений о теоретических основах использования молекулярно-генетических методов в биотехнологии;

- усвоил методологические приемы и особенности выделения нуклеиновых кислот из биопроб различного происхождения;

- освоил возможности использования различных молекулярно-генетических методов в биотехнологии;

- изучил ДНК-диагностику бактериальных и вирусных возбудителей различных инфекционных заболеваний и токсикоинфекций

- использует базовые понятия в области ДНК-диагностики сырья растительного и животного происхождения, в том числе ГМИ

- владеет возможностями молекулярно-генетических методов при проведении видовой идентификации

- знает принципы молекулярно-генетического мониторинга производственных процессов;

- имеет представления о перспективах генетической инженерии в создании ГМИ пищи и производстве пищевых продуктов на их основе;

- понимает сущность обеспечения безопасности пищевой продукции из ГМИ.

Словарь терминов

Азотистые основания - основания входящие в состав нуклеиновых кислот.

Аллель – Одна из двух или большего числа альтернативных форм гена, каждой из которых свойственна уникальная последовательность нуклеотидов. Однако обычно различные аллели данного гена распознают

по их фенотипическому проявлению, а не путем сравнения нуклеотидных последовательностей.

Аллоферменты (аллозимы). Альтернативные формы ферментов, кодируемые различными аллелями одного и того же локуса.

Амбер-кодон - триплет УАГ в РНК, один из трех бессмысленных кодонов, обуславливающих терминацию белкового синтеза.

Амбер-мутация - любое изменение в ДНК, приводящее к появлению амберкодона.

Аминокислоты. Соединения, из которых построены молекулы белков. Всего известно несколько сотен аминокислот, однако в состав белков обычно входит лишь 20 из них .

Амплификация - образование дополнительных копий хромосомных последовательностей, обнаруживаемых в хромосомной или внехромосомной ДНК, увеличение числа копий определённого фрагмента ДНК.

Антикодон - триплет, занимающий определенное и постоянное положение в структуре молекулы тРНК; комплементарно взаимодействует с кодоном (или кодонами) мРНК.

Антитело. Белок, вырабатываемый иммунной системой высших организмов, который специфическим образом связывает молекулы чужеродных веществ (антигены). Синтез антител начинается в ответ на появление в организме антигенов.

Аутосомы – все хромосомы, кроме половых; в диплоидной клетке имеется по две копии каждой аутосомы.

Бактериофаги (фаги) – вирусы, инфицирующие бактерии.

Белок. Полимер, состоящий из одно из одной или нескольких полипептидных субъединиц и обладающий характерной трехмерной структурой, определяемой последовательностью входящих в его состав аминокислотных остатков.

Белок-репрессор – способен связываться с оператором на ДНК или с РНК, предотвращая соответственно транскрипцию или трансляцию.

Бессмысленный кодон – один из трех триплетов, УАГ, УАА, УГА, вызывающих терминацию синтеза белка (УАГ известен как амбер-кодон, УАА – как ochre-кодон, УГА – как opal-кодон).

Биотехнология – комплексная многопрофильная область наукотехнического прогресса, включающая разнообразный микробиологический синтез, генетическую и клеточную инженерию, инженерную энзимологию,- использование знаний условий и последовательности действия белковых ферментов в организме растений, животных и в промышленных реакторах.

Ведущая цепь – цепь ДНК, синтезирующаяся непрерывно в 5¹→3¹ направлении.

Вектор для клонирования – любая плаزمиды или фаг, в которые может быть встроена чужеродная ДНК с целью клонирования.

Вставки (инсерции) – обнаруживаются благодаря присутствию в ДНК дополнительных пар оснований.

Вырожденность генетического кода – соответствие нескольких кодонов одной аминокислоте. Замена в третьем основании кодона не всегда приводит к замене аминокислоты.

Гамета – Зрелая репродуктивная клетка, способная при слиянии с аналогичной клеткой другого пола образовать зиготу и содержащая гаплоидный набор хромосом.

Гаметогенез – процесс развития половых клеток.

Гаплоидный набор хромосом – содержит по одной копии каждой аутосомы и одну половую хромосому; гаплоидное число хромосом (n) является характеристикой гамет.

Гаплотип – совокупность сцепленных генов одной хромосомы, контролирующих аллогруппу.

Гемизиготность – наличие в хромосомном наборе особи только одной аутосомы из пары гомологичных аутосом, одной половой хромосомы (ХО) или пары разных половых хромосом (ХУ).

Гемизиготный ген. Ген, присутствующий в генотипе лишь в одном экземпляре (копии).

Ген - Последовательность нуклеотидов в геноме организма, которой может быть приписана определенная функция, иными словами, ген – это нуклеотидная последовательность, либо кодирующая полипептид, либо определяющая ту или иную транспортную РНК, либо необходимая для правильной транскрипции какого-то другого гена.

Генеративные мутации – мутации, происходящие в половых клетках.

Генетика – наука о наследственности и изменчивости живых организмов.

Генетический код - совокупность кодонов (триплетов), кодирующих аминокислоты.

Генетический полиморфизм - долговременное существование в популяциях двух и более генотипов с частотой (1% и более), превышающих вероятность возникновения повторяющихся мутаций.

Ген-модификатор. Ген, который при взаимодействии с другими генами изменяет их фенотипическое проявление.

Генная инженерия - раздел биотехнологии, связанный с целенаправленным конструированием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке и синтезировать определенный продукт.

Генные (точковые) мутации - изменения в структуре ДНК.

Геном - 1. Полный гаплоидный набор генов или хромосом клетки или организма. 2. Весь генетический материал клетки, организма.

Геномика – раздел молекулярной генетики, изучающий геном, индивидуальные гены на молекулярном уровне, структуру (сиквенс) гена,

его экспрессию и механизм редукции активности, клонирование генов и использование их в генно-инженерных целях

Геномные мутации – мутации, обуславливающие изменения числа хромосом в кариотипе.

Генотип - Вся генетическая информация, содержащаяся в организме; генетическая организация особи в одном или нескольких рассматриваемых локусах (ср. Фенотип); совокупность генов организма.

Генофонд - совокупность аллелей (генов) одной популяции (породы и т.д.), характеризующихся определенной частотой.

Гены-модификаторы - гены, не проявляющие собственного действия, но усиливающие или ослабляющие эффект действия других генов.

Гетерозигота - диплоидный организм, в гомологичных хромосомах которого находятся две разные аллели данного гена (Aa).

Гетерозиготность. Доля особей, гетерозиготных по данному локусу, или доля гетерозиготных локусов в генотипе особи.

Гетерозис - гибридная мощь, превосходство гибридов в отношении какого-то одного или по ряду признаков над обеими родительскими формами; синонимы: гибридная сила и гибридная мощь.

Гетерохроматин - генетически неактивные участки хромосом постоянно находятся в конденсированном состоянии.

Гибридизация - процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих гибрид РНК – ДНК.

Гибридома - клеточный гибрид, получаемый слиянием нормального лимфоцита, продуцирующего антитела, и опухолевой клетки; обладает способностью синтезировать моноклональные антитела.

Гистоны - белки, образующие в комплексе с ДНК нуклеосомы – структурные единицы хроматина в ядрах эукариот.

Гликопротеиды - сложные белки, содержащие углеводные компоненты.

Гомозигота - Клетка (или организм), содержащая в данном локусе гомологичных хромосом одинаковые аллели. (AA, aa).

Гомологи - хромосомы, имеющие одинаковые генетические локусы; диплоидная клетка обладает двумя копиями каждого гомолога, по одной от каждого родителя.

Гомозиготность. Доля особей, гомозиготных по данному локусу, или доля гомозиготных локусов в генотипе особи.

Гомологичные хромосомы. Хромосомы или участки идентичные в отношении последовательности локусов и видимой структуры; в процессе эволюции возникают также гомологичные гены и различные структуры, сходные между собой в силу их происхождения от общего предка.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Полинуклеотид, содержащий в качестве углеводного остатка дезоксирибозу; представляет собой основной генетический материал всех клеток.

Делеция – хромосомная мутация, в результате которой определенная последовательность нуклеотидов утрачивается (ср. Дупликация).

Денатурация ДНК или РНК - переход этих молекул из двухцепочной формы в одноцепочную; разделение цепей наиболее часто достигается нагреванием.

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) – биологическая макромолекула, носитель и хранитель генетической информации. См.

Дезоксирибонуклеиновая кислота. Домен в молекуле белка - участок аминокислотной последовательности, связанной с определенной функцией.

Доминирование - проявление действия лишь одного из аллелей у гетерозиготного организма.

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка; образуется в результате слияния двух гамет. Диплоидная клетка.

Зоопланктон — см. Планктон.

Идентичные по происхождению гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности в силу того, что оба происходят от общего предка.

Идентичные по структуре гены. Два гена, имеющие одинаковые нуклеотидные последовательности независимо от того, происходят они от общего предка или нет.

Инбредная депрессия - явление снижения жизнеспособности и продуктивности, ухудшение воспроизводительной функции в результате инбридинга.

Инбридинг - спаривание (подбор) близкородственных особей.

Инверсия – аберрация, при которой происходит отрыв участка хромосомы, поворот его на 180° и присоединение на прежнее место.

Индукцированные мутации - возникают под действием мутагенного фактора.

Интерфаза - фаза клеточного цикла между митотическими делениями клетки; подразделяется на G1, и S, G2.

Интроны - последовательности внутри структурного гена, которые не участвуют в кодировании белкового продукта гена. После транскрипции гена последовательности, соответствующие интронам, удаляются из мРНК в процессе сплайсинга.

Кариотип - набор хромосом соматической клетки организма, характерный для вида по числу, форме и величине.

Карта хромосом - план расположения генов в хромосоме

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

кДНК - одноцепочная ДНК, синтезированная обратной транскриптазой на матрице РНК.

Клон - совокупность клеток или особей, произошедших от общего предка путем бесполого размножения.

Кодирующая цепь - та цепь ДНК, последовательность которой идентична мРНК.

Кодон - Группа из трех смежных нуклеотидов в молекуле мРНК, либо кодирующая определенную аминокислоту, либо обозначающая конец синтеза полипептидной цепи.

Комплементарная цепь - одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и комплементарная ей.

Кроссинговер - Обмен между гомологичными хроматидами, происходящий в процессе мейоза и лежащий в основе генетической рекомбинации.; если хроматиды имели разные наборы аллелей, то кроссинговер может быть выявлен по образованию генетически рекомбинантных хроматид.

Леталь. Ген (или хромосомная мутация), вызывающий гибель организма до достижения им половозрелости; если леталь доминантна, то погибают все ее носители, если же она рецессивна, то погибают только гомозиготы.

Летальные гены - гены, вызывающие гибель организма в 100% случаев.

Летальные мутации – мутации, несовместимые с жизнью.

Лигаза - фермент, способный устранять разрывы в молекуле ДНК, восстанавливая ковалентные связи между 5' - и 3' – концами молекул.

Лимфоциты-В - вид лейкоцитов, которые синтезируют и секретируют иммуноглобулины.

Лимфоциты –Т - вид лейкоцитов, которые выполняют различные функции в ходе иммунного ответа.

Локус - место в хромосоме, в котором картируется ген, отвечающий за определенный признак; локус может быть представлен любым аллелем данного гена.

Маркер (генетический) - любой аллель, используемый в эксперименте.

Мейоз - два последовательных деления клетки (I и II мейотические деления), в результате которых образуется исходное гаплоидное число хромосом в каждой из четырех образовавшихся клеток. Эти клетки созревают и превращаются в гаметы (сперматозоиды и яйцеклетки).

Менделевская популяция. Группа скрещивающихся между собой организмов, образующая единый генофонд.

Метафаза – стадия митоза и мейоза, при которой хромосомы выстраиваются на экваторе клетки, образуя метафазную пластинку.

Мини-сателлитные последовательности (повторы) – простые tandemно повторяющиеся нуклеотидные последовательности генома эукариот с длиной повторяющейся части от 1 до 7 нуклеотидов.

Микросателлиты – присутствующие в эухроматине короткие tandemно повторяющиеся последовательности ДНК

Митоз - деление эукариотической соматической клетки.

Митохондриальные ДНК - небольшие кольцевые молекулы ДНК, присутствующие в митохондриях; кодируют некоторые компоненты митохондрий.

Мозаицизм - присутствие в организме клеток (точнее клонов) разного генотипа.

Молчащие мутации - не изменяют продукта, кодируемого геном.

Моногибридное скрещивание - скрещивание, при котором у родителей учитывается один признак, контролируемый одним локусом.

Мутагенез – процесс возникновения мутаций.

Мутагены - факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций, вызывая изменения в ДНК.

Мутация – скачкообразное, стойкое изменение в структуре ДНК и кариотипе.

Наследственные болезни - болезни, вызываемые мутацией генов одного или нескольких локусов и сопровождающиеся появлением аномалий, уродств и т.д.

Нехватка - утрата концевых участков хромосом.

Нуклеоид - ядерная зона в прокариотической клетке; она содержит хромосому, но не окружена мембраной. Компактное образование у бактерии, содержащее ДНК.

Нуклеосома - основная структурная единица хроматина, состоящая из ~ 200 нуклеотидных пар ДНК и октомера гистоновых белков.

Обратная транскриптаза - РНК-зависимая ДНК-полимераза – фермент, осуществляющий синтез ДНК на матрице РНК.

Однонуклеотидные замены (полиморфизмы) – генные мутации, затрагивающие один нуклеотид.

Плазида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Полипептид. Последовательность аминокислот, связанных между собой ковалентными пептидными связями; белок.

Половые хромосомы. Хромосомы, участвующие в определении пола и различающиеся у представителей разных полов (ср. Аутосомы).

Промотор - участок ДНК, ответственный за связывание РНКполимеразы, инициирующей транскрипцию.

Процессинг - совокупность реакций, ведущих к превращению первичных продуктов транскрипции и трансляции в функционирующие молекулы.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – амплификация ДНК в условиях *in vitro* (в пробирке).

Рекомбинантная ДНК - искусственно полученная молекула ДНК.

Рекомбинация. Образование новых сочетаний отдельных участков молекул ДНК (хромосом).

Репарация – восстановление повреждённой структуры ДНК.

Репрессор - ген, подавляющий действие другого гена.

Репликон – часть молекулы ДНК, в которой осуществляется синтез новой ДНК в одноцепочечной форме.

Репликация - процесс самовоспроизведения нуклеиновых кислот, обеспечивающий точное воспроизведение генетической информации.

Рестрикция - процесс разрезания молекулы ДНК ферментами – рестриктирующими эндонуклеазами.

Рецепторы - макромолекулярные структуры клеточной поверхности, с помощью которых клетки узнают антигены.

Рецессивность - отсутствие проявления одного из аллелей в гетерозиготе.

Рецессивный аллель. Аллель (или соответствующий признак), проявляющийся лишь в гомозиготном состоянии.

Рецессивный ген - ген, влияющий на развитие признака только в гомозиготном состоянии.

Рибонуклеиновая кислота (РНК). Полинуклеотид, содержащий в отличие от ДНК урацил вместо тимина и сахар рибозу вместо дезоксирибозы

Рибосома - органоид цитоплазмы, с участием которого происходит синтез белка в клетке.

мРНК – матричная, информационная РНК (иРНК), кодирующая белки.

РНК – одноцепочечные полимерные молекулы нуклеиновых кислот, участвующие в процессах биосинтеза белка и выполняющие разные функции (мРНК, тРНК, рРНК).

Сайт – место, занятое точковой мутацией внутри цистрона, т.е. любая пара нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК

Системы групп крови - совокупность антигенов, контролируемых одним локусом.

Сплайсинг - процесс удаления интронов и объединения экзонов в мРНК.

Структурный ген - кодирует РНК или белок.

Тератология - наука, изучающая уродства.

Терминатор - последовательность ДНК, находящаяся на конце транскрипта и ответственная за прекращение транскрипции.

Терминирующий кодон - один из трех триплетов УАГ, УАА или УГА, вызывающих терминацию синтеза белка; их также называют бессмысленными кодонами.

Точковые мутации - изменение одной пары оснований.

Трансгенез - экспериментальный перенос генов, выделенных из определенного генома или искусственно синтезированных, в другой геном.

Трансдукция - перенос генов из одной бактериальной клетки в другую при помощи бактериофага.

Транскрипция - процесс синтеза РНК на ДНК-матрице.

Транслокация - перемещение гена или участка хромосомы из одного локуса в другой.

Трансляция - процесс синтеза белка на матричной мРНК.

Трансплантация эмбрионов - метод ускоренного воспроизводства высокопродуктивных животных (доноров) путем получения и пересадки эмбрионов менее ценным животным (реципиентам).

Трансформация бактериальных клеток - приобретение нового генетического маркера в результате включения экзогенной ДНК.

Трансформация эукариотических клеток - переход в состояние неконтролируемого роста; имеет много общего или совпадает с опухолевым перерождением клеток.

Триплет - набор трех нуклеотидов (синоним кодона).

Трисомия – наличие добавочной хромосомы в кариотипе диплоидного организма.

Фаг (бактериофаг) - бактериальный вирус.

Фрагменты Оказаки - короткие фрагменты ДНК длиной несколько тысяч (бактерии) или несколько сотен (эукариоты) нуклеотидов образуется в результате прерывистой репликации; впоследствии ковалентно соединяются в непрерывную цепь.

Химеры - растения или животные со смешанными тканями двух организмов.

Хроматиды - хромосомные копии, образующиеся при репликации.

Хромосомы - Нитевидная структура в ядре клетки, содержащая гены, расположенные в линейной последовательности; молекула ДНК, представляющая весь геном прокариотических клеток; молекула ДНК в комплексе с гистонами и другими белками в эукариотических клетках.

Экзон - любой отдельный фрагмент прерывистого гена, который сохраняется в зрелой РНК.

Экзонуклеазы - ферменты, последовательно отщепляющие нуклеотиды с концов полинуклеотидной цепи; могут быть специфичными в отношении 5' – или 3' – концов ДНК или РНК.

Экспрессивность - влияние данного аллеля на степень выраженности признака.

Экспрессия гена – активизация транскрипции гена, в процессе которой на ДНК образуется мРНК.

Электрофорез фрагментов ДНК – процесс, обеспечивающий разделение фрагментов ДНК на поверхности геля. Фрагменты движутся в геле, помещённом в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется).

Электрофорез. Метод разделения молекул, основанный на их разной подвижности в электрическом поле.

Эндонуклеазы - ферменты, расщепляющие связи полинуклеотидной цепи нуклеиновых кислот; могут быть специфичны в отношении РНК одноцепочных или двухцепочных ДНК.

Энзимы – ферменты, вещества белковой природы, участвующие в биохимических реакциях.

Эписома - плазида, способная интегрировать в бактериальную ДНК.

Эухроматин - представляет собой весь генетический материал интерфазного ядра, за исключением гетерохроматина.

Ядро – жизненно важный органоид клеток эукариот, содержащий ДНК.

Ядрышко - обособленная область ядра, образуемая при транскрипции генов рРНК.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Раздел 1. Молекулярно – генетические методы диагностики	5
Раздел 2. Видовая идентификация	11
Раздел 3. Обеспечение безопасности пищевой продукции из ГМИ.....	15
Раздел 4. Молекулярно-генетический мониторинг биотехнологических процессов	26
Темы контрольных работ	33
Список основной литературы	35
Список дополнительной литературы	35
Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».....	35
Тестовые задания для оценки сформированности компетенций	36

ПРОМЕЖУТОЧНАЯ АТТЕСТАЦИЯ	40
Словарь терминов.....	42

Составитель
Себежко Ольга Игоревна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В
БИОТЕХНОЛОГИИ
Методические указания по выполнению самостоятельной и
контрольной работ

Формат 60×84 1/16 2,4 усл.печ.л.

В авторской редакции
Компьютерная вёрстка О.И. Себежко